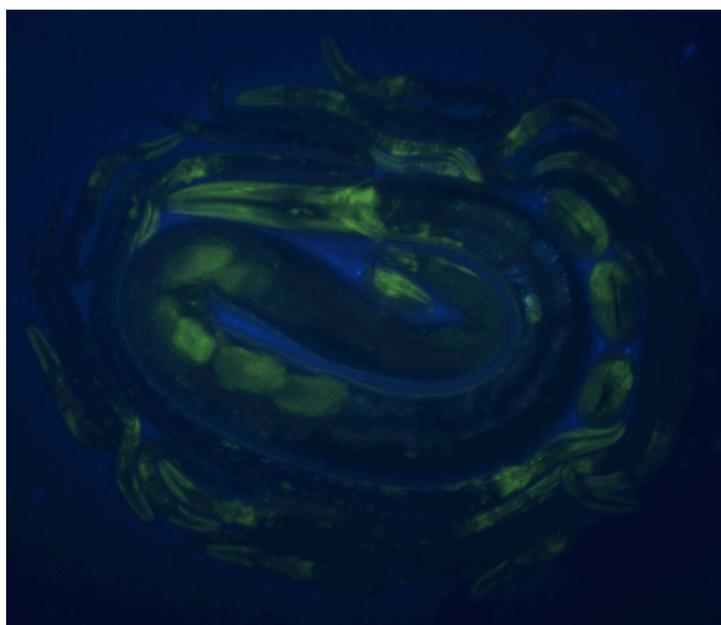


Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

RENATA SOFIA TOMÁS NEVES

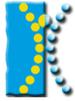
**EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE NEUTRÕES NO
DESENVOLVIMENTO DO ORGANISMO
*CAENORHABDITIS ELEGANS***



Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre no curso de Ciências Nucleares Aplicadas na Saúde conferido pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Coimbra

2014



Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

RENATA SOFIA TOMÁS NEVES

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE NEUTRÕES NO
DESENVOLVIMENTO DO ORGANISMO
*CAENORHABDITIS ELEGANS***

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre no curso de Ciências Nucleares Aplicadas na Saúde conferido pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Orientador : Prof. Doutor Francisco José Alves

Coorientador: Mestre Ricardo Jorge Ferreira Faustino

Coimbra

2014

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo o mundo vê”

Arthur Schopenhauer

Agradecimentos

A todos os amigos e colegas de trabalho por todo o apoio e disponibilidade prestada ao longo da realização deste trabalho, fazendo-me sempre acreditar que com convicção e vontade tudo é possível. Agradeço também à minha chefe de trabalho pela ajuda e flexibilidade demonstrada, permitindo-me deste modo estudar e trabalhar em simultâneo.

Ao Instituto de Ciências Nucleares aplicadas à Saúde por me ter proporcionado a realização deste trabalho, cedendo o espaço, os materiais e as técnicas necessárias ao longo da sua execução.

Um agradecimento especial ao meu co-orientador de tese, Mestre Ricardo Faustino, que me deu a conhecer o gosto pela investigação, que sempre me orientou e apoiou em tudo o que necessitei e por ter sempre acreditado em mim.

Ao professor Doutor Francisco Alves, meu orientador de tese, por me ter apresentado esta hipótese de estudo, por toda a ajuda despendida durante este projecto e pelas horas passadas no ciclotrão nos períodos de irradiação.

Um agradecimento especial à minha família pois sem eles isto não seria possível.

Resumo

Actualmente tem se assistido a uma evolução exponencial das técnicas de diagnóstico e tratamento com base em radiação ionizante, sendo por isso fundamental estudar todos os tipos de interacção e conhecer todos os efeitos que as diferentes radiações podem originar.

Um exemplo desse avanço terapêutico é a radiação por neutrões, partículas que ao apresentarem características muito particulares, como a ausência de carga eléctrica, elevado LET e RBE, tornam-se muito atractivas, principalmente no tratamento de neoplasias. Neste sentido, é de suma importância estudar e observar todos os efeitos que possam surgir na interacção de neutrões com um organismo vivo de forma a poder otimizar as técnicas já existentes, razão que levou à realização deste trabalho. Este teve como objectivo estudar os possíveis efeitos provocados no desenvolvimento de um organismo, *Caenorhabditis elegans*, quando exposto a um feixe de neutrões de intensidade de corrente de 1 μ Ah, 5 μ Ah e 10 μ Ah. Estas intensidades foram produzidas num ciclotrão, sendo colocadas as populações de *C.elegans* no percurso do feixe de neutrões. Posteriormente, analisaram-se amostras em microscopia de fluorescência e efectuaram-se contagens do número de nemátodos presentes em cada amostra irradiada, no sentido de obter o factor de reprodução para cada uma delas.

Os resultados obtidos neste projecto demonstram que existe uma modificação do factor de reprodução de *C.elegans* quando exposto a um feixe de neutrões, sendo que essa modificação depende da intensidade de corrente que o feixe possui. Os valores da intensidade de fluorescência também revelam alterações consoante a energia dos neutrões, traduzindo uma variação da expressão das proteínas codificadas pelo gene responsável pela fluorescência.

Palavras chave : Radiação por neutrões, Radiobiologia, *Caenorhabditis elegans*, Microscopia de fluorescência, Factor de reprodução

Abstract

Recently we have seen exponential growth in the techniques of diagnosing and treatments using ionizing radiation. Because of this, it is essential that we study all types of interactions and achieve a greater understanding of the effects that different types of radiation can cause.

An example of this progress is therapeutic radiation by neutrons, which when used demonstrates these three characteristics; the absence of electrical charges, high levels of LET and RBE. These three characteristics make the use of therapeutic radiation very attractive, especially in the treatment of neoplasms. In this sense, it is extremely important to study and observe all the effects that may occur during the interaction of the neutron flux with a living organism in such a way that allows us to be able to optimize the existing techniques that is the reasoning behind this research.

The objective was to study the possible effects on the development of an organism, *Caenorhabditis elegans*, when expose to a neutron beam with a current intensity of 1 μ Ah, 5 μ Ah e 10 μ Ah. These intensities were produced in a cyclotron and then the population of *C.elegans* were placed in the neutron beam. Subsequently, samples were analyzed with a fluorescent microscope and then analyzed through counting the number of nematodes present in the irradiated sample in order to obtain the reproduction factor for each one.

The results obtained in this project show that there is a modification in the factor of reproduction of *C.elegans* when exposed to a neutron beam and this modification depends on the amount of current that the beam has. The values of fluorescent intensity also reveal changes depending on the neutron energy, translating a variation of expressions of proteins encoded by the gene responsible for fluorescence.

Key Words: Neutron Radiation, Radiobiology, *Caenorhabditis elegans*, fluorescence microscopy, reproduction factor.

Abreviaturas e Símbolos

AT: Adenina - Timina

BNCT: Terapia de Captura de Neutrões pelo Boro

b: Barn

CaCl₂: Cloreto de Cálcio

C.elegans : *Caenorhabditis Elegans*

Ced: *Cell death abnormal*

CTCF: *Corrected Total Cell Fluorescence*

D: Dose absorvida

DAPI: 4',6'- diamidino - 2- fenilindole

DNA: Ácido desoxirribonucleico

E.coli: *Escherichia coli*

Egl: *Egg laying defect*

FNT: Terapia por Neutrões Rápidos

FR: Factor de Reprodução

GFP: Green Fluorescent Protein

Gy: Gray

H_t: Dose equivalente

ICNAS: Instituto de Ciências Nucleares aplicadas à Saúde

ICRP: *Internacional Commision on Radiological Protection*

ICRU: *International Commision on Radiation Units and Measurements*

KH₂PO₄: Hidrogenofosfato de Potássio

KPO₄: Fosfato de Potássio

LB: *Luria Broth* ou *Luria Bertani*

LED: *Light Emitter Diode*

LET: Transferência linear de energia (*Linear energy transfer*)

MgSO₄: Sulfato de Magnésio

MF: Microscópio de Fluorescência

MeV: Mega electrões volt (10^6eV)

NaCl: Cloreto de Sódio

NaOH: Hidróxido de Sódio

NGM: *Nematod Growth Medium*

OER: Relação de enriquecimento em oxigénio (*Oxygen enhancement ratio*)

PBS: Tampão fosfato-salino

PET: Tomografia por Emissão de Positrões

ppm: Partes por milhão

RBE: Eficácia biológica relativa (*Relative biological effectiveness*)

Rad: *Radiation Absorbed Dose*

RNA: Ácido ribonucleico

Sv: Sievert

u.m.a: Unidades de massa atómica

UV: Ultra-violeta

μAh : Microampere hora

Índice Geral

Agradecimentos.....	IV
Resumo.....	V
Abstract	VI
Abreviaturas e Símbolos.....	VII
Índice Geral	IX
Índice de Figuras	XII
Índice de Tabelas	XV
Parte I - Introdução	1
Capítulo 1 – Física Nuclear e Ciclotrão	1
Neutrão.....	1
Enquadramento histórico.....	2
Interacção do Neutrão com a Matéria.....	2
Interacção do Neutrão com Tecido Biológico	7
Fontes de Neutrões	8
Ciclotrão.....	9
Enquadramento histórico.....	11
Princípios físicos de funcionamento – Condição de ressonância.....	13
Capítulo 2 – Efeitos Radiobiológicos dos Neutrões e sua Aplicação	17
Radiação ionizante.....	17
Organização global dos Seres Vivos	18
Efeitos Radiobiológicos em Organismos Vivos	20
Classificação dos Efeitos Biológicos	24
Conceitos utilizados em Radiação.....	25
Transferência Linear de Energia (LET).....	25
Eficácia Biológica Relativa (RBE)	26
Relação de Enriquecimento em Oxigénio (OER).....	27
Grandezas e unidades Radiológicas.....	28

Dose Absorvida (D).....	28
Dose Equivalente (H _t).....	28
Factores que influenciam o efeito da Radiação	29
Terapia por Radiação de Neutrões	31
Terapia de Captura de Neutrões pelo Boro (BNCT).....	32
Terapia por Neutrões Rápidos (FNT).....	35
Capítulo 3 – <i>Caenorhabditis elegans</i> como organismo modelo.....	36
Características Gerais.....	36
Anatomia	38
Genoma do <i>C.elegans</i>	41
Fertilização e Gametogénese	41
Desenvolvimento embrionário – Embriogénese.....	42
Desenvolvimento pós-embrionário – Fase larvar	45
Morte celular programada - Apoptose	46
Características morfológicas da Apoptose.....	48
Genes reguladores da Apoptose.....	49
Caspases – iniciadoras e executoras da Apoptose.....	51
Parte II – Material e Métodos	54
Capítulo 1 – ICNAS : Ciclotrão	54
Capítulo 2 – Manutenção de <i>Caenorhabditis elegans</i>	57
Preparação de NGM (<i>Nematode Growth Medium</i>)	57
Alimentação do nemátoda <i>C.elegans</i>	58
Transferência de <i>C.elegans</i>	59
Congelação de nemátodas.....	60
Descontaminação de culturas de <i>C.elegans</i>	61
Capítulo 3 – Microscopia de Fluorescência.....	62
GFP – <i>Green Fluorescent Protein</i>	62
Gene <i>UNC-119</i>	64
Microscópio de Fluorescência.....	65

Componentes do Microscópio de Fluorescência.....	65
Princípios gerais de funcionamento.....	67
DAPI – Marcador fluorescente específico para o DNA.....	69
Preparação de amostras para Microscópio de Fluorescência.....	70
Processamento de dados - ImageJ®.....	73
Parte III – Resultados experimentais	76
<i>Capítulo 1 – Resultados gerais</i>	<i>76</i>
<i>Capítulo 2 – Resultados por Microscopia de Fluorescência.....</i>	<i>85</i>
Parte IV – Discussão de resultados	93
Parte V – Conclusão	98
Parte VI – Perspectivas futuras	100
Parte VII – Bibliografia.....	101

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclotrão presente no ICNAS (Instituto Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde) [5].....	10
Figura 2. Esquema de um acelerador linear de Rolf Wideröe [7].	11
Figura 3. Diagrama simplificado de um ciclotrão e do seu princípio de funcionamento [7].	13
Figura 4. Ilustração dos tipos de focagem radial e axial de um campo magnético, que decrece consoante o aumento do raio do ciclotrão, e respectiva força resultante [7].	16
Figura 5. Desenho esquemático de uma célula eucariótica e respectivos componentes celulares [11].....	19
Figura 6. Esquema representativo da organização geral dos seres vivos, desde os átomos até ao indivíduo [12].	20
Figura 7. Esquema da interação de forma directa ou indirecta da radiação na célula e as suas possíveis consequências[12].	22
Figura 8. Esquema simplificado dos mecanismos de interação e das consequências biológicas da radiação ionizante [12].	23
Figura 9. Organização do ciclo celular numa célula eucariótica [11].....	31
Figura 10. Ilustração do mecanismo da BNCT – interação do ^{10}B com o neutrão de baixa energia e o posterior decaimento do ^{11}B numa partícula alfa (^4He) e num núcleo de ^7Li com libertação de 2,729 MeV de energia [19].	32
Figura 11. Desenho esquemático dos mecanismos da BNCT numa célula cancerígena. [18].....	35
Figura 12. <i>Caenorhabditis elegans</i> em NGM (agar) através de microscopia óptica [22].	36
Figura 13. Ilustração do ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i> [22]	37
Figura 14. Anatomia de <i>C.elegans</i> no global e numa secção transversal do corpo [22].	39
Figura 15. Desenho ilustrativo e imagem de microscópio óptico de <i>C.elegans</i> Hermafrodita (superior) e Macho (inferior) [28].....	41
Figura 16. Desenvolvimento embrionário do nemátoda <i>C.elegans</i> [23].....	45
Figura 17. Desenvolvimento larvar do nemátoda <i>C.elegans</i> [22].	46
Figura 18. Diagrama representativo dos mecanismos globais da apoptose [11].	48

Figura 19. Processos globais da apoptose - condensação, fragmentação e fagocitose [47].	49
Figura 20. Ilustração dos procedimentos fundamentais realizados pelos genes reguladores da apoptose [11].	50
Figura 21. Esquema simplificado do modelo de activação das caspases no <i>Caenorhabditis elegans</i> (a) e nos seres humanos (b) [27].	53
Figura 22. A primeira imagem (a) representa o arranjo conformacional da GFP e a segunda imagem (b) o fluoróforo responsável pela emissão da cor verde. [31].	63
Figura 23. Princípio básico de funcionamento do microscópio de fluorescência. [24].	67
Figura 24. Espectro relativo aos comprimentos de onda de interesse na microscopia de fluorescência por GFP. [35].	68
Figura 25. Espectro relativo aos comprimentos de onda de interesse na microscopia de fluorescência por DAPI. [35].	70
Figura 26. Ilustração da preparação de amostras tendo uma base de agarose de 2%. [36].	73
Figura 27 Ilustração do trabalho realizado no ImageJ® e no Excel®, após obtenção das imagens no microscópio de fluorescência.	75
Figura 28. Representação gráfica do factor de reprodução nas 3 intensidades de corrente.	81
Figura 29. Representação gráfica da média do factor de reprodução das placas expostas e das placas de controlo para as 3 intensidades de corrente.	81
Figura 30. Representação gráfica do factor de reprodução numa experiência posterior com período de análise de 216 horas após exposição.	83
Figura 31. Imagens adquiridas no MF da placa de controlo onde se visualiza 3 embriões na fase de gastrulação, sendo a primeira em <i>Brigth Field</i> , a segunda DAPI, a terceira GFP e a quarta a fusão de DAPI com GFP.	85
Figura 32. Conjunto de imagens obtidas por MF de embriões na fase de gastrulação, após 168 horas da irradiação e expostos a 10µAh, em que se visualiza possíveis sinais de apoptose, sendo a primeira imagem em <i>Brigth Field</i> , a segunda DAPI, a terceira GFP e a quarta a fusão destas três.	86
Figura 33. Representação gráfica dos valores normalizados da fluorescência de cada placa nas 3 experiências, de acordo com os 3 períodos de análise.	87

Figura 34. Imagens adquiridas no MF de 3 embriões na fase de gastrulação, após 72horas da irradiação expostos a 1 μ Ah, sendo a primeira imagem em Brighth Field, a segunda DAPI, a terceira GFP e a quarta a fusão de DAPI com GFP.	88
Figura 35. Representação gráfica dos valores médios de fluorescência das placas expostas e das não expostas nos 3 períodos de análise, nas respectivas intensidades de corrente.	89
Figura 36. Conjunto de imagens obtidas por MF de embriões em diferentes fases de desenvolvimento (desde gastrulação até pretzel) e de nemátodas jovens, após 72horas da irradiação e expostos a 5 μ Ah, em que se visualiza possíveis sinais de apoptose num dos embriões. A primeira imagem corresponde a Brighth Field, a segunda DAPI, a terceira GFP e a quarta a fusão das duas últimas.	90
Figura 37. Representação gráfica dos valores de fluorescência de uma experiência realizada posteriormente com tempo de análise de 216 horas após irradiação. ´	91
Figura 38. Imagens adquiridas por MF de dois nemátodas adultos, com embriões <i>in útero</i> , após 120horas da irradiação expostos a 5 μ Ah, sendo a primeira imagem em Brighth Field, a segunda DAPI, a terceira GFP e a quarta a fusão das três.	92
Figura 39. Imagens obtidas por MF de dois embriões na fase de gastrulação, após 168horas da irradiação expostos a 10 μ Ah, sendo a primeira imagem em Brighth Field, a segunda DAPI, a terceira GFP e a quarta a fusão das últimas duas.	92
Figura 40. Efeito Hormesis – efeito em função de baixas doses [Ronald 1985, referência 39].....	94

Índice de Tabelas

Tabela 1. Efeitos de uma Radioexposição aguda num ser humano. [14].....	24
Tabela 2. Factores de ponderação da radiação, w_r , segundo as recomendações da ICRP de 2007 (ICRP Publication 103), publicação em que a legislação nacional se baseia. [15]	29
Tabela 3. Valores de Dose nos diferentes alvos do Ciclotrão, a uma intensidade de feixe de $1\mu A$ por hora.....	54
Tabela 4. Factores de ponderação da radiação, segundo as recomendações da ICRP, ao longo das últimas publicações de 1977 a 2007 [15].	55
Tabela 5. Valores de dose equivalente e dose absorvida para feixes com diferentes intensidades: 1, 5 e $10\mu Ah$	55
Tabela 6. Distribuição das placas de <i>C.elegans</i> por grupos e indicação da finalidade de cada uma.	56
Tabela 7. Número de nemátodas presentes em cada placa para $1\mu Ah$, nos 3 períodos de análise.....	77
Tabela 9. Número de nemátodas presentes em cada placa para $5\mu Ah$, nos 3 períodos de análise.....	78
Tabela 10. Número de nemátodas presentes em cada placa para $10\mu Ah$, nos 3 períodos de análise.....	79
Tabela 11. Apresentação dos valores de população final, população inicial, factor de reprodução e média do factor de reprodução para as placas expostas, nas 3 intensidades de corrente utilizadas.	80
Tabela 12. Dados referentes a uma experiência realizada posteriormente, nas mesmas condições que as anteriores mas apenas com um tempo de análise de 216 horas após exposição.....	82
Tabela 12. Factor de reprodução nos últimos períodos de análise, 168 horas e 216 horas, para cada intensidade de corrente e respectivo valor do teste <i>T-Student</i>	83
Tabela 13. Valores de Fluorescência de cada placa nas 3 experiências de acordo com os 3 períodos de análise e respectiva média das placas expostas nestes mesmos períodos.....	86
Tabela 14. Valores médios de fluorescência nos 3 períodos de análise, nas placas expostas a irradiação e nas não expostas, de acordo com as 3 experiências.	89

Tabela 15. Valores de fluorescência de uma experiência realizada posteriormente com tempo de análise de 216 horas após exposição.....	90
Tabela 16. Valores de fluorescência em cada período de análise para cada intensidade de corrente e respectivo valor do teste <i>T-Student</i>	91

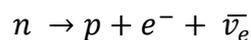
Parte I - Introdução

Capítulo 1 – Física Nuclear e Ciclotrão

Neutrão

O neutrão, uma partícula descoberta pelo físico britânico James Chadwick em 1932, localiza-se no núcleo dos átomos juntamente com o próton. Esta partícula classifica-se como um barião composto por três quarks, dois *quark down* e um *quark up* unidos pelos gluões, sendo a sua carga eléctrica zero. O seu *spin* ou momento angular intrínseco é não inteiro, sendo por isso um fermião. A sua massa é de $1,672 \times 10^{-24}$ g (1,008664904(14) u.m.a), valor este muito próximo à massa do próton.[1]

Os neutrões são partículas que existem em todos os núcleos atómicos, excepto o do hidrogénio, pois são fundamentais para a estabilidade dos mesmos, já que são tão estáveis quanto os prótons. No entanto, quando se encontram fora do núcleo atómico ficam bastante instáveis, decaindo por decaimento beta, com um tempo de semi-vida de apenas 10,8 minutos, originando um próton (p), um electrão (e^-) e um neutrino ($\bar{\nu}_e$). [1]



Equação 1

A existência de diversos isótopos para o mesmo elemento, deve-se à variedade do número de neutrões presentes nos núcleos. [1]

Devido às suas características, principalmente por ser bastante abundante e por apresentar mecanismos de interacção com o meio muito diferentes das observadas pelas outras radiações, esta partícula atómica torna-se muito singular. Estes mecanismos baseiam-se na existência de uma interacção nuclear forte, não sendo influenciados por campos electromagnéticos. [1]

Enquadramento histórico

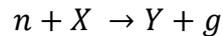
Os últimos anos do século XIX foram fundamentais para a descoberta e para a evolução da radiação e da radioactividade. Em 1909, Ernest Rutherford comprovou que a radiação alfa libertada por alguns materiais era apenas gás hélio. Alguns anos depois e com a descoberta do protão, surgiu um novo problema relacionado com o hidrogénio e o hélio, uma vez que o primeiro apresentava ter metade da carga do segundo, no entanto este tinha o quádruplo da massa do primeiro, facto muito controverso. Desde os anos 20, Rutherford já suspeitava da existência de uma partícula relativamente grande e sem carga. No entanto, é James Chadwick (seu aluno) que a partir dos estudos de Irène Curie e Frédéric Joliot, mais precisamente a descoberta de um tipo de radiação altamente energética e sem carga, confirma a existência dessa mesma partícula, intitulada de Neutrão. Assim, e após esta descoberta foi possível descrever a composição final de um átomo: electrões em órbita de um núcleo composto de protões e neutrões. [1]

Interacção do Neutrão com a Matéria

Sendo o neutrão uma partícula de carga eléctrica nula, a sua interacção com a matéria baseia-se essencialmente através da interacção directa com os núcleos, pois não são influenciados pela força coulombiana, não sendo portanto repelidos por estes. Devido a esta característica, o neutrão é utilizado para estudar os núcleos atómicos, como por exemplo a presença de forças nucleares, uma vez que não sofre interferências das camadas electrónicas. Mesmo os neutrões de baixa energia conseguem induzir reacções nucleares, pois não sentem a repulsão electromagnética nem dos electrões nem dos núcleos. [1]

A ausência de carga eléctrica permite deste modo interagir apenas com os núcleos, o que confere aos neutrões um grande poder de penetração na matéria, sendo superior aos outros tipos de radiação. Consequentemente, o único modo de perderem a sua energia cinética ao atravessarem um meio material é através de sucessivas interacções com os núcleos atómicos. Os

possíveis fenómenos que advêm destas interações podem ser demonstrados através da seguinte fórmula geral:



Equação 2

em que **n** é um neutrão, **X** é o núcleo alvo, **Y** é o núcleo produto e **g** é o produto da interação. [1]

Estes fenómenos podem ter várias classificações dependendo da natureza de **g**, ou seja, do produto da interação, sendo eles:[2]

- Espalhamento elástico – g é um neutrão e a energia cinética total é conservada;
- Espalhamento inelástico – g é um neutrão e a energia cinética total não é conservada;
- Captura radioactiva – g é um raio gama;
- Fissão – g é um núcleo atómico mais dois ou três neutrões.

Para um determinado tipo de núcleo-alvo, a taxa de ocorrência de cada um dos processos descritos depende também da energia cinética dos neutrões incidentes. Relativamente a este parâmetro existem várias classificações, nomeadamente: [3]

- Neutrões térmicos – energia inferior a 0,1MeV
- Neutrões intermediários– energia entre 0,1MeV a 1 MeV
- Neutrões rápidos – energia entre 1MeV a 10 MeV
- Neutrões relativísticos – energia superior a 10MeV

Quando um neutrão interage com a matéria a forma de interação mais comum é de espalhamento, principalmente espalhamento elástico. O processo de espalhamento baseia-se na transferência de energia de uma partícula (ou núcleo) para outra. Este pode ter duas vertentes consoante as suas características, isto é, se o momento é conservado mas a energia cinética não, denomina-se de colisão inelástica (n, n'), (n, n', γ), ($n, 2n$); por outro lado, se tanto o momento como a energia cinética forem conservadas intitula-se de colisão elástica (n, n). No primeiro fenómeno, o neutrão é inicialmente capturado pelo núcleo-alvo para formar um núcleo-composto. Seguidamente, é expelido um neutrão de menor energia cinética, ficando o núcleo-alvo num estado excitado (de maior energia). Deste modo, parte ou

toda a energia cinética do neutrão é convertida em energia interna ou de excitação do núcleo alvo. Para que o núcleo-alvo retorne ao seu estado fundamental é necessário que essa energia seja emitida, na forma de radiação gama, porém pode permanecer nesta condição por um certo período de tempo, designando-se de isomérico. A colisão inelástica ocorre principalmente com neutrões rápidos (normalmente de 1MeV ou mais) ou na presença de núcleos de massa atômica elevada, que contenham níveis de energia compatíveis com a energia perdida pelo neutrão incidente. No espalhamento elástico, o neutrão incidente é espelhado pelo núcleo, que não sofre variações na sua energia interna. Além disto, o próprio neutrão incidente pode ser sujeito a variações na direção e energia. Quando a probabilidade de espalhamento é igual para qualquer direção denomina-se espalhamento isotrópico, contrariamente a esta condição, chama-se de espalhamento anisotrópico. A perda de energia do neutrão varia consoante a massa do núcleo que nele embate, sendo que para núcleos pesados a perda é irrelevante, influenciando apenas a alteração da direção do neutrão incidente. Geralmente na presença de núcleos pesados e neutrões de energias não muito altas, o espalhamento elástico presente é de carácter isotrópico.[2,4]

O neutrão incidente tende em perder progressivamente a sua energia com as colisões a que é sujeito ao longo da matéria, até entrar em equilíbrio térmico com esta, designando-se no fim de neutrões térmicos. No sentido de saber quantas colisões são necessárias para que um dado neutrão reduza a sua energia (E) até estar em equilíbrio térmico com o meio, definiu-se um parâmetro designado de perda média logarítmica (ξ), que avalia para um dado material, a perda média de energia de um neutrão em escala logarítmica: [1]

$$\xi = \frac{\overline{\ln E_1 - \ln E_2}}{\ln\left(\frac{E_1}{E_2}\right)}$$

Equação 3

sendo que para determinar o número de colisões necessárias basta calcular a razão: [1]

$$\frac{\ln E_1 - \ln E_2}{\xi}$$

Equação 4

Através dos valores típicos de ξ , é possível entender que elementos mais leves, isto é, com massa atómica menor, são mais eficazes para reduzir a energia dos neutrões, já que a probabilidade de ocorrer espalhamento elástico é mais elevada. [1]

Outra forma de caracterizar a redução da energia cinética de um neutrão é através da moderação, ilustrada pela seguinte equação: [5]

$$(\Delta E_k)_{max} = E_{ki} \frac{4m_n M}{(m_n + M)^2}$$

Equação 5

em que $(\Delta E_k)_{max}$ corresponde à máxima transferência de energia possível para um núcleo alvo, m_n é a massa de neutrões e M a massa do núcleo alvo. Analisando esta equação, é possível compreender a preferência de materiais com massa atómica menor, uma vez que quanto menor for a massa, maior é a transferência máxima de energia e, conseqüentemente, mais eficaz é o processo de moderação. Neste sentido, o elemento mais indicado é o hidrogénio, facto pelo qual a água ou a parafina são os materiais mais utilizados com esta finalidade. [1, 5]

Outro tipo de interacção, mais frequente com neutrões térmicos, é a captura radioactiva. Este processo baseia-se na absorção de um neutrão pelo núcleo (X), que através da emissão de raios gama (γ) retoma do estado excitado para o estado fundamental, sendo que a sua massa atómica (A) aumenta uma unidade: [1]



A captura radioactiva também é responsável pela produção de isótopos, uma vez que o núcleo resultante passa a ser instável e conseqüentemente um emissor beta negativo, pois o radionuclídeo resultante ficaria com excesso de neutrões. Deste modo, um neutrão é convertido em um protão com a libertação pelo núcleo de uma partícula beta negativa. [1]

A fissão é outro tipo de interacção dos neutrões com a matéria que consiste na divisão de um núcleo de um elemento pesado em dois ou mais

fragmentos de fissão após a absorção de um neutrão, com a emissão de 2,5 neutrões por fissão, com energia média de 2MeV. Este processo é mais frequente com neutrões térmicos em átomos de U-235 e U-233, e com neutrões rápidos em átomos de Th-232 e U-238. Nesta interacção o neutrão ao incidir sobre um núcleo provoca a sua quebra de forma bastante exotérmica, originando dois núcleos menores e dois ou três neutrões. O processo de fissão é capaz de libertar cerca de 200 MeV de energia, enquanto que outras reacções apenas libertam no máximo 10 MeV. Além disto, devido produzir mais neutrões do que os que consome é capaz de provocar uma reacção em cadeia, uma vez que os neutrões produzidos numa fissão podem originar novas fissões, criando mais neutrões que originarão mais fissões e assim sucessivamente. Esta característica corresponde à base do funcionamento tanto dos reatores nucleares como das bombas atómicas. [1]

Cada uma das reacções referidas possui uma certa probabilidade de ocorrer, que vai depender da energia do neutrão incidente e das características dos núcleos com os quais interage. Esta probabilidade está directamente relacionada com o conceito de secção de choque (σ), que se define como a área de alvo efectiva que um determinado núcleo expõe ao neutrão incidente para que ocorra uma particular reacção, sendo que quanto maior for a secção de choque maior a probabilidade de ocorrer uma dada reacção. [4]

Assim, se $n(x)$ for a intensidade de um feixe de neutrões após cruzar uma espessura x de um dado material e N for o número de átomos por centímetro cúbico do alvo, temos: [1]

$$\frac{dn}{dx} = -N \sigma dx$$

Equação 6

em que σ é uma medida de probabilidade de interacção dos neutrões com o meio e tem dimensões de área, sendo o *barn* (b) a medida utilizada (equivale a 10^{-24}cm^2). A secção de choque, como uma probabilidade de interacção da radiação com a matéria, depende da energia do neutrão incidente que consequentemente vai ditar o tipo de interacção presente. Além disto, também varia de acordo com o meio, pois o neutrão interage

directamente com o núcleo e conseqüentemente com as forças nucleares que nele estão presentes. Neste sentido, não depende apenas do elemento químico que compõe o meio, mas também de isótopo para isótopo. [1]

Interacção do Neutrão com Tecido Biológico

A ausência de carga eléctrica dos neutrões condiciona a sua deposição de energia nos tecidos biológicos, resumindo-se apenas a dois processos, nomeadamente pela transferência de energia para partículas carregadas pesadas (protões e núcleos pesados presentes no tecido) e por interações Coulombianas das partículas carregadas com os átomos do tecido, depositando deste modo a sua energia. [3]

O tipo de interacção do neutrão com o tecido biológico varia consoante a energia cinética destas partículas, pois neutrões térmicos, epitérmicos e rápidos interagem com os tecidos através de diferentes procedimentos. [3]

O tecido biológico é constituído essencialmente por átomos de hidrogénio, azoto, oxigénio e carbono. Deste modo, os possíveis processos de deposição de energia dos neutrões no tecido biológico baseiam-se na interacção desta partícula com os átomos referidos anteriormente: [3]

- Dispersão elástica do Hidrogénio: processo que engloba a colisão de um neutrão térmico com o núcleo de um átomo de hidrogénio, a dissipação de energia de um protão de recuo por sucessivas colisões com electrões e mudança de trajetória de dispersão dos neutrões. A energia transferida neste processo pode ser considerada desprezível, no entanto é o maior responsável pela atenuação do fluxo de um feixe de neutrões térmicos nos tecidos.
- Captura de neutrões pelo azoto: ocorre a absorção de um neutrão térmico por um núcleo de azoto presente no tecido, com emissão de um protão de 0,58MeV e um correspondente núcleo de recuo de carbono com 0,05MeV. A energia cinética liberada neste processo é determinada pelo cálculo da

mudança de energia de ligação total entre o núcleo de azoto ($E_B = 104,66\text{MeV}$) e o núcleo de carbono ($E_B = 105,29\text{MeV}$).

- Captura de neutrões pelo hidrogénio: existe uma maior probabilidade de os neutrões serem capturados pelo hidrogénio do que pelo azoto presente nos tecidos, uma vez que apesar de a secção de choque ser menor no caso do hidrogénio o número de átomos por grama de tecido é mais elevado (razão H/N é cerca de 45/1). Nesta reacção resulta um raio gama, que vai depositar a sua energia no tecido através de processos como a dispersão de Compton, produção de pares e absorção fotoeléctrica, tornando esta reacção o principal meio de distribuição de energia transmitida aos tecidos pelos neutrões térmicos.
- Captura pelo Boro-10: ocorre a captura de neutrões térmicos pelo ^{10}B . Neste processo, o aumento da concentração de boro nos tecidos faz com que a dose ocasionada pela captura de neutrões pelo boro se aproxime da dose colectiva total. No entanto, quando a concentração de boro atinge os 10ppm (*“parts-per million”*), a dose colectiva total relacionada com a captura de neutrões, advém tanto do boro como do conjunto de hidrogénio e nitrogénio. Assim, o valor 10ppm corresponde ao limite mínimo necessário para que a terapia por captura de boro seja viável.

Fontes de Neutrões

Os neutrões são partículas muito particulares que não são emitidos espontaneamente por núcleos, como acontece com a radiação alfa, beta ou gama, e por não possuírem carga eléctrica não podem ser acelerados num acelerador de partículas, como é o caso de electrões, prótons ou núcleos pesados. No entanto, existem outras forma de obter neutrões, ou seja, as designadas fontes de neutrões. [1,6]

Uma possível forma são as fontes do tipo (α,n), em que ocorre a irradiação de elementos leves (nuclídeo com elementos de número atómico menor) com partículas alfa. Deste modo, combina-se um emissor alfa, como o ^{239}Pu , o ^{210}Po ou o ^{241}Am , com um elemento leve como o ^9Be , ^7Li ou ^{10}B , com o intuito da radiação alfa emitida pelo primeiro seja capaz de produzir uma reacção nuclear no segundo, resultando na emissão de um neutrão. Um exemplo deste tipo de fonte são as chamadas fontes de Amerício-Berílio ($^{214}\text{Am-Be}$), em que o neutrão resulta da reacção $^9\text{Be}(\alpha,n)^{12}\text{C}$, com um espectro contínuo de energia de 0-13MeV, sendo a energia média de 5 Mev. [1,6]

Os neutrões podem também resultar de fontes do tipo (γ,n) em que o nuclídeo é um emissor beta e gama de elevada energia, como ^{56}Mn , ^{72}Ga ou ^{24}Na , e produz com um elemento alvo, ^9Be e ^2H , uma reacção nuclear do tipo (γ,n). Um exemplo deste tipo de fonte são as reacções $^2\text{H}(\gamma,n)^1\text{H}$ e $^9\text{Be}(\gamma,n)^8\text{Be}$, em que resulta neutrões de energia inferior a 1 MeV, com actividade específica muito inferior às do tipo (α,n). [1,6]

Ouro tipo de fonte de neutrões é a fissão espontânea, pois é capaz de produzir em média 2 a 3 neutrões por fissão, número bastante elevado. Neste processo, ocorre a emissão de neutrões rápidos por núcleos com alta probabilidade de sofrer fissão espontânea. A fonte mais comum é o ^{252}Cf sendo a sua meia vida de $2,645 \pm 0,008$ anos. [1,6]

Ciclotrão

O ciclotrão é um tipo de acelerador de partículas cíclico de elevada aplicabilidade nas ciências biomédicas, devido não só à sua gama de energias como também ao facto de ser compacto e de reduzidas dimensões. O seu interesse normalmente está direccionado para o fabrico de radionuclídeos para fins biomédicos, sendo nas últimas décadas cada vez mais essencial para a produção dos emissores de positrões devido à expansão da Tomografia por Emissão de Positrões (PET) e a consequente proliferação dos respectivos centros. [5,7]



Figura 1. Ciclotrão presente no ICNAS (Instituto Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde) [5].

Existem vários tipos de aceleradores com diferentes características e princípios de funcionamento. O tipo mais frequente é o ciclotrão isócrono, uma vez que é capaz de produzir feixes de alta intensidade e com energia homogénea. Este baseia-se no princípio de isocronismo, isto é, o aumento do campo magnético do ciclotrão está relacionado com o aumento relativístico da massa, o que permite a manutenção do período de revolução. Deste modo, o campo magnético torna-se fortemente inomogéneo, quer radial, quer azimutalmente. [7]

Outro tipo é o sincrociclotrão ou “ciclotrão de frequência modulada” cujo funcionamento se baseia na variação da frequência do campo eléctrico oscilatório, mais precisamente na diminuição da frequência aplicada aos eléctrodos durante o processo de aceleração, facto relacionado com o decréscimo da frequência de revolução consequente do aumento relativístico da massa. O sincrociclotrão possui uma característica única, fundamental para o processo de aceleração de partículas, que se designa por estabilidade de fase. Esta característica possibilita que os iões se agrupem perto do centro do conjunto (grupo de partículas aceleradas), mesmo que cheguem em tempos distintos ao intervalo de aceleração, simulando uma espécie de focagem longitudinal, de carácter espacial e de fase. [5,7]

Os ciclotrões dedicados a PET são outro tipo de aceleradores, que podem apresentar duas variantes com um objectivo final comum: produção de emissores de positrões destinados a esta técnica. Neste sentido, existe o

ciclotrão capaz de acelerar prótons e deutérios com energia máxima aproximada de 18MeV e 9MeV, respectivamente. A outra variante é o designado de mini-ciclotrão, pois só consegue acelerar prótons a uma energia máxima aproximada de 11MeV. [5,7]

Enquadramento histórico

Rolf Widerøe, físico norueguês, foi responsável pela criação do primeiro acelerador de partículas baseado na aplicação sistemática de uma pequena força aceleradora. Os primeiros aceleradores lineares de partículas funcionavam segundo este método de aceleração, sendo por isso constituídos por uma série de eléctrodos cilíndricos ocos, dispostos num tubo de vidro sob vácuo. Estes cilindros estão ligados alternadamente aos pólos de um gerador de corrente alternada (pólo negativo e pólo positivo) de frequência constante. No extremo do tubo de vácuo encontra-se uma fonte de iões que vai ser sujeita a um campo eléctrico, gerado pela fonte de alta tensão presente no tubo. Este campo, aplicado em cada espaço entre cada eléctrodo cilíndrico, possui sempre a polaridade adequada, de modo que quando um ião o atravessa é sempre acelerado. Este procedimento ocorre ao longo do acelerador, sendo o valor da energia final das partículas dependente do número de eléctrodos que terão de atravessar, ou seja, do número de espaços de aceleração que existem. Como a frequência do gerador de corrente alternada é constante, o tempo que as partículas demoram a percorrer cada eléctrodo também deve ser constante, sendo por isso necessário que o comprimento dos cilindros aumente, de modo a ser proporcional ao aumento da velocidade das partículas ao longo do tubo. [7]

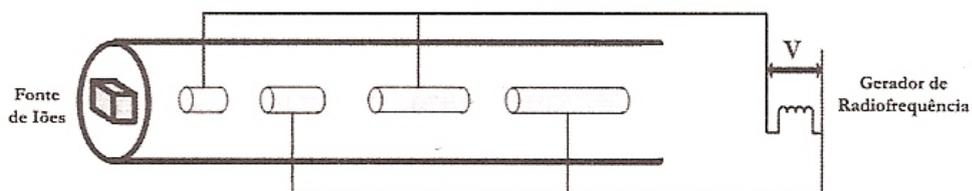


Figura 2. Esquema de um acelerador linear de Rolf Widerøe [7].

O método de aceleração de partículas de Rolf Widerøe apresenta um problema na sua implementação prática, principalmente quando é pretendido aceleração de partículas a altas energias. Esta dificuldade prende-se ao comprimento do acelerador, uma vez que a frequência do campo eléctrico aplicado não deve ser demasiado elevado. De forma a solucionar este entrave, Ernest O. Lawrence propôs uma alteração ao método de Widerøe, que consistia na aplicação de dois eléctrodos disposto frente a frente e um campo magnético. Este último tem como objectivo deflectir a trajetória dos iões em órbitas circulares, fazendo com que passem repetitivamente no espaço de aceleração existente entre os eléctrodos, em direcções opostas em passagens sucessivas. Cada vez que os iões atravessam o espaço de aceleração a sua energia aumenta, sendo para isso necessário que o raio da trajetória circular a que estão sujeitos pelo campo magnético também aumente de forma proporcional. Neste sentido, Lawrence provou que os iões podem ser acelerados em ressonância com o campo eléctrico oscilatório entre os eléctrodos, pois as equações de movimento demonstram um período de revolução constante. [7]

Seguindo este novo método de aceleração de partículas, foi criado o primeiro acelerador magnético de ressonância ou ciclotrão. Este é composto por dois eléctrodos de cobre ocas (ou *Dés*), que se encontram no interior de uma câmara de vácuo, e por uma fonte de alimentação de radiofrequência responsável pela aplicação de um campo eléctrico alternado sinusoidal entre os dois eléctrodos, sendo no entanto o valor do campo eléctrico entre eles nulo. O campo magnético é produzido por um magnete de grandes dimensões alimentado por uma bobine, estando disposto em redor da câmara de vácuo. Este campo apresenta-se uniforme e normal ao plano radial dos dois eléctrodos. A fonte de iões encontra-se no interior da câmara, sendo conduzidos para o eléctrodo que apresentar um potencial de sinal oposto à sua carga e acelerados no espaço entre os eléctrodos. No interior do *Dé* apenas é sentido o campo magnético uniforme, que vai obrigar a que o movimento dos iões corresponda a uma órbita semicircular num plano normal a este campo, encaminhando-os de novo para o espaço entre os eléctrodos. Como o campo eléctrico na região de aceleração se inverte, os iões são de novo acelerados e ao entrar no outro *Dé* vão apresentar uma trajetória

semicircular com um raio superior ao descrito anteriormente. Este processo vai ser sistemático e corresponde à base de funcionamento de um ciclotrão. [7]

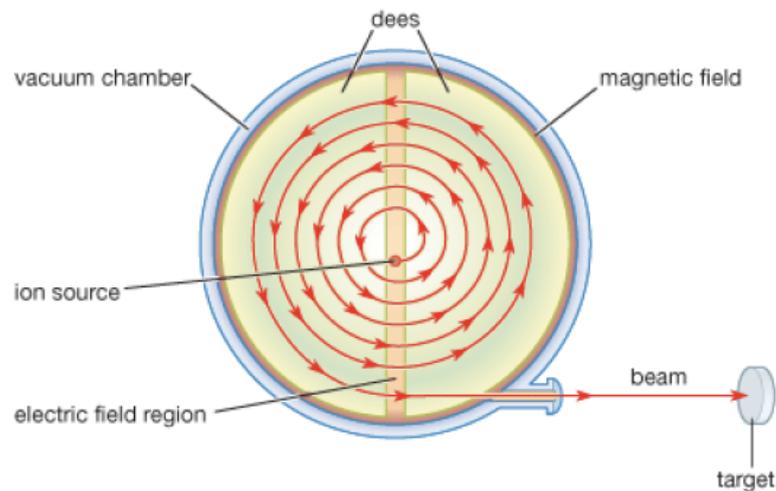


Figura 3. Diagrama simplificado de um ciclotrão e do seu princípio de funcionamento [7].

Princípios físicos de funcionamento – Condição de ressonância

Os íons presentes no interior do ciclotrão estão sujeitos à influência de dois campos, eléctrico e magnético, sendo apenas o primeiro responsável pelo incremento da energia cinética. Porém, o campo magnético é fundamental para funcionamento do ciclotrão, uma vez que tem como função direccionar os íons para a região entre os eléctrodos, local onde perdura o campo eléctrico acelerador. Deste modo e para haver sincronização entre os dois campos, o valor que o campo magnético deve possuir tem de ser tal que o tempo necessário para que cada ião se dirija de um eléctrodo para o outro (complete o semicírculo no interior do *Dê*) corresponda a meio período de oscilação do campo eléctrico, isto é, ao tempo de inversão do campo eléctrico oscilatório. Este facto ou condição de funcionamento designa-se de *condição de ressonância* e permite aumentar a velocidade de cada ião cada vez que percorre o espaço entre os *Dês*. [7]

Para que ocorra a condição de ressonância é portanto necessário que exista igualdade entre a frequência do campo eléctrico alternado aplicado nos

eléctrodos e a frequência de revolução na trajectória circular, facto traduzido na designada *equação fundamental de ressonância do ciclotrão*: [7]

$$f = \frac{qB}{2\pi m}$$

Equação 7

em que B representa o módulo do vector do campo magnético, q a carga e m a massa do ião. Esta equação demonstra que para que um ião com uma determinada relação carga/massa aumente a sua energia cinética, isto é, seja acelerado é fundamental que se verifique uma interligação entre o valor do campo magnético e a frequência de oscilação do campo eléctrico aplicado aos eléctrodos, ou seja, frequência do ciclotrão. [7]

A existência da condição de ressonância no ciclotrão permite também que todos os iões com uma determinada carga/massa presentes na fonte no centro da câmara de vácuo, sejam acelerados. Quando se aplica um ciclo de radiofrequência, um grupo de iões depositados na fonte inicia a sua trajectória orbital, que incluirá uma série de revoluções e metros percorridos dependendo do valor do potencial acelerador sentido. Os iões que atingem o espaço entre os eléctrodos na fase do potencial de maior valor, continuarão a atravessar sempre na mesma fase e vão ser capazes de alcançar a energia máxima no menor número de revoluções. No entanto, os iões que atingem o espaço dos eléctrodos com o potencial acelerador noutras fases da mesma polaridade, vão alcançar aumentos de energias mais reduzidos sem deixarem de estar em ressonância, uma vez que a velocidade angular mantém-se constante. Estes são capazes de atingir o raio máximo e a correspondente energia, sendo que para isso terão de ser sujeitos a um maior número de revoluções. Assim é possível manter em ressonância um número considerável de partículas aceleradas por unidade de tempo. Todos estes aspectos podem ser demonstrados numa equação, que tem em conta a equação fundamental de ressonância do ciclotrão e a frequência de revolução. Esta permite comprovar a influência que o campo magnético (B) e o raio r da orbita do ião (com carga q e massa m) tem sobre a enérgica cinética que este pode adquirir, traduzindo-se da seguinte forma: [7]

$$E_c = \frac{1}{2} \frac{q^2}{m} B^2 r^2$$

Equação 8

Através desta equação podemos perceber a importância da implementação do ciclotrão com campo magnético (e correspondente frequência) e amplitude da tensão aplicada elevados. Deste modo, é possível obter energias cinéticas elevadas com aplicação de campos magnéticos na ordem do Tesla e conseqüentemente frequências na ordem de dezenas de MHz. Ainda é possível diminuir o número de revoluções dos iões a ser acelerados com o aumento da amplitude da tensão aplicada ao *Dés*, facto que possibilita reduzir a probabilidade de perda dos iões por colisão com átomos ou moléculas que possam estar presentes, uma vez que ao diminuir o número de revoluções a que são sujeitos reduz conseqüentemente o tempo da sua permanência no interior do ciclotrão. [7]

As considerações e os aspectos referidos sobre a condição de ressonância no ciclotrão não se podem aplicar em todos os casos com todo o tipo de iões, pois só são verdadeiros para iões ideais, que se deslocam no plano médio da câmara do ciclotrão, atingindo o espaço de aceleração num tempo ideal relativamente ao campo eléctrico. Em condições normais, o que se verifica são possíveis desvios da trajectória dos iões, tanto axial como radialmente, devido principalmente a uma posição descentrada da fonte de iões na câmara de vácuo e aos choques de dispersão que podem surgir nas primeiras órbitas da aceleração, local onde existe alguma concentração de moléculas residuais da fonte e onde os iões apresentam baixas energias. Deste modo, para se conseguir extrair iões com energias desejáveis é necessário aplicar uma focagem magnética do tipo axial e radial na órbita descrita por estas partículas. Esta componente de correção é primordial pois permite manter a trajectória das partículas estáveis e conseqüentemente atingir o objectivo chave do ciclotrão: acelerar partículas carregadas. [7]

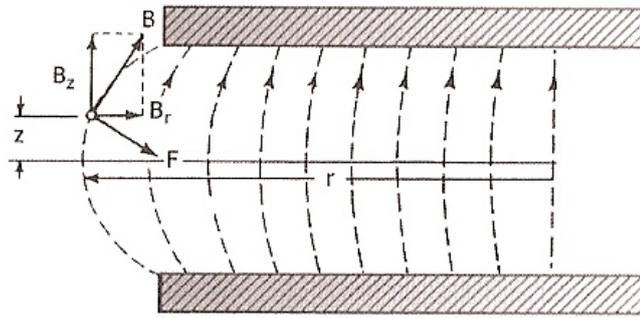


Figura 4. Ilustração dos tipos de focalização radial e axial de um campo magnético, que decresce consoante o aumento do raio do ciclotrão, e respectiva força resultante [7].

Capítulo 2 – Efeitos Radiobiológicos dos Neutrões e sua Aplicação

Radiação ionizante

As radiações ionizantes ao interagirem com organismos vivos vão provocar determinados efeitos biológicos como resposta para controlar a energia absorvida. A radiobiologia estuda todos os procedimentos que surgem após a absorção de energia proveniente das radiações ionizantes, os mecanismos de defesa do organismo para reparar os efeitos dessa absorção de energia e as conseqüentes lesões produzidas no organismo. [3]

Ao estudar os efeitos biológicos provocados no organismo após uma interação, é necessário considerar certos factores gerais: [3]

- A exposição das células a radiação não implica obrigatoriamente a ocorrência de alterações celulares, isto é, existe uma função de probabilidade de ocorrer ou não danos celulares.
- Não existe uma região preferencial da célula para ocorrer absorção de energia, pois a interação celular não é selectiva.
- A absorção de energia ocorre num reduzido período de tempo (da ordem de 10^{-17} segundos).
- As modificações observadas nas células, tecidos e órgãos após uma interação com radiação ionizante não são específicas, uma vez que não se consegue diferenciar de lesões originados por outros agentes.
- Existe um período de tempo ou período de latência entre o momento da irradiação e o aparecimento das primeiras lesões biológicas, que pode variar desde alguns minutos até anos, dependendo da dose inicial (tempo de latência varia inversamente com a dose de radiação recebida).

Quando a radiação interage com a matéria ocorre uma alteração nas suas características, alteração esta que depende do tipo de processo em que

ocorre absorção de energia, mais concretamente, por excitação ou ionização dos iões, activação nuclear ou pela produção de núcleos radioactivos (no caso dos neutrões). [8,9]

As manifestações biológicas que advém da interação da radiação num organismo vivo, são consequência de uma série de acontecimentos que se inicia pela ionização e excitação dos átomos e moléculas desse mesmo organismo. Estas manifestações podem ser traduzidas através de efeitos físicos (estão na base da ionização e excitação dos átomos e são responsáveis pela transmissão da energia da radiação pelas células), químicos (sucodem os físicos e provocam a quebra das ligações entre os átomos originando radicais livres), biológicos (advém dos físicos e químicos e são responsáveis pela alteração das funções específicas das células e pela diminuição da actividade da substância viva) e orgânicos (resulta da incapacidade de recuperação do organismo dos efeitos biológicos, principalmente quando a sua frequência é elevada), visíveis segundos ou anos após a interação. [3,8,9]

Organização global dos Seres Vivos

A constituição dos seres vivos pode ser organizada por diversos níveis hierárquicos que se inicia pelos átomos, unidade presente em toda a matéria, e termina no organismo/indivíduo. [10,11]

A matéria viva é constituída principalmente pelos átomos de carbono (C), hidrogénio (H), oxigénio (O) e nitrogénio (N). Através da união destes átomos, por meio de ligações químicas, é possível formar as moléculas mais simples necessárias para um ser vivo, como por exemplo a água (H₂O) , até às mais complexas como as proteínas, que contém centenas a milhares de átomos. Por conseguinte, a união de várias moléculas origina os organelos ou estruturas sub-celulares, como o retículo endoplasmático, complexo de Golgi, mitocôndrias, núcleo, etc., estruturas estas presentes no interior da célula, desempenhando funções específicas e fundamentais para a sobrevivência da célula. [10,11]

A célula caracteriza-se como a unidade básica da vida, sendo fundamental tanto ao nível estrutural como funcional para os seres vivos.

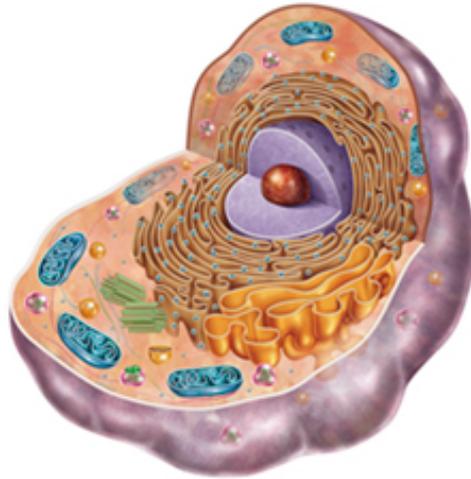


Figura 5. Desenho esquemático de uma célula eucariótica e respectivos componentes celulares [11]

Existem vários tipos de células que são classificadas consoante a sua função: células musculares, nervosas, hepáticas, gametas, etc. Através da união das células especializadas surge os tecidos, que estão presentes apenas em alguns organismos multicelulares, sendo que a função de cada tecido depende do tipo de células que o constitui. A união e organização dos tecidos origina os órgãos, que ao possuírem diversos tipos de tecidos são capazes de desempenhar funções bastante complexas. Consequentemente, a ligação entre os vários órgãos cria os sistemas, que estão aptos a exercer determinadas funções corporais, através do trabalho conjunto dos órgãos que o constituem. [10,11]

Por último, a união dos diversos sistemas forma o organismo ou indivíduo, como um animal ou planta. [10,11]



Figura 6. Esquema representativo da organização geral dos seres vivos, desde os átomos até ao indivíduo [12].

Efeitos Radiobiológicos em Organismos Vivos

Os efeitos radiobiológicos visíveis nos organismos advêm das alterações que ocorrem a nível molecular e que conseqüentemente vão provocar lesões a nível celular. Conseqüentemente, qualquer lesão celular pode afectar os tecidos, órgãos e todo o organismo, uma vez que todos estes constituintes estão intimamente ligados. Deste modo, é possível observar efeitos específicos em cada nível de hierarquização, como por exemplo:[8,12]

- Molecular: interferência no processo metabólico, lesões em macromoléculas;
- Celular: lesões nos constituintes celulares (organelos), inibição da divisão celular, morte celular e transformação para o estado maligno;
- Tecidos e Órgãos: falência ou lesões severas;
- Organismo: diminuição do tempo de vida, morte;

- População: alterações nas características genéticas, mutações cromossómicas.

A radiação ao interagir com as células que compõem o organismo vivo vai provocar um série de fenómenos físicos, químicos e biológicos. Esta interação pode ocorrer de forma directa ou indirecta, dependendo da estrutura alvo na qual incide. A acção directa da radiação incide directamente numa molécula importante da célula (como o DNA, proteínas, etc.) provocando a ionização desta e conseqüentemente alterando a sua estrutura. Este tipo de interação apresenta uma maior taxa de frequência em partículas de elevada transferência linear de energia (LET) e as lesões biológicas que origina são mais difíceis ou mesmo impossíveis de ser reparadas. A acção indirecta implica a absorção de energia pelo meio onde se encontram as moléculas. Assim, baseia-se na formação de radicais livres, isto é, estruturas que possuem apenas um electrão orbital não emparelhado tornando-as altamente reactivas, pois existe um elevada probabilidade do electrão se emparelhar com outro electrão (H^+ , OH^- , H_2O_2 , HO_2). Estas vão danificar o DNA da célula, sendo que resultam da irradiação de moléculas intermediarias, como o caso da água que é um componente muito abundante na célula (cerca de 85%), processo este designado de radiólise. Este tipo de interação ocorre maioritariamente com partículas de baixa transferência linear de energia (LET) e as lesões biológicas resultantes podem ser modificadas quimicamente. [8,13]

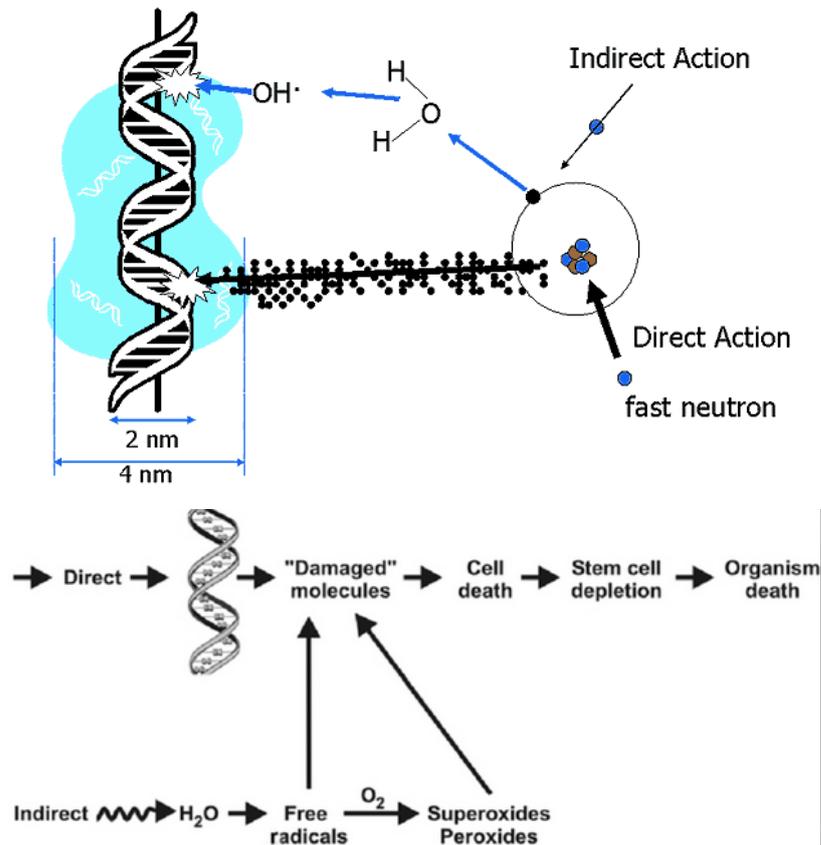


Figura 7. Esquema da interação de forma directa ou indirecta da radiação na célula e as suas possíveis consequências[12].

Ambos os tipos de interação da radiação com a célula podem danificar o seu DNA por quebra de apenas uma das suas cadeias, originando várias lesões antes de rompê-la, ou por ruptura de ambas as cadeias. Deste modo, a alteração estrutural, a eliminação das bases, a quebra das pontes de hidrogénio entre 2 hélices, a rotura de uma ou duas cadeias e as ligações cruzadas entre moléculas de DNA e proteínas são os efeitos possíveis da radiação. [8,13]

Resumidamente, quando a radiação interage com o DNA, directa ou indirectamente, ao depositar a sua energia vai provocar danos nesse componente celular. As células possuem um mecanismo de reparação quando são lesadas, no entanto esse mecanismo pode ser eficaz, ineficaz ou incorrecto. Caso seja eficaz, o DNA é reparado correctamente e a célula fica normal e viável, enquanto numa reparação ineficaz ou incorrecta o DNA sofre mutação, resultando numa célula mutada viável ou em morte celular por apoptose. Dependendo do tipo de célula que sofreu mutação, isto é, se foi

uma célula somática ou germinativa, as consequências serão diferentes, uma vez que na primeira podem surgir malformações, indução de cancro ou envelhecimento precoce, enquanto que na segunda as doenças resultantes são hereditárias. [3]

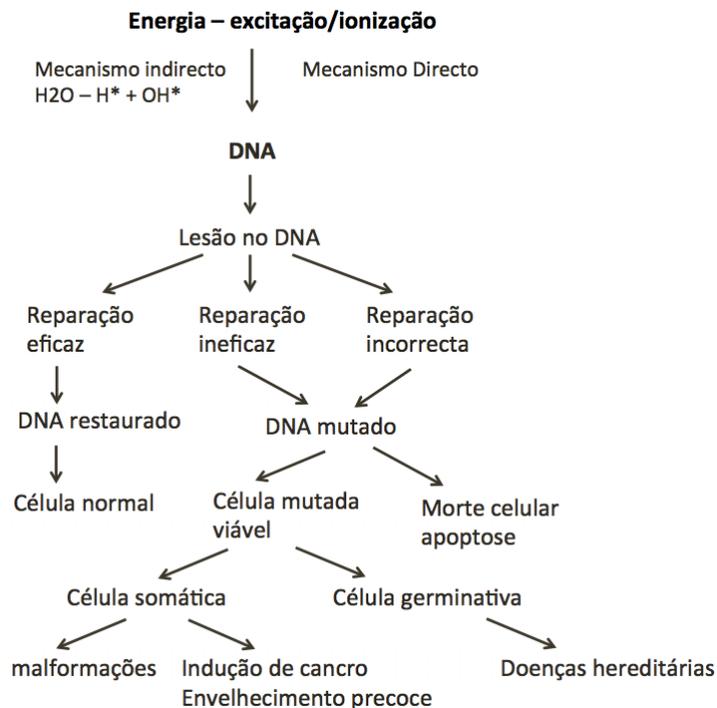


Figura 8. Esquema simplificado dos mecanismos de interação e das consequências biológicas da radiação ionizante [12].

Um exemplo do efeito da radiação num organismo vivo (ser humano) é o designado Síndrome Agudo das Radiações, que segundo Bitelli corresponde ao conjunto de sintomas e sinais clínicos originados num curto período de tempo após irradiação. Este síndrome baseia-se em distúrbios funcionais e orgânicos e afecta quase todos os sistemas do organismo. Os seus principais sintomas traduzem-se em alterações hematológicas, ou seja, nos componentes celulares como consequência da modificação das células precursoras hematopoiéticas e células-tronco da medula óssea, distúrbios de comportamento, alterações gastrointestinais devido à lesão das células intestinais e invasão bacteriana da mucosa e sintomas neurológicos como apatia, convulsões, entre outros.[14]

Tabela 1. Efeitos de uma Radioexposição aguda num ser humano. [14]

FORMA	DOSE ABSORVIDA	SINTOMATOLOGIA
Infraclínica	Inferior a 1Gy	Ausência de sintomatologia na maioria dos indivíduos
Reacções gerais leves	1 – 2Gy	Astenia, náuseas, vômitos (3 a 6 horas após a exposição)
Hematopoiética leve	2 – 4Gy	Função medular atingida: linfopenia, leucopenia, trombopenia, anemia
Hematopoiética grave	4 – 6Gy	Função medular gravemente atingida
Gastrointestinal	6 – 7Gy	Diarréia, vômitos, hemorragias (morte em 5 ou 6 dias)
Pulmonar	8 – 9Gy	Insuficiência respiratória aguda, coma e morte entre 14 a 36 horas
Cerebral	Superior a 10Gy	Morte em poucas horas por colapso

Classificação dos Efeitos Biológicos

Consoante o tipo de factor considerado, existem várias formas de classificar a radiação, ou seja, é possível classificar a radiação segundo a dose absorvida, o nível da lesão e o tempo de manifestação.[3,8]

Considerando a dose absorvida, os efeitos da radiação podem se dividir em estocásticos e determinísticos. No primeiro os efeitos induzem a transformação celular, devido principalmente à alteração aleatória no DNA de uma célula que continua a se reproduzir e caso ocorra numa célula germinativa pode-se verificar efeitos genéticos e hereditários, como mutações genéticas e cromossómicas. O efeito estocástico não apresenta limiar de dose, uma vez que a lesão pode resultar de uma dose mínima de radiação, sendo que a severidade é constante e independente da dose. Além disto, neste efeito a probabilidade de ocorrência é em função da dose e as suas consequências são difíceis de serem medidas experimentalmente, uma vez que apresenta um longo período de latência. No segundo efeito ocorre morte celular e existe um limiar de dose, pois as lesões só surgem a partir de uma

determinada dose. Neste caso, a probabilidade de ocorrência e a gravidade da lesão estão directamente relacionadas com o aumento da dose, e normalmente as consequências deste efeito surgem num curto intervalo de tempo. [3,8]

Classificando de acordo com o nível da lesão, existem dois tipos de efeitos: os efeitos somáticos e os efeitos hereditários. Como o nome indica, o primeiro surge de lesões que advêm das células somáticas, ou seja, só afecta o organismo exposto à radiação não sendo transmitido às futuras gerações. A severidade destes efeitos dependerá apenas da dose recebida na região atingida, pois as diferentes regiões do corpo do organismo reagem de diferentes formas à radiação. Os efeitos hereditários são os efeitos transmitidos de geração em geração, pois são consequência da irradiação das células reprodutoras do organismo, resultando assim em malformações ou defeitos em descendentes. [3,8]

De acordo com o tempo de manifestação, podem ser classificados em imediatos e tardios, sendo uma subdivisão dos efeitos somáticos. Os efeitos imediatos são os que surgem após horas ou semanas de uma exposição aguda, enquanto os tardios aparecem depois de anos ou mesmo décadas da exposição, sendo por isso mais difíceis de distinguir quanto à sua patologia. [3,8]

Conceitos utilizados em Radiação

Doses equivalentes de diferentes tipos de radiação não produzem necessariamente efeitos biológicos quantitativamente similares, sendo a diferença o padrão de deposição da energia da radiação. Neste sentido, são utilizados alguns conceitos capazes de descrever a qualidade, a capacidade de transferência de energia e a eficácia da radiação na produção de lesões no organismo.[8,9,13]

Transferência Linear de Energia (LET)

A transferência linear de energia define-se como a energia transferida por unidade de comprimento de percurso, expressa em keV/ μm . Deste modo,

com o aumento da intensidade da ionização, aumenta a probabilidade de deposição de energia directamente na molécula biológica e consequentemente de ocorrer lesão celular. [8,9,13]

O valor de LET de uma radiação está directamente relacionada com a probabilidade de existir lesão biológica, pois quanto maior o LET, maior é a possibilidade de haver interação biológica, resultando numa lesão a nível celular. [8,9,13]

Os diferentes tipos de radiações apresentam distintos valores de LET, mais precisamente, as radiações electromagnéticas apresentam valores reduzidos de LET e consequentemente baixa frequência de produção de ionizações ao longo do seu percurso, razão pela qual se designam de esparsamente ionizantes. Por outro lado, as radiações corpusculares, como as partículas alfas e neutrões, demonstram elevados valores de LET, o que as torna densamente ionizantes e mais efectivas em termos de efeitos biológicos produzidos por unidade de dose. [8,9,13]

Eficácia Biológica Relativa (RBE)

A eficácia biológica relativa permite saber o índice da eficiência da radiação ao produzir uma determinada resposta biológica, ou seja, compara a dose da radiação em estudo com uma dose padrão de radiação convencional, capaz de produzir a mesma resposta biológica.

$$RBE = \frac{\text{dose em rads de raios X de 250keV para produzir um efeito}}{\text{dose em rads da radiação em estudo para produzir o mesmo efeito}}$$

Equação 9

A RBE descreve quantitativamente o efeito relativo de LET, uma vez que varia directamente com este. Neste sentido, quanto maior for o valor de LET maior é o valor de RBE e maior é o efeito biológico provocado no meio, uma vez que maior é a transferência de energia para o meio. Radiações de baixo LET apresentam baixa RBE, enquanto que radiações de elevado LET possuem elevada RBE.[8,9,13]

Existem alguns factores capazes de influenciar a RBE, nomeadamente, o tipo de radiação, a célula e o tipo de tecido, a condição fisiológica, o efeito biológico em estudo e a taxa de dose da radiação.[8,9,13]

Relação de Enriquecimento em Oxigénio (OER)

A relação de enriquecimento em oxigénio traduz numericamente o efeito oxigénio, isto é, os tecidos do organismo são mais susceptíveis à radiação em condições aeróbicas do que em hipóxia.

$$OER = \frac{\text{dose que produz um dado efeito sob condições anóxicas}}{\text{dose que produz o mesmo efeito em condições aeróbicas}}$$

Equação 10

Deste modo, a resposta dos tecidos à radiação é dependente da quantidade de oxigénio presente, uma vez que este elemento é necessário para a produção de radicais livres durante a ionização da água, os quais induzem a formação de peróxido de hidrogénio (sem oxigénio a lesão celular é pequena). [8,9,13]

A OER é dependente de LET, sendo maior para radiações de baixo LET e menos eficaz para radiações de elevado LET. Este factor é muito importante em oncologia, pois no caso de tumores existe um aumento da proliferação celular e conseqüentemente um baixo teor de oxigénio, tornando as células resistentes à radiação de baixo LET mas menos resistentes à radiação de elevado LET. Por outro lado, na presença de uma massa tumoral e da conseqüente elevação da proliferação celular, a distância média entre capilares também aumenta, resultando em hipóxia numa parte das células e em anóxia noutras, provocando a inactivação e constituindo uma área de necrose. Após a irradiação, ocorre a inactivação principalmente nas células oxigenadas, uma vez que os efeitos nas células hipóxicas são menores devido a estas serem mais radorresistentes. Como a inactivação das células próximas do capilar facilita a difusão de oxigénio, pois deixa de ser consumido neste local, as células hipóxicas sofrem reoxigenação. Quando o seu percentual atinge um nível mínimo, uma segunda dose de radiação é

Efeito da exposição de neutrões no desenvolvimento do organismo *Caenorhabditis Elegans*

aplicada repetindo-se um novo ciclo, porém desta vez com um menor número de células, sendo uma das vantagens do fracionamento de dose. [8,9,13]

Grandezas e unidades Radiológicas

Dose Absorvida (D)

A dose absorvida corresponde à energia absorvida por unidade de massa que advém de todas as interações, sendo definida matematicamente como: [15]

$$D = \frac{dE}{dm}$$

Equação 11

Sendo E a energia total absorvida pelo volume de massa m. A sua unidade no Sistema Internacional é Gray (Gy), podendo também ser expressa em *rad* (*Radiation Absorbed Dose*): [15]

$$1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg} = 100 \text{ rad}$$

Dose Equivalente (H_t)

A dose equivalente (H_t) é uma grandeza que indica a dose de radiação num tecido, permitindo relacionar os efeitos biológicos dos vários tipos de radiação. [15]

A unidade correspondente no Sistema Internacional é Sievert (Sv): [15]

$$1 \text{ Sv} = 1 \text{ J/kg} = 1 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-2}$$

A dose equivalente pode ser obtida pela seguinte equação: [15]

$$H_t = w_r D_{t,r}$$

Equação 12

em que w_r representa o factor de ponderação para cada tipo de radiação r e $D_{t,r}$ a dose absorvida pelo tecido t e irradiada pela radiação r. [15]

Tabela 2. Factores de ponderação da radiação, w_r , segundo as recomendações da ICRP de 2007 (ICRP Publication 103), publicação em que a legislação nacional se baseia. [15]

Tipo de Radiação	Factor de ponderação da radiação ICRP 60
Fotões	1
Electrões e muões	1
Neutrões	Curva contínua como função de energia dos neutrões (5 a 20)
Protões (>2MeV)	5
Partículas alfa, fragmentos de fissão e núcleos pesados	20

Factores que influenciam o efeito da Radiação

A radiação ionizante afecta qualquer tipo de célula do organismo exposto, sendo que cada célula apresenta uma radiosensibilidade própria. A radiosensibilidade celular corresponde ao grau e velocidade de resposta dos tecidos à irradiação. Existem um conjunto de factores que vão influenciar o efeito da radiação na célula, nomeadamente factores físicos, químicos e biológicos. [3,8,16]

Os factores físicos baseiam-se na dose, taxa de dose e fracionamento de dose, no tipo de radiação (LET e RBE) e se a exposição é aguda ou crónica. Os três primeiros factores são fundamentais para o tratamento oncológico, pois o fracionamento da dose permite reduzir os seus efeitos quando aplicada de uma só vez, facto explicado pela existência dos mecanismos de reparação que neste caso ainda conseguem funcionar no período decorrido entre as exposições. [3,8,16]

Os factores químicos são agentes modificadores que estão relacionados com a presença ou não de antioxidante, com o teor hídrico e com a tensão de oxigénio (O_2). Este último corresponde ao designado efeito O_2 , que indica que um sistema biológico é mais radiosensível quando irradiado na presença de oxigénio do que na sua ausência, como explicado anteriormente. [3,8,16]

Os factores biológicos referem-se ao estado proliferativo (Lei de Bergonie e Tribondeau), à fase do ciclo celular e ao estado fisiológico ou metabólico da célula. Bergonie e Tribondeau, em 1906, concluíram que células imaturas que se dividem apresentam maior alteração com a radiação que as células maduras diferenciadas que não se dividem. Após esta observação, elaboraram uma lei que se traduz da seguinte forma: “A radiosensibilidade das células é directamente proporcional à sua capacidade de reprodução e indirectamente proporcional ao seu grau de especialização” (equação 13). [3]

$$\text{Radiosensibilidade celular} \propto \frac{\text{actividade mitótica}}{\text{grau de especialização}}$$

Equação 13

Deste modo e interpretando a lei, as células estaminais tornam-se mais sensíveis à radiação do que as células diferenciadas, pois quanto mais diferenciada for a célula maior a sua radiorresistência. Do mesmo modo, tecidos e órgãos jovens são mais radiosensíveis que os tecidos e órgãos velhos e quanto maior a actividade metabólica da célula e a taxa de proliferação e de crescimento dos tecidos, maior a radiosensibilidade. [3]

A fase do ciclo celular também influencia o efeito da radiação na célula, sendo que: [8,16]

- Fase mitótica bastante sensível
- Fase S muito resistente
- Fase G1 inicia a diminuição da resistência
- Fase G2 muito sensível

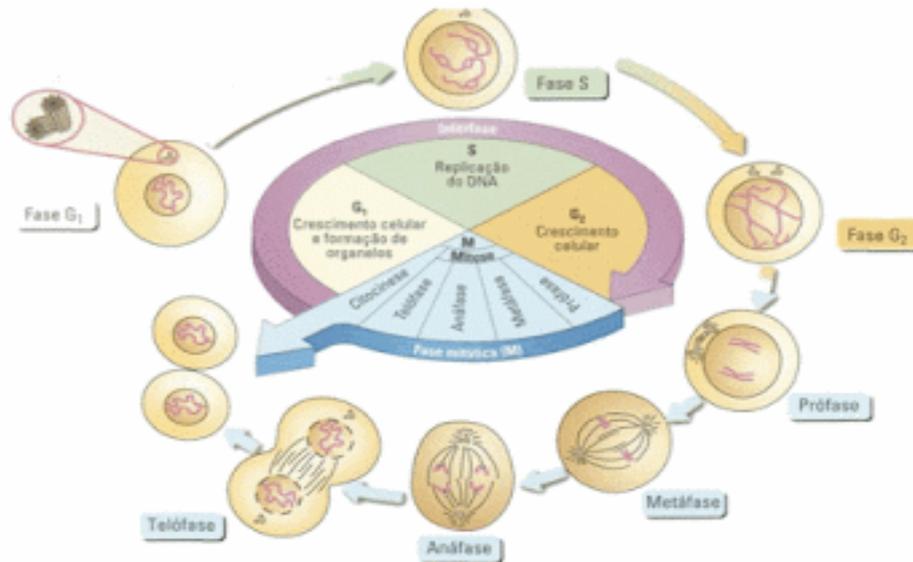


Figura 9. Organização do ciclo celular numa célula eucariótica [11].

A constituição genética da célula é outro factor biológico a ser considerado numa irradiação. O DNA é constituído por quatro bases nitrogenadas (adenina, timina, citosina e guanina), sendo que a radiosensibilidade varia consoante a sua composição, ou seja, esta aumenta em função do aumento de adenina-timina no DNA. Além disto, a sensibilidade desta estrutura quando em dupla hélice é diferente da visualizada quando se apresenta numa fita única. Este facto pode ser explicado pela possibilidade de preservação da informação genética, graças à dupla hélice, pois possui um papel muito importante na actuação dos mecanismos de reparação. Por último, outro aspecto capaz de alterar a radiosensibilidade no DNA é a sua interação com as proteínas intracelulares, sendo benéfico ou não. Estas proteínas tanto podem proteger o DNA, quando actuam como aceptoras de radicais livres, como podem provocar condições reactivas e tóxicas para as células. [8,16]

Terapia por Radiação de Neutrões

Actualmente, o cancro é uma das principais causas de morte a nível mundial, rondando os 13%. Esta patologia caracteriza-se por um aumento descontrolado de células ultrapassando os limites normais, podendo invadir e destruir os tecidos adjacentes e afectar órgãos distantes por metastização.

Neste sentido, todas as terapias adoptadas para esta condição têm como objectivo principal matar as células cancerosas preservando as células saudáveis, sendo a sua escolha dependente das características do tumor. Porém, nem sempre os tratamentos mais comuns têm sucesso, como a cirurgia, a quimioterapia e radioterapia, uma vez que estes podem não ser sensíveis a radiação por fotões, não responderem positivamente a químicos por apresentarem uma elevada reprodução ou se localizarem em regiões anatómicas complicadas ou inacessíveis. De modo a superar estas dificuldades, têm vindo a ser estudadas novas alternativas terapêuticas, como o uso de Radiação por Neutrões. [17,19]

As terapias por uso de neutrões aplicadas actualmente são essencialmente duas: Terapia de Captura de Neutrões pelo Boro (BNCT) e Terapia por Neutrões Rápidos (FNT), sendo a primeira mais empregada.[17,19]

Terapia de Captura de Neutrões pelo Boro (BNCT)

A BNCT baseia-se no princípio de deposição de ^{10}B nas células tumorais seguido de irradiação de neutrões térmicos, produzindo deste modo partículas ionizantes altamente tóxicas para a célula. [17]

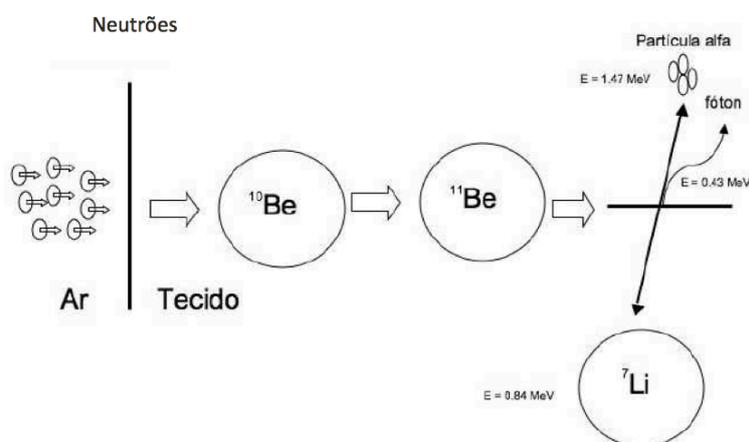
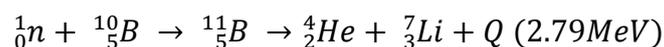


Figura 10. Ilustração do mecanismo da BNCT – interação do ^{10}B com o neutrão de baixa energia e o posterior decaimento do ^{11}B numa partícula alfa (^4He) e num núcleo de ^7Li com libertação de 2,729 MeV de energia [19].

Este tipo de terapia é considerado um tratamento binário que utiliza dois componentes controlados separadamente, com o intuito de destruir as células tumorais sem danificar o tecido saudável vizinho. [3,18]

O composto intravenoso ^{10}B , isótopo natural não radioactivo, é um componente que possui uma tendência a se acumular em células cancerígenas sendo por isso utilizado na BNCT. Após a sua administração, é aplicado um feixe de neutrões com espectro de energia epitérmico que, através da captura de uma destas partículas, torna o boro num isótopo instável e radioactivo (^{11}B). Posteriormente, ocorre o decaimento deste novo isótopo por fissão nuclear, originando duas partículas: uma partícula alfa (carregada) e com maior poder de ionização (1,47MeV) e um átomo de Lítio (^7Li - neutro) com energia cinética de recuo suficiente para ionizar as moléculas (0,84MeV). Ambas as partículas apresentam um alcance de aproximadamente o diâmetro de uma célula, com a energia necessária para destruir as células tumorais por interações atómicas como a ionização. Deste modo, as células saudáveis não são destruídas pois além de apenas possuírem uma quantidade mínima ou mesmo nenhuma deste composto, o alcance das partículas originadas na ionização é curto, sendo 8,8mm para a partícula alfa e 4,8mm para o átomo do ^7Li (equação 14) .[3,19]



Equação 14

O composto químico ou fármaco utilizado na BNCT tem como base o ^{10}B . A sua importância reside no facto de poder se formar compostos não radioactivos e quimicamente inofensivos ao organismo. Além disto, ainda apresenta uma elevada secção de choque para a absorção de neutrões lentos e para os restantes elementos que compõem o tecido corporal (hidrogénio, carbono e oxigénio) a secção de choque é cerca de mil vezes maior. Assim, é bastante importante que o diferencial de concentração do ^{10}B no tecido saudável relativamente ao tecido tumoral seja elevado, de modo a danificar apenas as células cancerígenas protegendo as normais. [3,19]

O feixe de neutrões que vai irradiar os tecidos provém de um reactor que deve ter uma colimação e um filtro adequado. Para obter os resultados

desejáveis, é fundamental que o espectro de energia dos neutrões incidentes permita que estes obtenham uma penetração adequada nos tecidos e evite doses indesejáveis nas regiões saudáveis. Neste sentido, a escolha de energia deve residir nos neutrões epitérmicos, uma vez que produzem maior penetração (ideais para tumores profundos) e nos neutrões térmicos caso se trate de tumores superficiais, pois além de apresentarem reduzidos efeitos radiobiológicos penetram apenas alguns centímetros (não são adequados a tumores profundos porque iriam induzir elevadas doses na pele e tecidos superficiais e podiam não conseguir alcançar o tumor). [3,18]

Resumindo, o processo físico que ocorre na BNCT baseia-se em reacções nucleares do tipo $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$, resultando partículas pesadas e altamente energéticas. No entanto, a dose física absorvida não advém apenas desta reacção, sendo verdadeiramente uma combinação complexa de vários efeitos que ocorrem no tecido. Sendo assim, a dose total fornecida nesta técnica resulta de quatro principais componentes, tais como:[3,19]

- os raios gama que acompanham os feixes de neutrões (interagem com os tecidos por efeito fotoeléctrico ou efeito de Compton),
- neutrões térmicos que são capturados pelo nitrogénio resultando na emissão de um protão ($^{14}\text{N}(n,p)^{14}\text{C}$), que vai depositar a sua energia no tecido, juntamente com a energia de recuo do núcleo de ^{14}C ,
- o boro que vai sofrer reacções de fissão, sendo a reacção principal e a desejada nesta terapia,
- neutrões rápidos que podem reagir com o hidrogénio por $^1\text{H}(n,n)p$, em que ocorre a transferência de energia de recuo do protão no tecido.

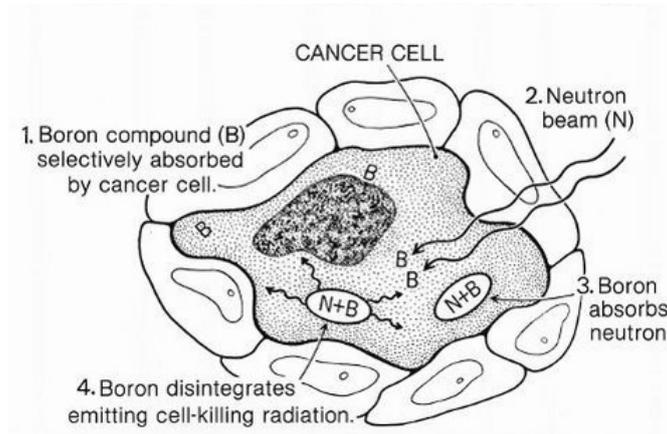


Figura 11. Desenho esquemático dos mecanismos da BNCT numa célula cancerígena. [18]

Terapia por Neutrões Rápidos (FNT)

A Terapia por neutrões rápidos é um tipo de radioterapia com uma taxa de eficácia significativa, que se baseia no uso de neutrões rápidos (de elevada energia) produzidos por aceleradores. [20]

A importância deste tipo de terapia reside nos efeitos radiobiológicos que produz, nomeadamente, na sua capacidade de matar de forma eficiente as células que estão em hipóxia, originando lesões celulares irreparáveis e produzindo uma toxicidade consistente durante todo o ciclo reprodutivo celular. [20]

Sendo os neutrões um tipo de radiação de elevado LET, as lesões celulares produzidas advêm principalmente das interações nucleares, diminuindo a probabilidade de reparação celular. Neste sentido, uma das grandes vantagens da radiação de elevado LET está associado ao designado efeito de oxigénio. Devido à rápida proliferação celular presente nos tumores, o suprimento sanguíneo no centro deste é reduzido, tornando as células neste local desprovidas de oxigénio. Nesta condição, estas células ficam resistentes a radiação de baixo LET mas menos resistentes a radiação de elevado LET, como os neutrões. Uma vez que a RBE da terapia por neutrões é elevada, a dose necessária a aplicar e o número de irradiações precisas são bastantes menores comparativamente com outros tipos de radiação. [21]

Capítulo 3 – *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo

Características Gerais

O *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) é um pequeno nemátoda do solo (cerca de 1 mm de comprimento), de vida livre não parasitante, existente em muitas partes do mundo. [22]



Figura 12. *Caenorhabditis elegans* em NGM (agar) através de microscopia óptica [22].

Em adultos, o seu organismo apresenta ser bastante simples, quer anatomicamente quer geneticamente, sendo constituídos por 959 células somáticas, das quais 302 são neurónios, no caso de hermafroditas, e por 1031 células somáticas, sendo 381 neurónios, no caso de machos. Deste modo, é possível observar a existência de dois sexos na sua população: hermafroditas na sua maioria e machos, correspondendo apenas cerca de 0,2%. Anatomicamente, observam-se algumas diferenças, sendo que os primeiros são organismos protândricos, produzindo tanto oócitos como espermatozoides e reproduzem-se por auto-fertilização, enquanto os segundos produzem apenas espermatozoides. Quando a reprodução ocorre por auto-fertilização, os hermafroditas conseguem produzir cerca de 300 descendentes, no entanto, se for por fertilização cruzada, isto é, se um macho fertilizar um hermafrodita, o número de descendentes aumenta para cerca de 1200-1400. [22,23]

- Relativa facilidade de manutenção em laboratório e período de embriogénese rápido, sendo cultivado em placas de Petri com *Agar, Nematod Growth Medium* (NGM) e tendo como fonte de alimentação uma estirpe não patogénica de bactérias (*E.coli*).
- Organismo completamente transparente, o que possibilita uma fácil observação de todos os processos inerentes ao seu desenvolvimento, assim como estudar a sua anatomia. Esta característica também permite distinguir os hermafroditas dos machos, pois a morfologia da região da cauda é diferente nos dois sexos (existindo dois sexos é possível ocorrer reprodução por auto-fecundação ou fecundação cruzada).
- O número de células somáticas mantêm-se sempre constante e apresenta um genoma relativamente pequeno (10^8 bq), quando comparado com o genoma humano (2,91 Gb), estando todo sequenciado.
- É um nemátoda eucariota, o que significa que está sujeito a um processo de desenvolvimento complexo (embriogénese, morfogénese e crescimento de um adulto). Deste modo, as informações biológicas recolhidas, podem ser aplicáveis a outros organismos mais complexos, como o ser humano.

Anatomia

Anatomicamente, o *Caenorhabditis elegans* apresenta dois tubos, um exterior e um interior, separados por um espaço pseudo-celoma, o que corresponde a um plano corporal típico de um nemátoda. O tubo exterior contém uma cutícula situada por cima da hipoderme e um conjunto de neurónios e músculos, enquanto o tubo interior engloba a faringe, intestino e as gónadas. Esta disposição dos tecidos é mantida através de uma pressão hidrostática interna, que é controlada por um sistema osmoregulador.[22]

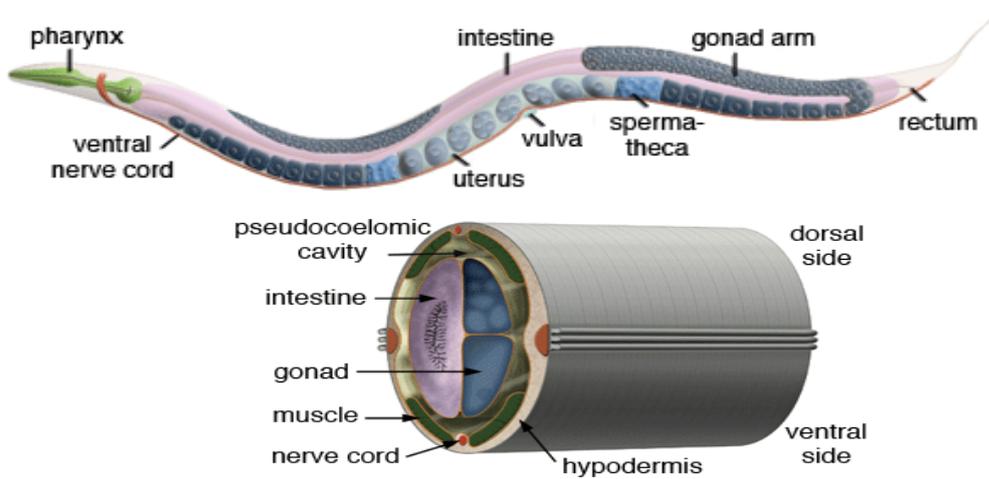


Figura 14. Anatomia de *C.elegans* no global e numa secção transversal do corpo [22].

A superfície externa do nemátoda engloba uma cutícula de colagénio, que permite o proteger do meio exterior e possibilita manter a sua forma, uma vez que actua como um esqueleto externo. Outra característica importante, é a sua contribuição para a motilidade do nemátoda, pois a locomoção baseia-se na transmissão da força contráctil dos músculos da parede do corpo para a cutícula. Ao longo das fases larvares do *C.elegans*, esta estrutura é regenerada, surgindo uma nova cutícula que corresponde às novas necessidades no nemátoda, permitindo deste modo o seu crescimento. Também é através desta estrutura que vários tecidos conseguem comunicar com o meio exterior, mais precisamente a faringe, o poro excretor, a vulva e o ânus, tendo cada um deles um papel importante na sobrevivência do nemátoda.[22]

O sistema nervoso do *C.elegans* está distribuído pela cabeça do nemátoda, em torno da faringe, pela linha média ventral, terminando na cauda. Este encontra-se dividido em dois sistemas independentes, nomeadamente, sistema nervoso somático de grandes dimensões e sistema nervoso da faringe de pequenas dimensões, que comunicam através de um único par de interneurónios. [22]

O sistema muscular é constituído principalmente por células musculares oblíquas e estriadas, que se organizam em quatro bandas, duas dorsais e duas ventrais, dispostas ao longo do comprimento do corpo do nemátoda.[22]

O *C.elegans* possui um sistema digestivo composto por três partes: faringe, intestino e intestino grosso. A faringe é uma estrutura bilobada, que absorve os alimentos como uma “bomba”, esmagando-os. Apresenta o seu próprio sistema neuronal, muscular e epitélio, quase funcionando como um órgão autónomo. Na sua porção mais anterior, encontra-se ligada à cavidade bucal, enquanto que a porção posterior está em contacto com o intestino através de uma válvula intestinal faríngea, servindo assim de canal para transportar os alimentos recolhidos do meio. O intestino é um tubo constituído por duas filas de oito células e por um anel anterior de quatro células que contorna o lúmen central. Esta estrutura termina perto da cauda do nemátoda, conectando-se ao ânus através de uma válvula intestino-rectal. O intestino grosso corresponde à última parte do sistema digestivo, que engloba o recto e o ânus e tem como função expelir o conteúdo do intestino para o meio exterior.[22]

O sistema reprodutivo nestes nemátodas varia entre os hermafroditas e os machos, apresentando estruturas e componentes distintos entre eles. Nos hermafroditas este sistema apresenta dois lóbulos dispostos simetricamente, tendo cada um deles as gónadas, estando um localizado mais anteriormente e o outro mais posteriormente, sendo o eixo de simetria perpendicular ao centro do nemátoda. Deste modo, cada lóbulo está disposto em forma de “U”, com um ovário mais distal, um oviduto e uma espermoteca mais proximal. Os ovários são órgãos sinciciais, que segregam núcleos germinativos através das membranas que envolvem o núcleo citoplasmático central. Estes deslocam-se proximalmente no sentido do útero, sendo os primeiros núcleos mitóticos, que depois progridem para a prófase meiotica, terminando no oviduto na fase de diaquinesis.[22]

Nos *C.elegans* machos o sistema reprodutor consiste numa gónada com um único lóbulo em forma de “J”, e que termina na cloaca perto da cauda. Após a produção dos espermátides maduros durante a espermatogénese, estes são armazenados na vesícula seminal, onde posteriormente são libertados (durante a cópula) através dos vasos deferentes até à cloaca. Outra diferença primordial é o formato da cauda, que se apresenta em forma de coroa raiada com 18 raios sensoriais. A passagem dos espermatozoides para o hermafrodita faz-se através desta estrutura, que

possui na sua base dois espículos que vão ser inseridos na vulva durante a cópula, permitindo assim esta passagem. [22]

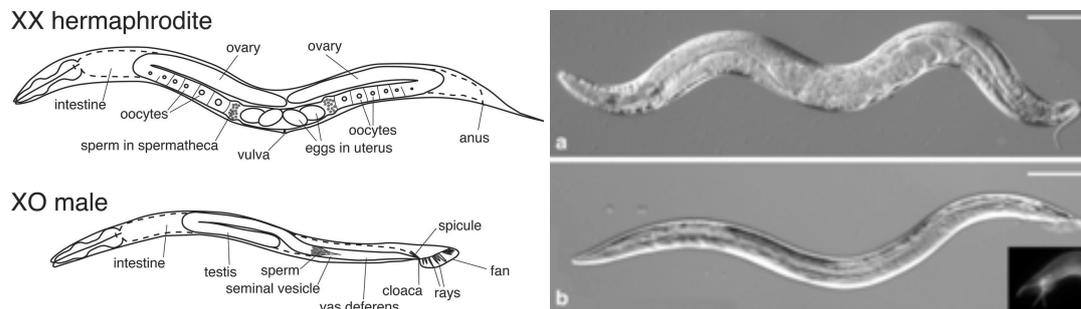


Figura 15. Desenho ilustrativo e imagem de microscópico óptico de *C.elegans* Hermafrodita (superior) e Macho (inferior) [28]

Genoma do *C.elegans*

O *C.elegans*, organismo multicelular, possui uma característica muito atractiva, nomeadamente, o facto de o seu genoma (10^8 bq) estar totalmente sequenciado. Este é composto por seis cromossomas sendo 5 pares autossomas, designados por I, II, III, IV e V, e um par sexual, X. A diferença entre nemátodos hermafroditas ou machos reside no número de cromossomas X que estes possuem, isto é, se estiver presente dois cromossomas X (XX) estamos perante um nemátodo hermafrodita, se existir apenas um cromossoma X (X0) é um nemátodo macho. Estes últimos estão presentes apenas em 0,2% da população, sendo muito mais frequente a existência de hermafroditas.[22,25]

Fertilização e Gametogénese

A fertilização nos *C.elegans* engloba a passagem dos oócitos maduros pela espermateca, estrutura que armazena os espermatozoides. Estes podem ser originados pela espermatogénese do próprio hermafrodita, ou então podem provir do cruzamento com machos, que introduzem os espermatozoides no hermafrodita. [22]

Após a maturação dos oócitos, inicia-se o processo de ovulação, processo este que vai estimular a dilatação da espermateca mais próxima, resultando na penetração do espermatozoide no oócito, sendo portanto, fertilizado. De seguida, o embrião dirige-se para o útero através da válvula espermateca-uterina, local onde estará sensivelmente 3 horas, para posteriormente ser expelido pela vulva. Durante o período em que se encontra no útero, o embrião torna-se impermeável à maior parte dos solutos, uma vez que é formado uma rígida “casca” de quitina e membranas vitelínicas, provenientes de componentes existentes no interior do ovo, tornando o embrião capaz de sobreviver fora do útero. [22,24]

Após a fase de fertilização inicia-se a embriogénese, sendo esta responsável por todo o processo de desenvolvimento do nemátoda que perdura até à eclosão ovo. Posteriormente à eclosão, é libertado um jovem verme que irá ser sujeito a 4 fases larvares (L1, L2, L3, L4), denominadas por desenvolvimento pós-embrionário de duração superior à embriogénese. Na última fase deste desenvolvimento, mais precisamente na fase L4, é finalizado a gonadogénese, processo este que se inicia 7 horas após a eclosão e permite a formação das gónadas. Neste processo, as células germinais vão ser submetidas a meiose e diferenciação em cada braço das gónadas, produzindo deste modo cerca de 150 espermatozoides maduros, que irão posteriormente serem armazenados na espermateca. Para ocorrer esta produção é necessário a expressão do gene *fog-1*, pois caso este não esteja presente ou sofra alguma mutação não são produzidos os espermatozoides. Após a muda da cutícula em L4 e no caso de hermafroditas, a meiose e a diferenciação passam a formar apenas ovócitos, uma vez que termina a produção de esperma. Nos nemátodas machos, a produção de espermatozoides perdura durante toda a sua vida reprodutiva, tornando-se férteis após a muda de L4. [22,23,24]

Desenvolvimento embrionário – Embriogénese

Embriogénese é o processo compreendido entre a fertilização e o desenvolvimento pós-embrionário dos nemátodas, sendo relativamente

rápido, uma vez que perdura em média 12 horas à temperatura de 25°C. Este processo baseia-se numa série de divisões assimétricas do zigoto, em que uma célula origina duas células filhas de diferentes tamanhos, pois uma é visivelmente maior que a outra.[26]

O desenvolvimento embrionário do *C.elegans* engloba três fases distintas, nomeadamente, a segmentação ou clivagem, a gastrulação e organogénese.[26]

Na segmentação ou clivagem ocorre a primeira divisão assimétrica ou clivagem holoblástica rotativa do ovo-zigoto, 35 minutos após a fertilização. Durante este processo, cada divisão assimétrica origina uma célula fundadora (AB, MS, E, C e D), capaz de produzir descendentes diferenciados, e uma célula estaminal (linhas P1-P4). Na primeira divisão celular, o sulco de clivagem situa-se assimetricamente ao longo do eixo anterior-posterior do ovo, perto do futuro pólo posterior. Nesta fase, a célula mãe origina duas células filhas de distintos tamanhos, sendo a maior designada por AB, célula fundadora anterior, enquanto a de menores dimensões de P1, célula estaminal posterior. Após esta primeira divisão (cerca de 10 minutos), a célula fundadora torna-se a dividir equatorialmente, criando duas células ABa e ABp, que compõem o pólo anterior e posterior do embrião, respectivamente. A célula P1 também se volta a dividir transversalmente e cerca de 3 minutos depois da célula AB, formando outra célula fundadora (EMS) e uma célula estaminal posterior (P2). Posteriormente a estes processos e ainda durante a fase de segmentação, surgem novas divisões assimétricas que vão possibilitar a formação de novas células fundadoras e de células da linha germinativa. Enquanto as primeiras são responsáveis pela origem de determinados tecidos presentes no *C.elegans* adulto, facto comprovado pela análise da linhagem das células durante a embriogénese, as segundas são células precursoras das gónadas deste verme. [22,24,26]

A gastrulação, segunda fase no processo de embriogénese, consiste na conclusão da proliferação da maioria das células e no início do processo de diferenciação celular. Esta fase neste nemátoda começa 10 minutos após a primeira divisão, ou seja, após a fase de 24 células. Nesta as duas células filhas da célula fundadora E migram para o centro do embrião, local onde se dividem com o intuito de formar o intestino composto por 20 células. De

seguida, a célula estaminal P4, precursora das células germinais, migra através do blastoporo (originado pela movimentação das duas células referidas anteriormente) para uma posição inferior ao intestino primordial. Posteriormente, as células da mesoderme que descendem da célula fundadora MS migram para o interior pelo lado anterior do blastoporo, enquanto que as células precursoras dos músculos que provêm das células fundadoras C e D migram pelo lado posterior. Estas células têm como objectivo flanquear o tubo intestinal dos lados esquerdo e direito. Por último, as células derivadas da célula fundadora AB que estão relacionadas com a faringe migram também para o interior, enquanto que as células do hipoblasto, precursoras da hipoderme, deslocam-se ventralmente por epibolia, fechando o blastoporo. Assim que o embrião fique composto por 30 células, adquire a postura de ovo, sendo posteriormente libertado no meio, local onde irá prosseguir o seu desenvolvimento. [23,26]

A organogénese, terceira e última fase, consiste na movimentação e desenvolvimento das células em órgãos e na organização e alteração da forma das células da hipoderme. Deste modo, nesta fase também se verifica a finalização da diferenciação celular embrionária e a alteração da postura do embrião, que vai-se alongado desde a sua forma inicial de bola terminando no formato final de verme. Este, sendo hermafrodita irá ser composto por 558 células somáticas, sendo que se formam mais 115 células adicionais, porém sofrem morte celular programada, isto é, apoptose. [23,26]

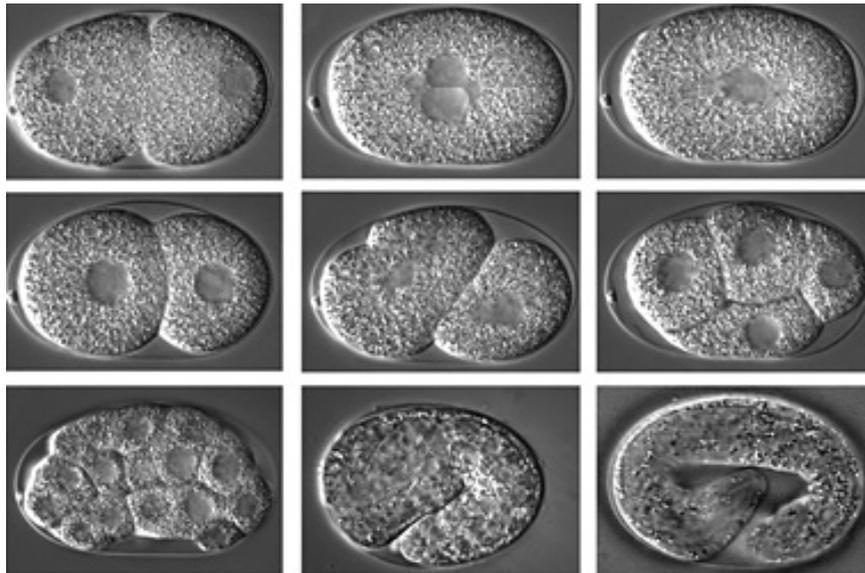


Figura 16. Desenvolvimento embrionário do nemátodo *C.elegans* [23].

Desenvolvimento pós-embrionário – Fase larvar

Decorrido o desenvolvimento embrionário, o ovo formado eclode, libertando um jovem verme, que se encontra na fase larvar L_1 . Após esta, o verme é sujeito a mais três sucessivas fases larvares, nomeadamente L_2 , L_3 e L_4 , processo designado de desenvolvimento pós-embrionário, sendo este mais prolongado que o anterior, pois demora cerca de 40 horas à temperatura de 20°C. [23]

Na fase larvar L_1 , cerca de 10% das células presentes são células somáticas, que vão ser sujeitas a inúmeras divisões celulares ao longo de todo o desenvolvimento larvar, formando deste modo a hipoderme, o sistema nervoso, o sistema muscular e a estrutura somática das gónadas. Nesta fase e 7 horas após a eclosão, surge também o início da proliferação das duas células das gónadas primordiais da linha germinal, processo que perdura até à fase adulta. A divisão celular pós-embrionária, exceptuando a proliferação da linha germinal, obedece a padrões de espaço e tempo bastante definidos e invariáveis, originando a fixação do número de células com determinados destinos. Este facto contribui para a distinção entre os sexos, uma vez que possibilita a criação de diferentes sistemas reprodutores, sendo que o hermafrodita apresenta gónadas bilobadas e vulva, enquanto que o macho

demonstra uma gónada unilobada com um cauda especializada para o acasalamento, diferenças já visíveis na primeira fase larvar L₁. Na última fase, ou seja, em L₄, a gonadogénese termina produzindo primeiramente os espermatozoides seguindo-se os oócitos, aspecto apenas referente aos nemátodos hermafroditas. Relativamente aos machos, ocorre a diferenciação de certas estruturas do sistema reprodutor, como os vasos deferentes e as vesículas seminais, contribuindo para a modelação da forma da cauda (arredondada). Antes das quatro fases larvares ocorre uma “muda da cutícula”, pois é sempre sintetizada uma nova cutícula sob a velha, sendo distinta quer estruturalmente quer molecularmente. Durante este período de renovação, é necessário interromper o movimento da faringe, isto é, o bombear alimentos do exterior para o interior do nemátodo. [24]

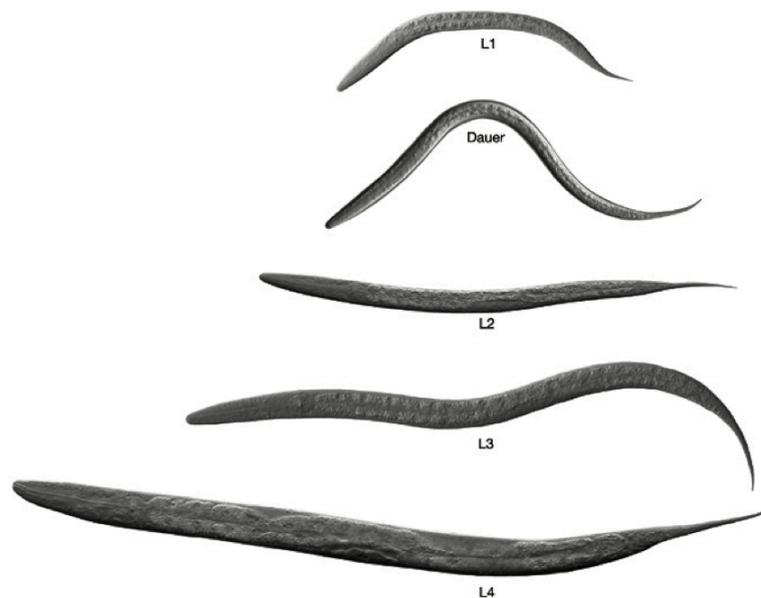


Figura 17. Desenvolvimento larvar do nemátodo *C.elegans* [22].

Morte celular programada - Apoptose

No desenvolvimento e na manutenção de um organismo multicelular é fundamental que ocorra interação entre as células que o constituem. Durante o desenvolvimento embrionário, inúmeras células produzidas em excesso são levadas à morte, contribuindo para a formação dos órgãos e tecidos do organismo. Neste sentido, a morte celular programada ou apoptose é um

processo fundamental do desenvolvimento normal de um organismo, que actua conjuntamente com a diferenciação celular. [11,27]

O *C.elegans* tornou-se um sistema modelo experimental, pois devido ao facto de ser transparente e de fácil observação e manipulação, permitiu compreender a divisão e a diferenciação celular desde a fertilização até à sua fase adulta. A linhagem de células somáticas neste nemátoda mantém-se particamente invariável de um indivíduo para outro devido à ordenação espacial das áreas de segregação do citoplasma. Contrariamente, a linhagem germinativa forma-se através dos componentes citoplasmáticos, os grânulos P (conjunto de reguladores da tradução), que se encontram distribuídos aleatoriamente no zigoto. Momentos após a fecundação, os grânulos P movem-se em direcção à extremidade posterior do zigoto, entrando apenas no blastómero P1. Quando a célula P1 se divide, os grânulos P mantêm-se na parte posterior desta célula, passando conseqüentemente para a célula P2. Por último, estes grânulos P ficam na célula P4, originando os espermatozoides e os óvulos do adulto. [11,25,26]

A apoptose ou morte celular programada é um tipo de morte celular que acontece de forma não acidental, isto é, é um tipo de “auto-destruição celular” que ocorre de forma organizada e necessita de energia para a sua execução, contrariamente à necrose. Este processo está presente nas mais diversas situações do desenvolvimento biológico dos seres vivos, nomeadamente na organogénese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos. A morte celular programada baseia-se num conjunto de acções proporcionadas pelas enzimas que vão provocar a fragmentação da molécula de DNA e a autodestruição da célula, sendo por isso diferente da morte patológica por necrose ou como consequência da presença de um factor externo. [11,24,27]

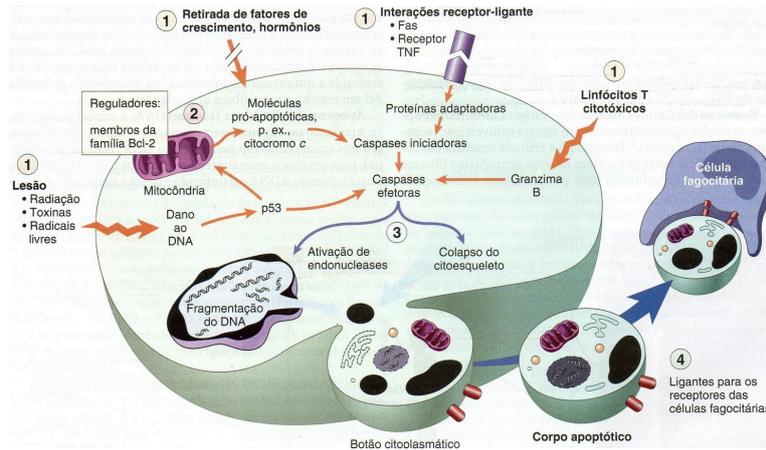


Figura 18. Diagrama representativo dos mecanismos globais da apoptose [11].

Neste nemátoda, todas as células são “programadas” para morrer, excepto quando existem sinais que indicam o contrário. Devido à facilidade em contar o número de células que o constituem, sabe-se que morrem exactamente 131 células de acordo com o padrão de desenvolvimento normal. [26]

Características morfológicas da Apoptose

A apoptose é um tipo de morte celular bastante regulado e de elevada eficiência, que requer a interação de inúmeros factores. Este processo pode ser dividido em várias etapas, de acordo com mudanças morfológicas que ocorrem. [11,27]

Inicialmente surge uma retração da célula que provoca a perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. Ainda nesta fase, não existe alteração da morfologia dos constituintes celulares, particularmente do núcleo e citoplasma, pois não diferem das outras células. Seguidamente, ocorre a condensação da cromatina, que se concentra junto à membrana nuclear, mantendo-se esta intacta. Posteriormente, a membrana celular cria prolongamentos e o núcleo começa a desintegrar-se em fragmentos encobertos pela membrana nuclear. Com o passar do tempo, os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho, chegando a romper, produzindo assim estruturas contendo o conteúdo celular. O DNA da célula sofre fragmentação internucleossômica por uma

endonuclease, que origina fragmentos de DNA de diversos tamanhos. As referidas porções celulares que estão rodeadas pela membrana celular são designadas por corpos apoptóticos, que vão ser fagocitados pelos macrófagos e removidos sem originar nenhum processo inflamatório. [11,27]

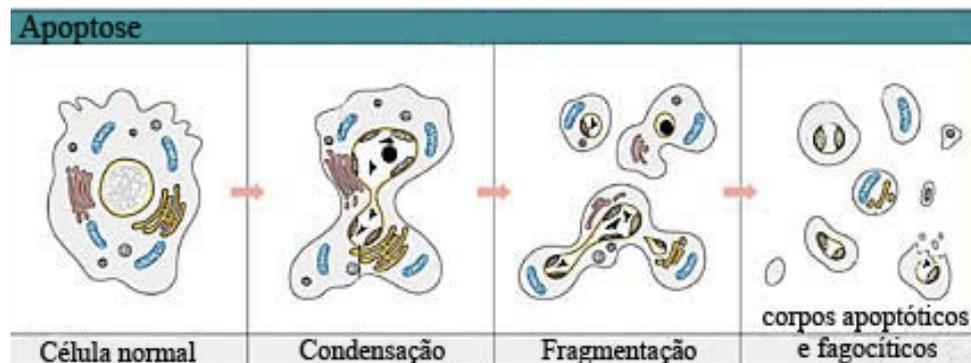


Figura 19. Processos globais da apoptose - condensação, fragmentação e fagocitose [47].

A apoptose distingue-se dos outros processos de morte celular devido às suas características particulares referidas anteriormente, que a tornam num processo único, sendo principalmente a ocorrência da condensação da cromatina, retração da célula, fragmentação celular e do DNA e fagocitose sem processo inflamatório. Este tipo de morte celular é bastante rápido, demorando apenas cerca de uma hora. As características morfológicas apresentadas no *C.elegans* são bastante similares às observadas na apoptose dos vertebrados e invertebrados. [24,27]

Genes reguladores da Apoptose

A apoptose ou morte celular programada corresponde a um processo de elevada importância no desenvolvimento dos organismos, como por exemplo na morfogénese e no controlo e manutenção do número e das condições das células no organismo. Para que este tipo de morte celular ocorra é necessário que se desencadeie uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente controlados, que vão estimular as proteínas enzimáticas, no sentido de provocar as alterações morfológicas referidas anteriormente, como a fragmentação da molécula de

DNA e a autodestruição da célula. A base genética presente na apoptose em *C.elegans* é muito similar à existente em outros organismos, como é o caso dos mamíferos. [11,24,27]

Nos *C.elegans* a apoptose é regulada principalmente por três genes da família *ced* (*cell death abnormal*), *ced-3*, *ced-4* e *ced-9*, e por um gene *egl-1* (*egg laying defect*), sendo designados de “reguladores globais da apoptose”. Os genes *ced-3*, *ced-4* e *egl-1* são considerados reguladores positivos ou indutores da apoptose nas células somáticas, uma vez que mutações nestes genes provocam a sobrevivência de células destinadas a sofrer morte celular programada durante o desenvolvimento. Contrariamente o gene *ced-9* é considerado de regulador negativo ou inibidor da apoptose no desenvolvimento do nemátoda. A interação destes genes antagonistas permite manter o equilíbrio entre a morte ou a sobrevivência das células, isto é, se sofrem ou não apoptose. [11,26,27]

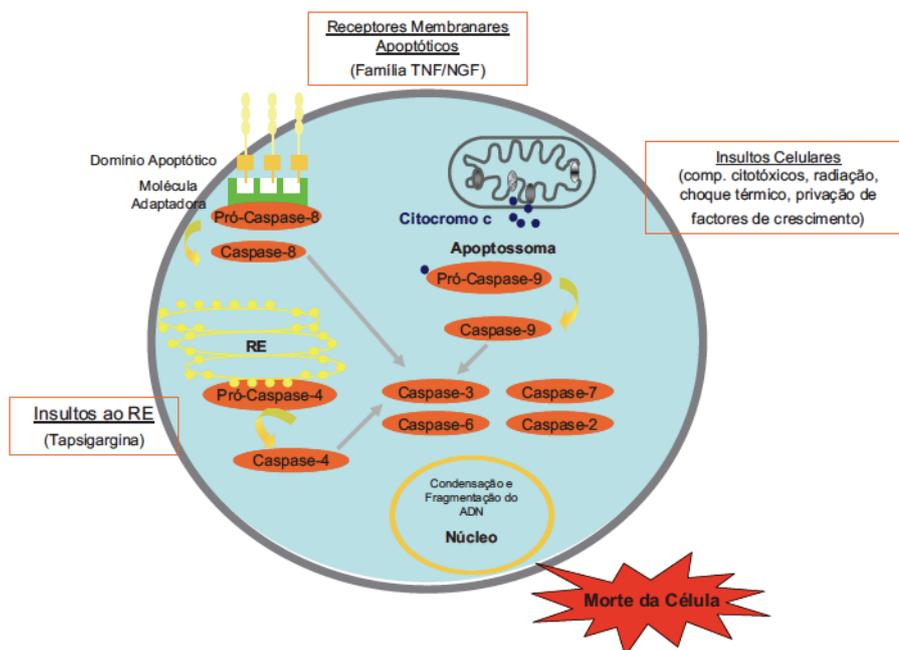


Figura 20. Ilustração dos procedimentos fundamentais realizados pelos genes reguladores da apoptose [11].

Sendo a morte celular programada um processo muito frequente, complexo, que está na base do desenvolvimento do nemátoda, é fundamental a existência de um conjunto de genes capazes de regular a sua

aplicação. Estes são classificados e divididos consoante a função que desempenham na apoptose, ou seja, genes capazes de desencadear os mecanismos de apoptose (regulação da sua activação), genes que estão na base do processo apoptótico (na sua execução), genes responsáveis pela activação da fagocitose das células mortas e genes indicadores da dissolução das células apoptóticas fagocitadas (degradação do DNA das células mortas). [11,26]

Caspases – iniciadoras e executoras da Apoptose

As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) pertencem à família das proteases de cisteínas e são responsáveis pelo processo de degradação da célula, uma vez que são capazes de reconhecer e clivar substratos que possuem resíduos de aspartato. Deste modo, sinalizam a apoptose provocando a condensação e fragmentação nuclear e a externalização de fosfolípidos de membrana, que vai indicar aos macrófagos a necessidade de fagocitose da célula em causa. [11,24,26]

Na presença de um factor indutor de apoptose, ocorre a activação do gene *ced-4*, que pertence à família das caspases e é um factor de activação de proteases, que por sua vez aciona o gene *ced-3* que inicia a destruição da célula. No entanto, mesmo neste caso os mecanismos de apoptose podem ser controlados, pois ainda é possível decidir se ocorre o bloqueio ou se prossegue o mecanismo. A existência de um gene “bloqueador”, *ced-9*, possibilita esta regulação, pois a presença da proteína codificada por este gene provoca o bloqueio da cadeia. Neste sentido, uma alteração no gene *ced-9* que provoque a sua inactivação, pode resultar na morte de células que normalmente sobreviveriam, por activação dos genes *ced-3* e *ced-4*. Contrariamente, alterações que aumentem a sua expressão, podem provocar uma aumento de sobrevivência em células que deveriam morrer. Assim, é possível concluir que o produto do gene *ced-9* pode inibir ou aumentar a expressão dos genes *ced-4* e *ced-3*, sendo um interruptor binário que regula a vida ou a morte da célula. [11,24,26]

Do mesmo modo, também existem genes responsáveis pelo reconhecimento e pela fagocitose dos corpos apoptóticos, tais como *ced-1*, *ced-2*, *ced-5*, *ced-6*, *ced-7* e *ced-10*. Além disto, ainda codificam proteínas fundamentais para a transmissão de sinais apoptóticos e para a destruição de alvos específicos. [11,24]

Relativamente ao DNA das células apoptóticas, ele permanece como uma massa condensada, sendo degradado pela enzima nuclease, enquanto o gene *nuc-1* permite que a morte celular e a fagocitose se desenvolva normalmente. [24]

A classificação das caspases está de acordo com o seu pró-domínio e o seu papel na apoptose: [11,24,26]

- Caspases iniciadoras: pró-domínios longos e estão envolvidas na iniciação da cascata proteolítica.
- Caspases efectoras: pró-domínios curtos ou inexistentes e estão relacionadas com clivagem de substratos.

Estas proteases possuem duas características fundamentais, pois além de clivarem proteínas após os resíduos de ácido aspártico, são sintetizadas na forma de proenzimas, reguladas pela presença de uma proteólise com clivagem após resíduos de aspartato. [11,24,26]

Resumindo, as caspases por serem proteases fortes são capazes de digerirem as células desde o seu interior, fazendo a clivagem das proteínas celulares e a fragmentação do DNA. [11,24,26]

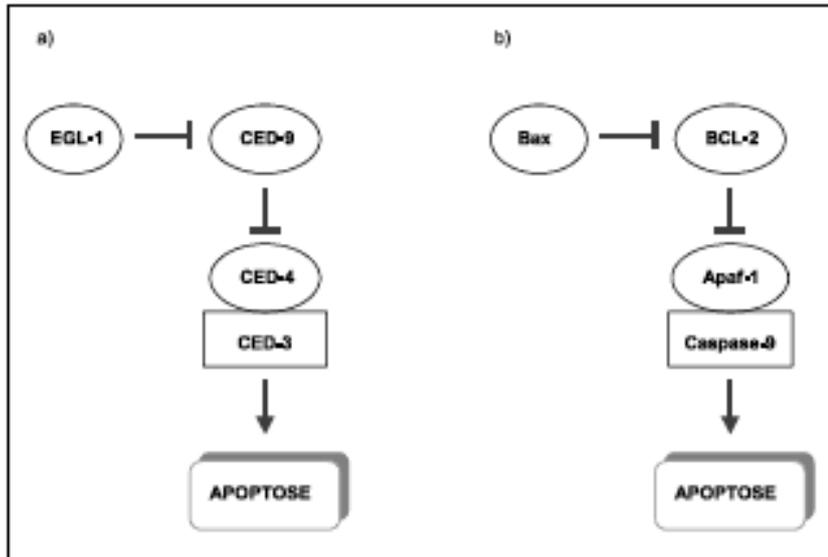


Figura 21. Esquema simplificado do modelo de activação das caspases no *Caenorhabditis elegans* (a) e nos seres humanos (b) [27].

Parte II – Material e Métodos

Capítulo 1 – ICNAS : Ciclotrão

Os nemátodas foram irradiados com um feixe de neutrões produzido pelo Ciclotrão presente na unidade de produção do ICNAS. Este é um ciclotrão do tipo IBA Cyclone® 18/9HC, capaz de acelerar prótons até 18MeV com um feixe de intensidade máxima de 150µA e deutrões até 9MeV com um feixe de intensidade máxima de 40µA.

Antes de iniciar este estudo, mediu-se os valores de dose nos diferentes alvos do ciclotrão com o auxílio de um detector colocado a 1 metro de distância dos referidos alvos.

Tabela 3. Valores de Dose nos diferentes alvos do Ciclotrão, a uma intensidade de feixe de 1µA por hora

ALVO	CORRENTE INTEGRADA (µAh)	DOSE (mSv)	
		Neutrões	Raios γ
1	1,0	2,47	0,0907
3	1,0	4,06	0,0936
5	1,0	5,14	0,1366
6	1,0	6,16	0,0462
7	1,0	4,71	0,0380
8	1,0	4,27	0,0391

Após obter os valores, escolheu-se o alvo número 6 pois apresenta valores de dose de neutrões mais elevados. Como protocolo, optou-se por irradiar as culturas de *C.elegans* com três feixes de diferentes intensidades e consequentemente diferentes doses absorvidas. Os valores de dose absorvida para cada cultura são calculados a partir da dose equivalente com a aplicação da seguinte fórmula: [15]

$$H_T = D \times w_R$$

Equação 15

sendo que H_T corresponde à dose equivalente, D à dose absorvida e w_R o factor de ponderação dos neutrões.

Tabela 4. Factores de ponderação da radiação, segundo as recomendações da ICRP, ao longo das últimas publicações de 1977 a 2007 [15].

Neutrões - Energia	Factor de ponderação da radiação, w_R		
	ICRP 26 (1977)	ICRP 60 (1991)	ICRP 103 (2007)
< 10 keV	10	5	Uma curva contínua como função da energia dos neutrões
10 keV a 100 keV	10	10	
>100 keV a 2 MeV	10	20	
>2 MeV a 20 MeV	10	10	
>20 MeV	10	5	

Considerando o factor de ponderação de 15, a dose absorvida obtém-se através de: [15]

$$D = \frac{H_T}{w_R}$$

Equação 16

Tabela 5. Valores de dose equivalente e dose absorvida para feixes com diferentes intensidades: 1, 5 e 10 μ Ah.

Corrente integrada (μ Ah)	Dose Equivalente - H_T (mSv)	Dose Absorvida - D (mGy)
1	6,16	0,4107
5	30,8	2,05
10	61,6	4,107

Neste sentido, foram postas 2 placas de petri com culturas de *C.elegans* para cada intensidade de feixe de neutrões, à distância de 1 metro do alvo número 6 do ciclotrão. Além destas, foi colocada 1 placa de petri fora da sala do ciclotrão, sem estar exposta a qualquer radiação, com o intuito de ser uma cultura de controlo. A sala do ciclotrão estava a uma temperatura de 21,4°C.

Esta experiência foi realizada em três fases sendo o valor da intensidade da corrente e conseqüentemente, o valor de dose absorvida por placa de petri, o factor de distinção entre elas, tentando deste modo saber qual o valor de intensidade que origina modificações significativas nos nemátodas, quais são e que conseqüências vão provocar na vida destes seres vivos. Contudo, todos os outros elementos e métodos utilizados foram constantes, nomeadamente, o procedimento de preparação das culturas de *C.elegans* antes de serem sujeitas à radiação e o número de placas criadas, o período de recolha de dados (contagens do número de nemátodas e aquisição das imagens de fluorescência) e os protocolos utilizados para a obtenção desses mesmos dados.

Para cada fase da experiência foram preparadas 8 placas a partir de uma recém criada (com apenas 72h), de forma a poderem ser divididas em 3 grupos de irradiação: 2 compostos por 3 placas cada um e 1 composto por 2 placas, sendo que cada uma estava destinada a diferentes tipos de análise.

Tabela 6. Distribuição das placas de *C.elegans* por grupos e indicação da finalidade de cada uma.

	Irradiação nº1		Irradiação nº2		Irradiação nº3	
Exposta	1	Nº CE*	4	Nº CE*	6	Nº CE*
	2	MF*	5	MF*	7	MF*
Não Exposta	3	Nº CE*	*	*	8	MF*

*Nº CE: Número de *C.elegans* presente na placa (placa para contagens); *MF: Placa para fazer amostras para serem analisadas ao microscópio de fluorescência; *a irradiação nº2 não teve placa de controlo por não ser necessário uma vez que existia nas outras duas irradiações (com finalidades diferentes)

Capítulo 2 – Manutenção de *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans é considerado um organismo modelo devido não só às suas características anatômicas e fisiológicas, nomeadamente, ciclo de vida curto, existência de hermafroditas protândricos e machos, número constante de células e transparência do corpo, como também devido à sua facilidade de cultivo e manutenção em laboratório e à possibilidade de congelar estirpes indefinidamente em nitrogênio líquido na presença de 15% de glicerol. [23,25]

Preparação de NGM (*Nematode Growth Medium*)

NGM consiste no meio de cultura utilizado para o crescimento e manutenção deste nemátoda. Este é produzido facilmente em laboratório, sendo posteriormente colocado em placas de petri em condições de assepsia.[24,28]

Para a sua produção é necessário cloreto de sódio (NaCl), agar, peptona, 5mg/ml de colesterol em etanol, 1 mol (M) de solução tampão de fosfato de potássio (KPO₄) de pH 6.0, 1 mol (M) de sulfato de magnésio (MgSO₄) e 1 mol (M) de cloreto de cálcio (CaCl₂). Relativamente ao protocolo, este inicia-se com a junção de 3g de NaCl, 17g de agar e 2,5g de peptona num balão de Erlenmeyer, juntamente com 975ml de água destilada. Após tapar a sua abertura, este é colocado a autoclavar durante sensivelmente 40 minutos a 121°C. De seguida, deixa-se arrefecer e adiciona-se 1 ml de 1M de CaCl₂, 1ml de 5mg/ml de colesterol em etanol, 1 ml de MgSO₄ e 25ml de solução tampão, agitando por fim para homogeneizar a solução. Por último, em condições de assepsia, coloca-se o meio NGM obtido em placas de petri preenchendo apenas 1/3 da sua medida e deixa-se arrefecer para que o excesso de humidade se evapore. [24,28]

Nesta experiência optou-se por um protocolo mais simples uma vez que utilizou-se *USBiological Nematode Growth Medium* em pó, constituído por agar (17,5 g/l), cloreto de sódio (3,0g/l), peptona (2,5g/l) e colesterol (0,005g/l) e com pH de 6,96. Para fazer o meio, dissolve-se 23g deste pó em

973ml de água destilada e autoclava-se por 15 minutos a 121°C. Por fim, coloca-se o meio NGM em placas de petri até perfazer 1/3 da sua medida e deixa-se arrefecer até que a humidade se evapore.[24,28]

Alimentação do nemátoda *C.elegans*

De modo a favorecer e manter as condições necessárias para o crescimento de *C.elegans* em laboratório é utilizado uma estirpe de *Escherichia coli* OP50 não patogénica, como fonte de alimento. Estas bactérias são auxotróficas tendo por este motivo crescimento limitado nas placas deste nemátoda. Nesta experiência, as bactérias *Escherichia coli* OP50 foram dispostas no centro da placa de petri com meio de cultura NGM de forma a cobrir uma área considerável. [24,28]

Para produzir o meio de cultura bacteriana, LB (*Luria Broth* ou *Luria Bertani*) é necessário dissolver em 1 litro de água destilada 10g de Bacto-triptona, 5g de Bacto-leveduras, 5 g de cloreto de sódio (NaCl) e 15g de agar, ajustando por último o pH para 7,0 com o auxílio de hidróxido de sódio, NaOH (sensivelmente 0,2ml). De seguida leva-se a autoclavar durante aproximadamente 15 minutos e por fim deixa-se arrefecer. [24,28]

O crescimento das bactérias é feito numa incubadora, após ter sido inoculado o volume necessário de meio de cultura, durante pelo menos 8 horas a uma temperatura média de 37°C (normalmente opta-se por deixar na incubadora durante o período noturno). Porém, existe uma alternativa a este procedimento que consiste em deixar a cultura numa bancada à temperatura ambiente, por um período de 24 a 48 horas, com agitação ocasional até esta se apresentar turva. [24,28]

Estas bactérias também podem ser congeladas em 20% de glicerol, componente que evita a destruição das células a temperaturas negativas. Deste modo, junta-se 1 ml da cultura produzida na incubadora a 1 ml de glicerol autoclavado e agita-se a solução, ficando pronta para ser congelada a 20 ou 70°C negativos. [24,28]

Transferência de *C.elegans*

Para a manutenção de *C.elegans* em laboratório e para o seu estudo/manipulação é preciso aplicar métodos de transferência de nemátodas, sendo que a selecção deste depende do fim pretendido. [24,28]

Quando é pretendido fazer uma nova cultura de nemátodas a partir de uma mais antiga utiliza-se uma agulha esterilizada, mais precisamente o seu bisel ligeiramente dobrado. Seguidamente corta-se um pedaço de agar antigo, com uma razoável quantidade de nemátodas, sendo colocado posteriormente na placa de petri com NGM mais recente tendo o cuidado de ser invertido, ou seja, a superfície que estava inicialmente virada para cima fica em contacto directo com o novo agar. Este pormenor permite que os nemátodas cheguem às bactérias mais rapidamente, o que facilita a sua reprodução. Para evitar contaminações ou que as placas sequem, devem ser seladas com *parafilm* sempre que deixem de estar em meio esterilizado. Este método também é eficaz quando se deseja transferir uma grande quantidade de *C.elegans* para uma lâmina com o intuito de ser analisada ao microscópio. [24,28]

Outro possível método utilizado é o que permite passar nemátodas individualmente através de um pico de platina, sendo assim mais minucioso e mais exigente. Para preparar este material é preciso ter um fio de metal, uma pipeta de Pasteur, uma folha de papel, uma pinça, um bico de Bunsen, um alicate e uma lâmina. Inicialmente, coloca-se a pipeta sobre uma folha de papel para concentrar os fragmentos de vidro num só local. De seguida, com o auxílio da pinça parte-se a pipeta de Pasteur no local onde começa o seu estreitamento. Posteriormente corta-se 3,5 a 4 cm de fio de platina e aquece-se a extremidade partida da pipeta no bico de Bunsen. Com a ajuda de uma pinça introduz-se o fio de platina dentro da pipeta e coloca-se junto a chama, fazendo pressão com a pinça até estes dois materiais estarem fixos um no outro. Por último, achata-se a extremidade do pico de platina de forma a obter uma maior área de superfície, recorrendo a um alicate para a apertar. Depois de comprovar que a extremidade está o mais plana possível, através da sua observação ao microscópio e do uso de uma lâmina, pode-se transferir os nemátodas para o local de interesse. Para facilitar a passagem e quando se pretende transferir *C.elegans* para uma nova placa já com *E.coli*

OP50, deve-se primeiramente tocar com o pico de platina nas bactérias, uma vez que ajuda a aderências dos nemátodos ao pico. [24,28]

Sempre que se realiza uma transferência de *C.elegans* deve-se sempre comprovar ao microscópio se foi devidamente correcta e se não foi danificado nenhum nemátodo. [24,28]

Congelação de nemátodos

Durante a manutenção de *C.elegans* em laboratório, por vezes pode ocorrer contaminações nas placas de petri que contenham estes nemátodos, sendo este um dos motivos que levam à congelação de várias amostras. [24,28]

Este método de conservação é mais eficaz quando são seleccionados nemátodos nos estágios iniciais de desenvolvimento, em vez de adultos, dauers ou mesmo embriões. Para uma congelação ideal também se deve considerar o modo como a temperatura desce, isto é, deve ser feito de uma forma gradual, até esta atingir os 80°C negativos. Contudo pode também ser congelado e armazenado por um período indefinido em azoto líquido (-196°C). [24,28]

Existem alguns protocolos sobre a congelação de nemátodos, sendo que um dos mais comuns necessita de 5,85g de NaCl, 6,8g de hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄), 300g de glicerol, 5,6ml de 1M NaOH e 1L de água. Juntam-se todos os elementos para posteriormente fazer o autoclave, tendo em consideração todos os cuidados de assepsia necessários. Por fim, adiciona-se 3ml de 0,1M de MgSO₄ e reserva-se em diversos tubos Eppendorff (por exemplo) para serem congelados. Para a sua descongelação, retira-se um tubo do congelador e deixa-se arrefecer na totalidade à temperatura ambiente. Seguidamente, coloca-se o conteúdo já descongelado numa placa de NGM com *E.coli* OP50. Por último e após 48 horas sensivelmente, deve-se transferir alguns nemátodos para uma nova placa também com bactérias, reforçando deste modo a sua descendência. [24,28]

A recuperação de nemátodas após a sua congelação é cerca de 35 a 45%, percentagem que diminui ligeiramente ao longo de vários anos. [24,28]

Descontaminação de culturas de *C.elegans*

Quando ocorre uma contaminação numa placa NGM com nemátodas recorre-se a diversos procedimentos para a sua descontaminação. [24,28]

Um dos métodos consiste na transferência sucessiva de nemátodas, tendo uma particularidade: sempre que é transferido um pedaço do agar antigo, este é colocado numa extremidade da nova placa, oposto à que possui bactérias OP50. Deste modo, os nemátodas têm de percorrer quase a totalidade do meio NGM, afastando-se deste modo dos agentes contaminadores. O número de transferências realizadas são tantas quanto as necessárias para a remoção completa da contaminação. [24,28]

Outro procedimento comum engloba o uso de hipoclorito de sódio (lixívia) e 5M NaOH, numa proporção de 1:1. Numa placa com NGM coloca-se uma gota da solução referida anteriormente e adicionam-se alguns *C.elegans* adultos com embriões *in útero*. Esta junção vai provocar não só a destruição do corpo do nemátoda adulto, como também de fungos ou bactérias que estão a provocar a contaminação, deixando os embriões intactos. Posteriormente, estes vão eclodir e originar uma nova cultura saudável. Este procedimento também pode ser aplicado quando se pretende observar apenas embriões ao microscópio, desde os seus estádios iniciais até a eclosão. [24,28]

Para evitar contaminações é essencial que todos os materiais usados sejam esterilizados, que a manipulação de nemátodas seja feita em condições de assepsia e que seja utilizado parafina para isolar as placas de petri. [24,28]

Capítulo 3 – Microscopia de Fluorescência

A microscopia de fluorescência é uma técnica que possibilita a visualização de moléculas específicas, que possuem propriedades de fluorescência na presença de luz de excitação ultravioleta ou radiação electromagnética na faixa do visível de baixo comprimento de onda, emitindo radiação de maior comprimento de onda. [29,30]

Uma substância é caracterizada de fluorescente quando possui na sua estrutura interna fluorocromos pré-existentes ou introduzidos. Estes componentes pertencem a um grupo funcional responsável por absorver energia de um comprimento de onda específico e posteriormente por a libertar noutro determinado comprimento de onda maior, isto é, menor energia. [29,30]

Esta técnica além de permitir detectar substâncias em pequenas concentrações, também possibilita observar amostras após o seu devido tratamento químico. Assim, a microscopia de fluorescência pode dar informações sobre a conformação das moléculas, que demonstrem alterações na excitação ou emissão do espectro de substâncias fluorescentes. [29,30]

GFP – Green Fluorescent Protein

A GFP, proteína verde fluorescente, consiste numa cadeia monomérica de 238 aminoácidos, sendo que os que estão nas posições 65, 66 e 67 localizam-se no centro da cadeia e constituem o fluorocromo responsável pela emissão da cor verde. Esta proteína é considerada um marcador biológico pelas propriedades que apresenta:[31]

- Fácil detecção e demonstração dos movimentos proteicos que sucedem no interior das células, pois ao serem irradiadas com UV exibem fluorescência
- Tamanho reduzido, característica importante uma vez que proteínas pequenas quando ligadas a proteínas de interesse não alteram as suas propriedades

- Autofluorescência, isto é, não necessita de co-factores para demonstrar esta propriedade

Através destas características, a GFP permite localizar proteínas, visualizar a anatomia celular, identificar células e visualizar processos celulares fisiológicos, razões que justificam a utilização de *C.elegans* transgênico, organismo modificado geneticamente de modo a expressar a GFP, permitindo identificar e compreender o funcionamento do sistema nervoso destes seres.[31,32]

Esta proteína foi descoberta por três cientistas, Osamu Shiomomura, Martin Chalfie e Roger Tsien, que a observaram primeiramente na medusa *Aequorea Victoria* em 1962. Após alguns estudos e através de tecnologias de manipulação do DNA conseguiram incorporar a GFP em organismos vivos, que segundo Roger é “um marcador genético luminoso para diversos fenómenos biológicos”. [31]

Os seus 283 aminoácidos estão dispostos sob a forma de um cilindro, que possui onze cadeias-beta e uma alfa-hélice, localizada no centro desta estrutura juntamente com o cromóforo (parte da molécula responsável pela cor). [31,32]

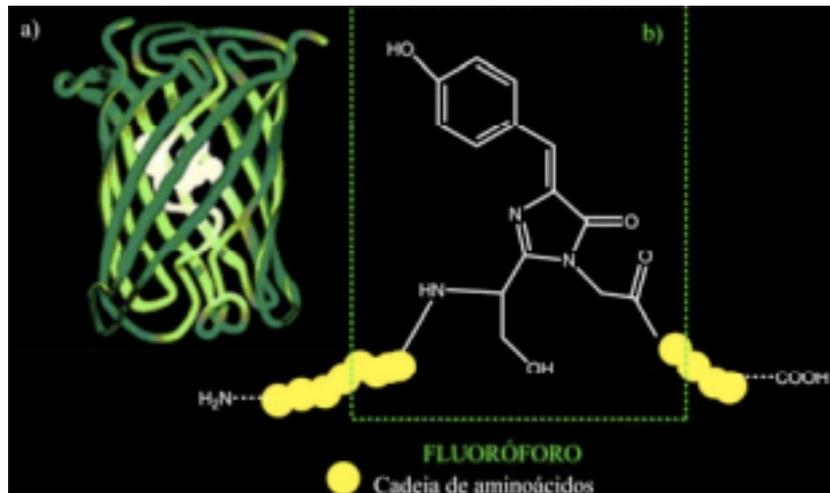


Figura 22. A primeira imagem (a) representa o arranjo conformacional da GFP e a segunda imagem (b) o fluoróforo responsável pela emissão da cor verde. [31]

De acordo com os seus descobridores a GFP “ funciona como uma lâmpada que se pode ligar a outras proteínas e detectar muito facilmente a

presença destas em células ou organismos utilizando, por exemplo, um microscópio de fluorescência”. [31,32]

Após a descoberta da sua existência e de ser isolada, Shiomomura observou que ela não era luminescente por si só, mas precisava de ser irradiada com luz visível na faixa azul do espectro para emitir uma luminescência verde, processo designado de fluorescência. No caso da medusa *Aequorea*, a GFP recebe energia da sua própria reação bioluminescente da luciferase e luciferina. Este processo ocorre quando o complexo luciferase-luciferina e a GFP estão suficientemente próximos, fazendo com que a energia de excitação do complexo luciferase-oxiluciferina seja eficientemente transferida para a GFP, provocando a sua fluorescência na região verde do espectro visível. Todo este mecanismo de transferência de energia classifica-se de transferência de energia por ressonância e está dependente da proximidade e sobreposição dos espectros de emissão do dador de energia, que neste caso é o complexo de luciferase-oxiluciferina excitada, e de absorção do receptor de energia, o GFP.[31,32]

A utilização das proteínas fluorescentes além de determinarem a localização e a dinâmica de proteínas, organelos e compartimentos celulares, também possibilitam observar e estudar a expressão dos genes de interesse ao longo do tempo e desenvolvimento do organismo, uma vez que o comportamento da GFP pode ser analisado *in vivo*. Roger Tsien ao descobrir o funcionamento desta proteína, possibilitou expandir o padrão de cores, possibilitando o estudo de várias proteínas e células, ou seja, diferentes processos biológicos em simultâneo.[31,32]

Gene *UNC-119*

O *C.elegans* transgênico tem na sua constituição genética o gene *UNC-119*, estando este envolvido no desenvolvimento do sistema nervoso. Este gene codifica uma proteína que é muito conservada entre metazoários, sendo importante para o bom desenvolvimento do sistema nervoso, locomoção e na alimentação. A expressão deste gene inicia-se na fase embrionária, mais propriamente após a formação de 60 células, e perdura até à fase adulta. [33,34]

Diversos estudos demonstraram que mutações ocorridas neste gene com este nemátoda provocam alterações no comportamento, na locomoção e na sua alimentação. [33,34]

A proteína codificada por este gene no *C.elegans* é homóloga a uma proteína que também existe nos seres humanos, codificada por um gene com o mesmo nome *UNC-119*. Este é expresso em fotoreceptores na retina, mais concretamente nas sinapses fotoreceptoras da camada plexiforme externa da retina, e desempenha um papel importante no mecanismo de libertação de neurotransmissores de fotoreceptores, através do ciclo de vesículas sinápticas. [33,34]

O gene que codifica a proteína verde fluorescente, GFP, nestes nemátodas está ligado ao gene *UNC-119*, permitindo assim estudar o desenvolvimento do sistema nervoso de *C.elegans* desde a fase embrionária de gástrula até à fase adulta. [33,34]

Microscópio de Fluorescência

O microscópio de fluorescência é um tipo de microscópio no qual as amostras são iluminados por raios de um determinado comprimento de onda, permitindo localizar proteínas dentro da célula (entre outros constituintes celulares). Esta característica faz da microscopia de fluorescência uma das principais técnicas de imagem utilizadas quando se pretende estudar a dinâmica de células vivas, pois além de conseguir visualizar diferentes proteínas com um elevado grau de especificidade, ainda possibilita a análise simultânea de vários tipos de moléculas quando marcadas com diferentes fluorocromos. [24,29,30]

Componentes do Microscópio de Fluorescência

Este equipamento apresenta duas principais componentes: mecânica e óptica. A primeira está relacionada com o sistema de suporte e de focagem enquanto a segunda com o sistema de ampliação e de iluminação. [29,30]

O sistema de suporte tem como objectivo sustentar as diferentes peças do microscópio nas posições correctas, promovendo deste modo uma boa estabilidade mecânica.[29,30,35]

O sistema de focagem é constituído pelos parafusos macrométricos e micrométricos e é deles que depende a focagem, ou seja, a obtenção de imagens nítidas da amostra em estudo. [29,30,35]

O sistema de ampliação é utilizado para aumentar a imagem observada, através do uso de oculares e objectivas. Estas devem ser escolhidas e adaptadas consoante a amostra e o trabalho pretendido, sendo que com iluminação de fundo escuro pode-se optar por lentes mais elaboradas e com maior abertura, resultando num maior poder de recolha de luz. [29,30,35]

O sistema de iluminação engloba a fonte de luz, filtros, condensador e diafragma de campo, constituintes que têm como intuito proporcionar a luz necessária à formação da imagem. Na escolha da fonte de luz a utilizar deve-se ter em consideração o espectro de emissão, a potência, o pulso e a frequência de modulação da luz. Actualmente existe um novo tipo de fonte, díodo de emissão de luz ou LED, que devido às suas características nomeadamente longo período de vida, variedade de emissões espectrais, preço e número de contagens no comprimento de onda de interesse, têm vindo a ser uma opção bastante viável. Os filtros são componentes muito importantes nesta técnica tendo como principal função a eliminação e a aceitação de luz com determinados comprimentos de onda, sendo divididos em filtros de excitação, de barreira e espelhos dicromáticos. Os primeiros permitem apenas a passagem de luz a determinados comprimentos de onda com uma considerável especificidade e transmissão, os segundos aceitam apenas a que corresponde a comprimentos de onda de interesse, pois ao detectar somente certos fotões é garantido que são recolhidos apenas os que são provenientes da fluorescência da amostra e por fim, os últimos servem para reflectir a passagem da luz a específicos comprimentos de onda, sendo para isso colocados no seu trajecto a inclinação de 45°. Os condensadores mais empregados são os de campo escuro, pois não só iluminam a amostra utilizando toda a energia disponível, como também não permitem a entrada de luz directa na objectiva, facto importante para proteger os olhos do

observador, impedir qualquer tipo de distúrbio na recepção da autofluorescência por parte dos componentes da objectiva e para proporcionar um fundo escuro que vai contrastar com a fluorescência da amostra. Por último, o diafragma é um componente que se localiza junto ao condensador e serve para controlar a abertura angular do cone de luz na iluminação da amostra. [29,30,35]

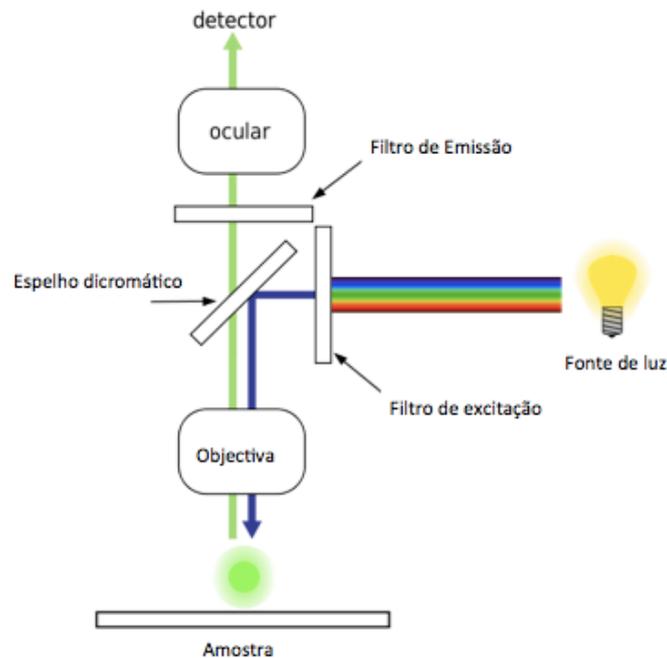


Figura 23. Princípio básico de funcionamento do microscópio de fluorescência. [24]

Princípios gerais de funcionamento

A imagem resultante advém da emissão da radiação electromagnética pelas moléculas, que anteriormente absorveram a excitação primária e posteriormente emitiram uma luz com maior comprimento de onda. Esta técnica é utilizada para detectar substâncias com autofluorescência ou que estejam marcadas com fluorocromos. [29,30,35]

O processo base inicia-se com a absorção de energia pelo átomo, provocando a transição do electrão para um nível de energia superior, ou seja, o átomo fica excitado. Posteriormente o electrão volta ao seu estado de energia inicial emitindo um fóton. [29,30,35]

Resumindo, o princípio de funcionamento do microscópio de fluorescência consiste na irradiação da amostra pela luz de excitação e na separação da luz emitida mais fraca para formar a imagem. Este processo ocorre devido à existência de um filtro de excitação na fonte de luz, que vai deixar passar apenas a radiação com o comprimento de onda coincidente com o material fluorescente presente na amostra (neste caso específico de 470nm). Esta radiação, após passar pelo filtro colide com um espelho dicromático, que vai a reflectir a uma inclinação de 45°, atingindo deste modo os átomos da amostra e provocando consequentemente a transição dos electrões para um nível de energia superior. Quando estes regressam ao seu nível energético de repouso, libertam fótons que voltam a passar pelo espelho dicromático e por um filtro de barreira, de modo a poder ser separada da luz de excitação mais brilhante. Esta separação é facilitada pelo facto de a energia emitida ser mais baixa e ter um comprimento de onda maior (525nm) que a luz primária incidente. [29,30,35]

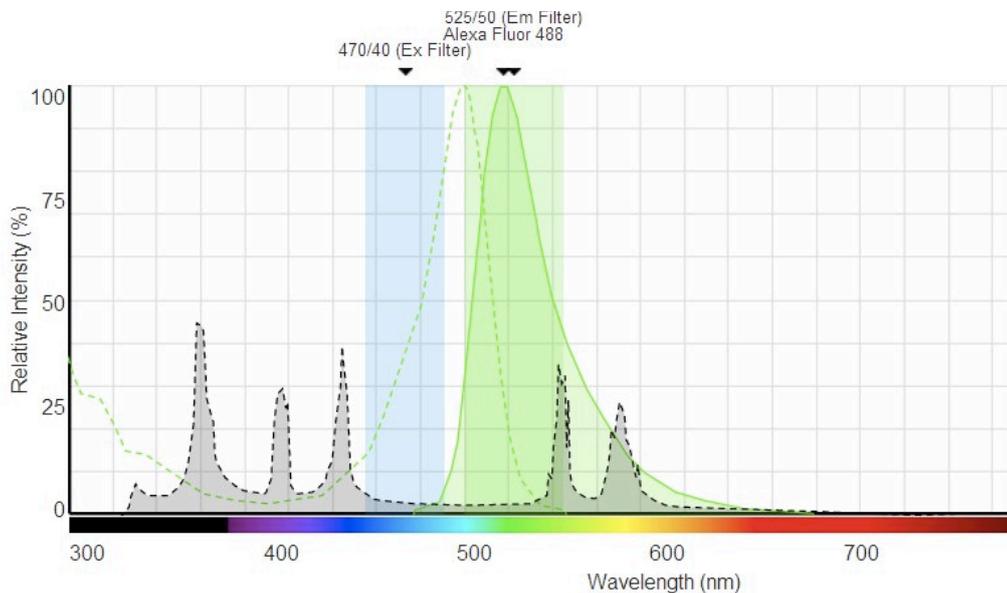


Figura 24. Espectro relativo aos comprimentos de onda de interesse na microscopia de fluorescência por GFP. [35]

Assim, as áreas fluorescentes da amostra são exibidas ao microscópio, contra um fundo escuro de elevado contraste. [29,30,35]

O microscópio de fluorescência possui uma série de aplicações que possibilitam capturar imagens de várias estruturas celulares, como é o caso

da molécula de DNA. O microscópio utilizado neste estudo, *Leica DMIRE2*, juntamente com o seu programa CW 4000, permite obter aquisições de imagens combinadas, já que possibilita sobrepor imagens de fluorescência da amostra, GFP, com imagens de DAPI e de microscopia óptica (*Brigth field*), mesmo quando adquiridas em separado. Além destas características, ainda contém ferramentas para o tratamento de imagem, nomeadamente, o controlo de contraste, brilho e o grau de saturação da imagem. [29,30,35]

DAPI – Marcador fluorescente específico para o DNA

A microscopia por fluorescência é uma técnica que permite estudar estruturas celulares através da emissão de luz de um determinado comprimento de onda, após a sua absorção pelas moléculas de fluorocromo.

Em alguns casos, quando se pretende observar determinadas estruturas celulares é necessário utilizar marcadores específicos fluorescentes de modo a torna-las luminosas e brilhantes, podendo então ser visualizadas ao microscópio com luz UV, contrastando com o fundo preto. [24,36]

DAPI, 4',6'- diamidino - 2- fenilindole, é um dos marcadores fluorescentes mais utilizados para marcar o DNA por técnicas de fluorescência. Esta marcação ocorre nos pares AT dos *sulco menor* da hélice de DNA. Para ser possível a sua visualização é necessário iluminar a amostra com luz ultravioleta, já que o comprimento de onda para a excitação máxima do DAPI é de 358nm, sendo visualizado a azul devido aos complexos AT/DAPI possuírem um comprimento de onda de emissão máxima de fluorescência de 461nm. Deste modo, para provocar a excitação de DAPI pode-se usar um laser UV ou lâmpadas com Xéon ou Mercúrio, enquanto para a detecção da luz emitida utiliza-se um filtro azul/ciano. [24,36]

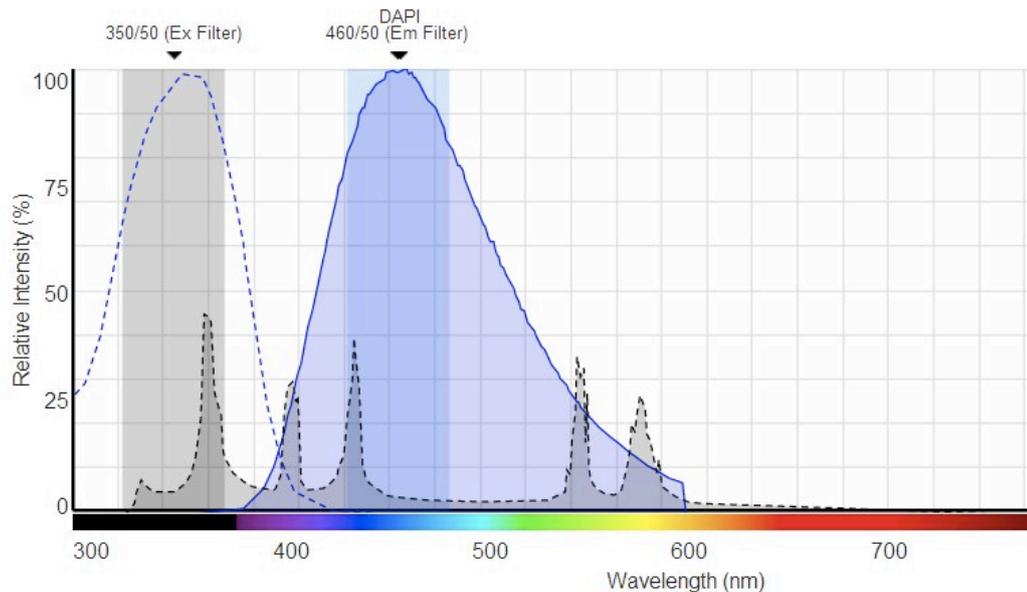


Figura 25. Espectro relativo aos comprimentos de onda de interesse na microscopia de fluorescência por DAPI. [35]

A importância deste marcador para a análise do DNA da amostra, reside na identificação do processo de morte celular programada ou apoptose, uma vez que permite identificar pontos de condensação da cromatina, encolhimento nuclear e formação de corpos apoptóticos. Além disso, ainda possibilita a observação do comportamento da cromatina ao longo da divisão celular: as várias fases de condensação e descondensação da cromatina. [24,36]

Normalmente, a marcação com DAPI realiza-se após outras possíveis marcações, de modo a complementar e acrescentar dados importantes para a análise da amostra em causa. Para esta técnica, não é necessário realizar certos procedimentos, nomeadamente a fixação e a permeabilização da amostra, passos fundamentais noutros marcadores. [24,36]

Preparação de amostras para Microscópio de Fluorescência

Existem vários protocolos para preparar amostras para serem estudadas e observadas ao microscópio de fluorescência, sem afectar ou influenciar a quantificação da fluorescência e do marcador de DNA, DAPI (aspectos de interesse neste estudo). [24,36]

Um dos métodos mais simples e o utilizado neste trabalho consiste em retirar um pedaço de agar previamente selecionado ao microscópio óptico, pois é garantido que se transfere um número de nemátodas e embriões desejável, tendo estes últimos especial interesse neste estudo. Este é disposto numa lâmina que deve ser colocada em contacto com o vapor de etanol, substância conhecida como inibidora da locomoção nestes nemátodas. Neste sentido, o etanol pode ser reservado numa placa de petri e a lâmina posta por cima desta, tendo o cuidado de tapar esta estrutura com a tampa da placa, ficando nesta posição cerca de 10 a 15 minutos. De seguida com o auxílio de uma pipeta adiciona-se 5µl de DAPI (1:1000) no agar presente na lâmina, ficando esta mais 10 a 15 minutos na posição descrita anteriormente. Após este período, a lâmina com o agar é selada com outra lâmina e parafina, ficando pronta para ser observada ao microscópio. [24,36]

Outro protocolo possível porém mais complexo engloba o uso de formaldeído e PBS (tampão fosfato-salino), juntamente com uma solução de agarose. [24,36]

O formaldeído é um composto utilizado para a fixação do material biológico, processo importante na preservação dos nemátodas, uma vez que impede a decomposição *post-mortem* e conserva as estruturas celulares e tecidulares existentes no nemátoda *in vivo*. Assim, ao realizar este processo está-se a impedir a autólise (acção em que as próprias enzimas proteolíticas das células degradam as suas características enquanto esta permanece viva), a putrefacção (degradação proteica por micro-organismos), fermentação e lipólise (destruição de lípidos e glícidos), preservando as características das células e fornecendo alguma rigidez à amostra, o que ajuda em algumas colorações e na execução de cortes finos. Na fixação são adicionados compostos químicos e inorgânicos, aquosos ou não aquosos, que podem originar a precipitação ou a coagulação das proteínas do material biológico, uma vez que normalmente estas soluções actuam sobre os complexos proteicos, mantendo as características iniciais das células. Este processo de manutenção é conseguido através da estabilização das proteínas por parte das reacções que os fixadores provocam, ou seja, eles possibilitam a formação de elos entre os grupos terminais destes componentes celulares. A reacção mais comum entre o formaldeído e a amostra é a produção do

composto metilol. Este composto ao ser reactivo pode condensar-se com um átomo de hidrogénio, formando uma ponte metilénica que são destruídas por hidrólise. Resumidamente, o formaldeído é um agente conservante, que apresenta uma boa penetração nos tecidos sem danificar significativamente a amostra, é um bom fixador que é usado depois de se dissolver em água a 5 ou 10% e que permite cortes da amostra por congelação. Para estudos de imunocitoquímica e microscopia de alta resolução não deve ocorrer fenómenos de desnaturação proteica durante o processo de fixação. [24,36]

Para preparar a base de agarose é necessário pesar 1g de agarose numa folha de papel vegetal, para ser posteriormente introduzida num gobelé. Após a adição de 50ml de água, este é colocado no micro-ondas até ferver e a solução ficar transparente. Com a ajuda de uma pipeta de Pasteur é depositado uma gota de agarose na lâmina, sendo achatada com outra lâmina colocada a 90°, até esta solução ficar completamente espalhada e homogénea. Assim que esta arrefecer é removida a segunda lâmina por deslizamento, tendo o cuidado de não danificar a solução. Posteriormente à preparação da base de agarose, é preciso isolar *C.elegans* da placa de NGM. Neste sentido, é utilizado 0,20ml de formaldeído (1:10) para fixar os nématodas. De seguida, é introduzido 50µl de PBS e 5µl de DAPI (1:1000) na placa, sendo depois levemente agitada para que a solução cubra a sua maior área possível. Por fim é pipetado 30µl da solução, processo facilitado através da inclinação da placa já que vai permitir concentrar os nématodas num só local, para posteriormente serem depositados na lâmina que contém a agarose. A amostra fica completa após ser selada com uma lamela e ser isolada com verniz, material que deve ficar entre a lâmina, base de agarose e lamela. [24,36]

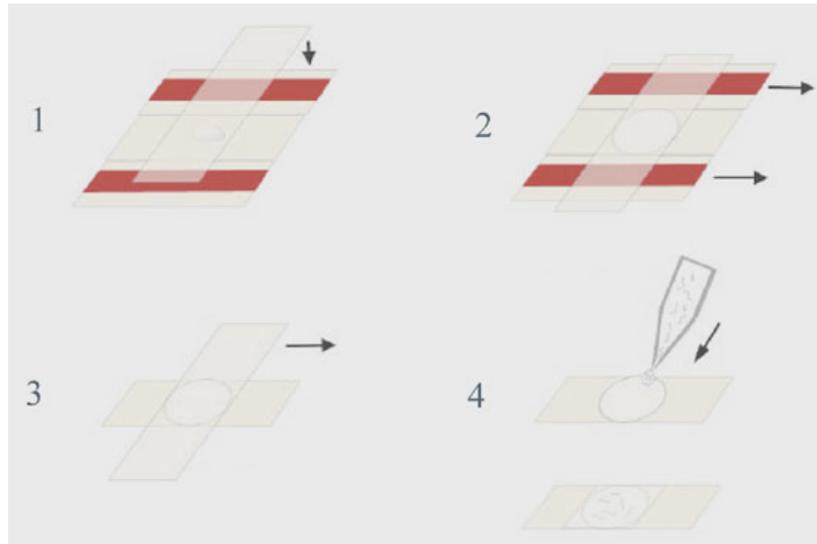


Figura 26. Ilustração da preparação de amostras tendo uma base de agarose de 2%. [36]

Todos estes procedimentos devem ser realizados numa câmara de fluxo laminar, sendo que a manipulação de DAPI deve ser sempre feita com luvas, com luzes directas apagadas (é sensível à luz) e todo o material usado depositado em recipientes destinados a lixo contaminado, uma vez que pode se ligar ao nosso DNA e tem potencial carcinogéneo. [24,36]

Processamento de dados - ImageJ®

O ImageJ® é um programa *freeware* de processamento de imagem em *Java*, desenvolvido no *National Institutes of Health*, que está disponível tanto em domínio online como em qualquer computador com uma virtual *machine* 1.4 ou posterior, sendo compatível com diversos sistemas operativos.[29,37]

Este programa é bastante útil no processamento de imagens, uma vez que permite editar, analisar, processar e guardar imagens de 8 a 32 bits, trabalhando em diversos formatos, nomeadamente, TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM entre outros. Além destas características é um programa multi processos, ou seja, possibilita o processamento de várias imagens em simultâneo. [29,37]

Através deste software é possível obter valores de áreas, distâncias, ângulos, histogramas de densidade, perfis de distribuição e quantificar a fluorescência de cada amostra. [29,37]

Para esta experiência, o ImageJ® foi utilizado com o intuito de obter valores de área (“*area*”) dos embriões de *C.elegans*, a densidade integrada (“*integrated density*”), a média (“*mean gray value*”), o mínimo e o valor máximo de intensidade (“*min & max gray value*”) dos embriões e do background de cada imagem, opções escolhidas numa janela própria do programa (“*Set Measurements*”). Após recolhidos os valores de cada embrião analisado, a fluorescência celular total corrigida (CTCF – *Corrected Total Cell Fluorescence*) foi calculada através de uma fórmula: [29,37,38]

$$CTCF = \text{Densidade integrada} - (\text{área do embrião} \times \text{média de fluorescência de background})$$

Equação 17

Posteriormente à obtenção de todos os valores pretendidos de cada embrião observado, estes foram transcritos para o programa Excel® juntamente com a fórmula anterior, facilitando assim os cálculos. Por último, os valores de CTCF foram organizados em vários gráficos, para uma melhor análise de todos os dados. Este método foi aplicado para a análise de fluorescência uma vez que já tinha sido usado noutros estudos radiobiológicos nomeadamente no “Efeito da Exposição a Ressonância Magnética de elevado campo no desenvolvimento do organismo: *Caenorhabditis Elegans*”, referência 24. [24,37,38]

Efeito da exposição de neutrões no desenvolvimento do organismo *Caenorhabditis Elegans*

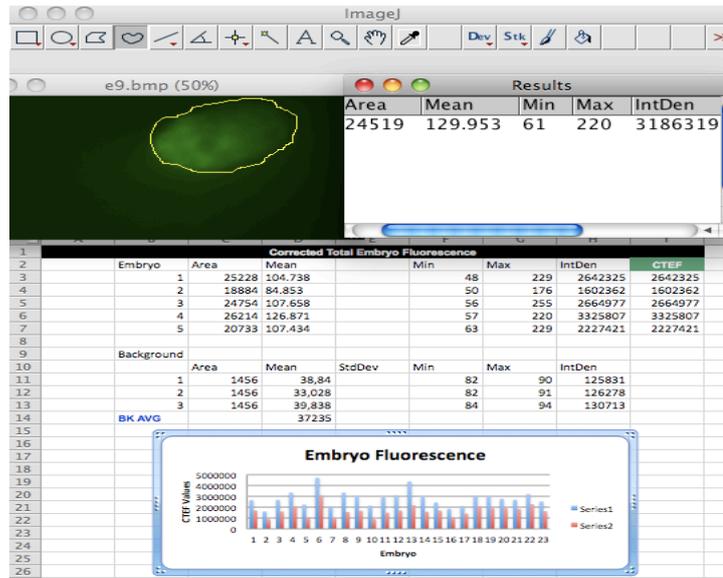


Figura 27 Ilustração do trabalho realizado no ImageJ® e no Excel®, após obtenção das imagens no microscópico de fluorescência

Parte III – Resultados experimentais

Capítulo 1 – Resultados gerais

Como referido anteriormente este trabalho foi dividido em três fases com diferentes intensidades de corrente, nomeadamente de 1 μ Ah, 5 μ Ah, 10 μ Ah, e conseqüentemente diferentes doses absorvidas, como apresentado na tabela 6.

Na primeira fase, o valor de intensidade de corrente no ciclotrão foi de 1 μ Ah sendo a dose absorvida pelos nemátodas de 0,4107 mGy (cálculos explicados anteriormente), com tempo de exposição aproximadamente de 3 minutos. Antes da irradiação foram contabilizados todos os *C.elegans* presentes, tendo especial atenção ao número de adultos grávidos transferidos, que deviam ser constantes em todas as placas de modo a manter as mesmas condições entre elas. A observação e as contagens de *C.elegans* das placas foram conseguidas através do microscópio óptico presente no laboratório.

A recolha de dados quantitativos e a aquisição das imagens de fluorescência foram feitas em 3 períodos de tempo: 72 horas, 120 horas e 168 horas após a irradiação.

Tabela 7. Número de nemátodas presentes em cada placa para $1\mu\text{Ah}$, nos 3 períodos de análise.

		T0=0H	T1=72H	T2=120H	T3=168H
Controlo (Cont)	C.e. c/embriões <i>in utero</i>	5	103	80	170
	Embriões	8	581	282	101
	C.e. Jovens	2	*	*	4103
Placa 1 (P1)	C.e. c/embriões <i>in utero</i>	5	25	111	288
	Embriões	2	317	1051	128
	C.e. Jovens	3	*	*	6029
Placa 2 (P2)	C.e. c/embriões <i>in utero</i>	4	111	142	193
	Embriões	5	1036	373	111
	C.e. Jovens	7	*	*	5537
Placa 3 (P3)	C.e. c/embriões <i>in utero</i>	5	70	69	202
	Embriões	15	1210	354	70
	C.e. Jovens	6	*	*	4680

* Os *C.elegans* jovens não foram contabilizados no período de análise T1 e T2

As medições realizadas em cada placa demonstram que o número de *C.elegans* com embriões *in útero* (adultos grávidos) nas placas expostas à radiação no T3 são sempre superiores à de controlo, assim como o número de *C.elegans* jovens. Este valor aumenta gradualmente com tempo excepto no caso da placa de controlo, em que se verifica uma queda após 120h da exposição, voltando depois a aumentar.

A segunda fase foi executada com o mesmo protocolo que a primeira, sendo a única diferença o valor de intensidade de corrente, $5\mu\text{Ah}$, com dose absorvida pelos *C.elegans* de 2,05mGy e tempo de exposição cerca de 8 minutos.

Tabela 8. Número de nemátodas presentes em cada placa para 5 μ Ah, nos 3 períodos de análise.

		T0=0H	T1=72H	T2=120H	T3=168H
Controlo (Cont)	C.e. c/embriões <i>in utero</i>	3	453	446	303
	Embriões	11	1345	943	384
	C.e. Jovens	6	*	*	8092
Placa 1 (P1)	C.e. c/embriões <i>in utero</i>	3	123	428	382
	Embriões	2	513	2688	432
	C.e. Jovens	1	*	*	9092
Placa 2 (P2)	C.e. c/embriões <i>in utero</i>	3	63	102	212
	Embriões	0	634	1121	620
	C.e. Jovens	1	*	*	5514
Placa 3 (P3)	C.e. c/embriões <i>in utero</i>	3	90	122	316
	Embriões	13	1410	1561	1236
	C.e. Jovens	0	*	*	5760

* Os *C.elegans* jovens não foram contabilizados no período de análise T1 e T2

Nesta segunda experiência, em que a dose absorvida é maior, já não se verifica a condição apresentada anteriormente, isto é, o número de *C.elegans* com embriões *in útero* na placa de controlo no terceiro período de análise não é sempre inferior às expostas a radiação de neutrões, existindo duas (placa 1 e 3) com valores ligeiramente superiores. Também o número de *C.elegans* jovens das placas irradiadas não é superior à que não foi sujeita a irradiação, havendo uma com dados superiores (placa 1). O factor de proporcionalidade directa entre o número de *C.elegans* com embriões *in útero* e tempo, nas placas expostas que se observa na experiência anterior, não ocorre para todas as placas nesta intensidade de corrente, facto verificado apenas na placa 1.

Por último, a terceira fase teve como valor de intensidade de corrente de 10 μ Ah, com respectiva dose absorvida 4,107mGy, tempo de exposição aproximadamente de 17 minutos e protocolo igual às restantes fases.

Tabela 9. Número de nemátodos presentes em cada placa para **10μAh**, nos 3 períodos de análise.

		T0=0H	T1=72H	T2=120H	T3=168H
Controlo (Cont)	C.e. c/embriões <i>in utero</i>	4	69	386	378
	Embriões	7	960	2670	795
	C.e. Jovens	3	*	*	9820
Placa 1 (P1)	C.e. c/embriões <i>in utero</i>	4	28	238	368
	Embriões	11	527	2500	1664
	C.e. Jovens	4	*	*	8148
Placa 2 (P2)	C.e. c/embriões <i>in utero</i>	4	47	114	496
	Embriões	4	969	2000	1348
	C.e. Jovens	2	*	*	8486
Placa 3 (P3)	C.e. c/embriões <i>in utero</i>	5	69	290	188
	Embriões	19	960	2380	946
	C.e. Jovens	3	*	*	9170

* Os *C.elegans* jovens não foram contabilizados no período de análise T1 e T2

Na terceira experiência e de acordo com os dados apresentados na tabela 7, o número de *C.elegans* com embriões *in útero* na placa de controlo após 216h da exposição é superior a duas placas expostas a radiação, 1 e 3, mas inferior a uma, placa 2. Relativamente ao número de *C.elegans* jovens, a placa não sujeita a radiação é sempre superior às expostas. Os valores de *C.elegans* com embriões *in útero* aumenta com o tempo nas placas 1 e 2, sendo que nas restantes, placa 3 e de controlo, esta condição não se verifica.

Através dos dados recolhidos, mais precisamente sabendo a população final e inicial de *C.elegans* nas placas, foi possível calcular o factor de reprodução:

$$\text{Factor de Reprodução (FR)} = \frac{\text{População final (PF)}}{\text{População inicial (PI)}}$$

Equação 16

A população final é calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{População Final} = T3 (\text{sem embriões}) - T0 (\text{sem embriões})$$

Equação 17

Após a obtenção de todos os dados de interesse, estes foram organizados numa tabela para sua melhor compreensão e análise.

Tabela 10. Apresentação dos valores de população final, população inicial, factor de reprodução e média do factor de reprodução para as placas expostas, nas 3 intensidades de corrente utilizadas.

		Pop. Final	Pop. Inicial	FR	Média FR
1µAh	Cont	4266	7	609,429	609,429
	P1	6309	8	788,625	586,814
	P2	5819	11	529	
	P3	4871	11	442,818	
5µAh	Cont	8386	9	931,778	931,778
	P1	9470	4	2367,5	1940,778
	P2	5722	4	1430,5	
	P3	6073	3	2024,333	
10µAh	Cont	10191	7	1455,857	1455,857
	P1	8508	8	1063,5	1242,75
	P2	8976	6	1496	
	P3	9350	8	1168,75	

Posteriormente, com os dados apresentados na tabela 11 elaborou-se o seguinte gráfico:

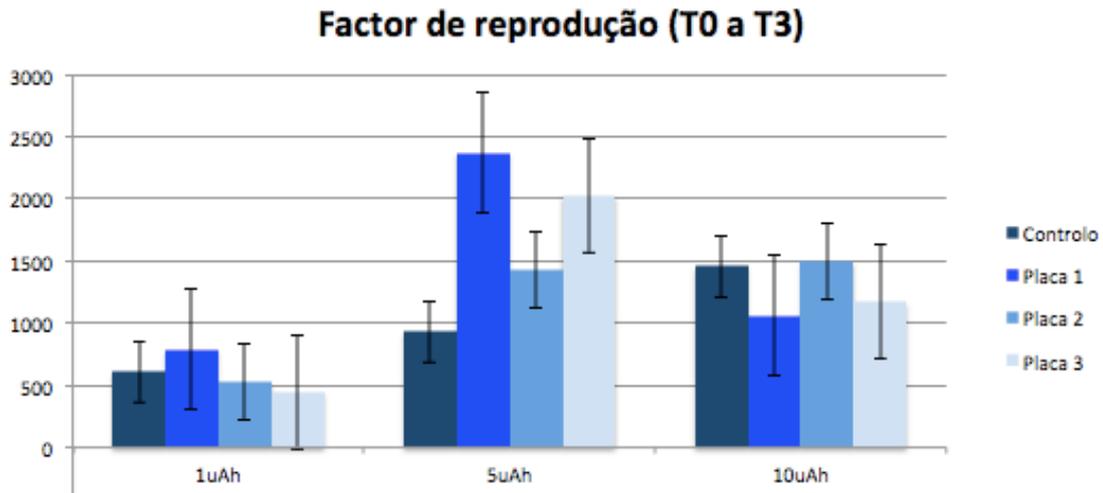


Figura 28. Representação gráfica do factor de reprodução nas 3 intensidades de corrente.

Analisando a tabela 11 e gráfico apresentado na figura 28 verifica-se que relativamente à intensidade de corrente de $1\mu\text{Ah}$, o factor de reprodução da placa de controlo é superior às placas expostas, excepto à placa 1 que neste caso é superior à de controlo. Na experiência 2, ou seja, de intensidade de corrente de $5\mu\text{Ah}$ a placa de controlo é sempre inferior às placas irradiadas por neutrões. Na última experiência, quando a intensidade de corrente é de $10\mu\text{Ah}$, volta-se a verificar o que aconteceu na primeira, isto é, o factor de reprodução obtido na placa de controlo é superior a duas placas expostas, sendo que a placa 2 apresenta valores ligeiramente superiores à de controlo.

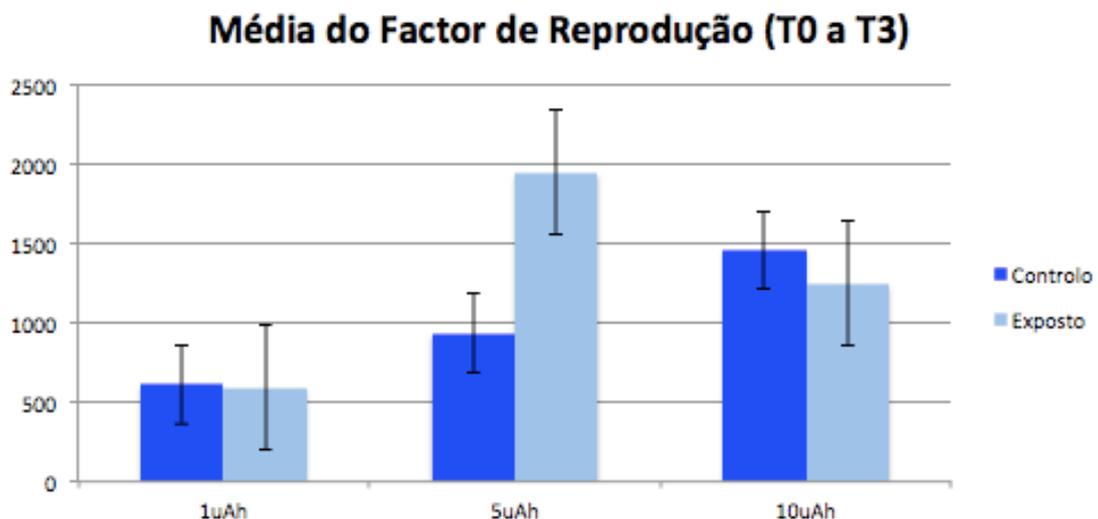


Figura 29. Representação gráfica da média do factor de reprodução das placas expostas e das placas de controlo para as 3 intensidades de corrente.

Através deste último gráfico (figura 29) é possível fazer uma análise global, uma vez que se baseia nas médias das placas expostas comparativamente às placas de controlo. Neste sentido, observa-se que o factor de reprodução nas placas não irradiadas é superior às sujeitas a radiação na intensidade de corrente de 1 μ Ah e 10 μ Ah, sendo que nesta última a diferença é maior. Na experiência 2, a média do factor de reprodução das placas expostas é muito superior à placa de controlo.

Realizou-se posteriormente uma outra experiência nas mesmas condições que as anteriores excepto o tempo de análise, que neste caso foi após 216 horas da exposição, de modo a completar a informação obtida anteriormente. Os seus resultados foram resumidos e organizados numa tabela para melhor compreensão.

Tabela 11. Dados referentes a uma experiência realizada posteriormente, nas mesmas condições que as anteriores mas apenas com um tempo de análise de 216horas após exposição.

		T0= 0h	T4=216h	Pop. Final	Pop. Inicial	FR
Cont	C.e. c/embriões <i>in utero</i>	5	9870	9843	27	364,556
	C.e. Jovens	22				
1μAh	C.e. c/embriões <i>in utero</i>	4	8460	8432	28	301,143
	C.e. Jovens	24				
5μAh	C.e. c/embriões <i>in utero</i>	3	6425	6403	22	291,046
	C.e. Jovens	19				
10μAh	C.e. c/embriões <i>in utero</i>	3	5190	5166	22	234,812
	C.e. Jovens	22				

De acordo com os dados da tabela 12, verifica-se que o número de *C.elegans* neste período de análise diminui com o aumento da intensidade de corrente, ou seja, a placa de controlo corresponde à que apresenta valores mais elevados e a placa exposta a 10 μ Ah possui os valores mais baixos. Esta tendência também ocorre no factor de reprodução, pois a placa de controlo continua a ser a que apresenta valores mais altos e a placa de

10 μ Ah a de valores mais baixos. Elaborou-se um gráfico com todos estes dados, de modo a facilitar a visualização das tendências descrita anteriormente.

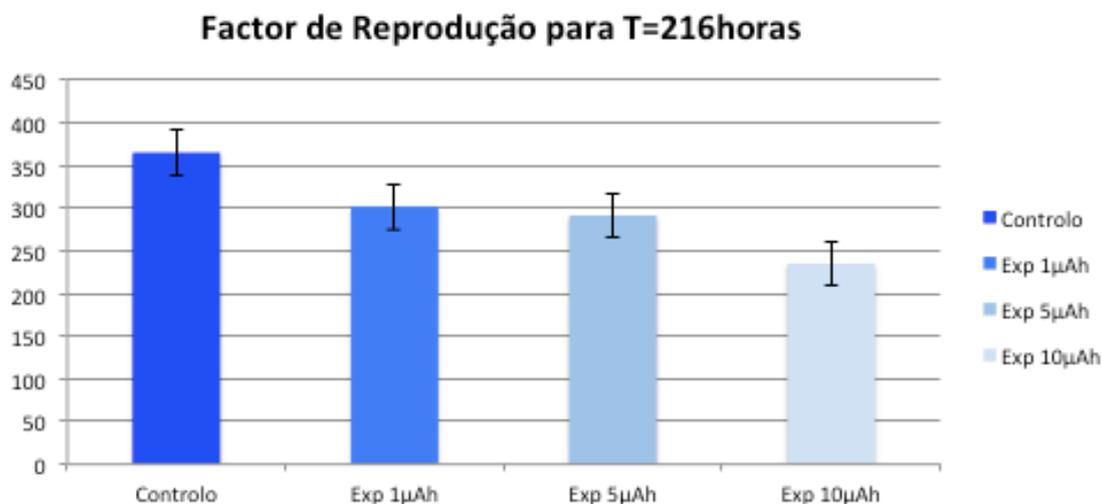


Figura 30. Representação gráfica do factor de reprodução numa experiência posterior com período de análise de 216 horas após exposição.

Todos estes valores foram submetidos ao teste *T-Student* com o intuito de verificar se existem diferenças significativas entre a intensidade de corrente e o factor de reprodução nos dois últimos períodos de análise, uma vez que são amostras independentes, que não estão directamente relacionadas e que apresentam o mesmo número de medições.

Tabela 12. Factor de reprodução nos últimos períodos de análise, 168 horas e 216 horas, para cada intensidade de corrente e respectivo valor do teste *T-Student*.

	Factor de Reprodução	
	T=168h	T=216h
0μAh	999,021	364,5556
1μAh	586,81	301,1429
5μAh	1940,78	291,0455
10μAh	1242,75	234,8181
<i>T-Student</i>	0,0248	0,0015

Devido ao tamanho limitado da amostra os resultados estatísticos devem ser analisados com prudência, no entanto parecem indicar diferenças significativas entre o valor de intensidade de corrente aplicada e o factor de reprodução nestes dois períodos de análise.

Capítulo 2 – Resultados por Microscopia de Fluorescência

Através do microscópio de fluorescência e de todos os métodos que estão na base desta técnica, foi possível estudar o comportamento da proteína fluorescente verde (GFP) quando irradiada por neutrões a diferentes doses. Outro aspecto analisado consistiu na identificação do processo de morte celular programada após utilização de DAPI, marcador fluorescente de DNA.

Todas as imagens adquiridas no microscópio de fluorescência foram analisadas e quantificadas no programa ImageJ®, após selecionar os parâmetros apresentados anteriormente. Os valores de fluorescência foram conseguidos unicamente através da análise de imagens de embriões *ex útero*.

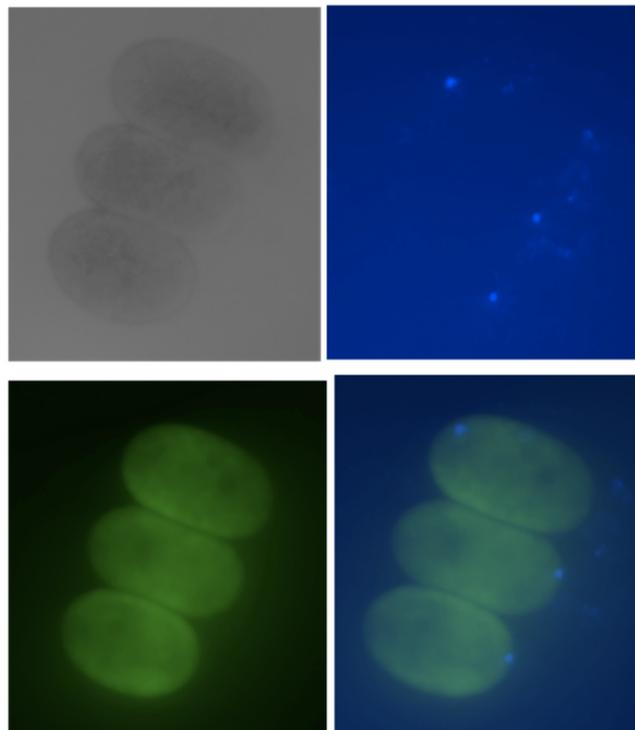


Figura 31. Imagens adquiridas no MF da placa de controlo onde se visualiza 3 embriões na fase de gastrulação, sendo a primeira em *Bright Field*, a segunda DAPI, a terceira GFP e a quarta a fusão de DAPI com GFP.

Após a obtenção de todos valores necessários, estes foram trabalhados no programa Excel® que permitiu organiza-los numa tabela, facilitando assim a sua leitura.

Tabela 13. Valores de Fluorescência de cada placa nas 3 experiências de acordo com os 3 períodos de análise e respectiva média das placas expostas nestes mesmos períodos.

		T1=72h		T2=120h		T3=168h	
		Fluo	Média Fluo	Fluo	Média Fluo	Fluo	Média Fluo
1μAh	Cont	660781,1	660781,1	1471896	1471896	565197,6	565197,6
	P1	1309833	1108560	1614864	1324157	550478,1	673566
	P2	930351,4		1203974		640222,1	
	P3	1085495		1153633		829997,9	
5μAh	Cont	1159717	1159717	1801403	1801403	1783301	1783301
	P1	1404656	1394082	1892032	1695092	1508517	1520996
	P2	1309833		1576418		1398300	
	P3	1467758		1616825		1656171	
10μAh	Cont	2164788	2164788	1845611	1845611	1853414	1853414
	P1	1662141	2059652	1832490	1800986	1678698	1825971
	P2	2230733		1820096		1781673	
	P3	2286083		1750372		2017543	

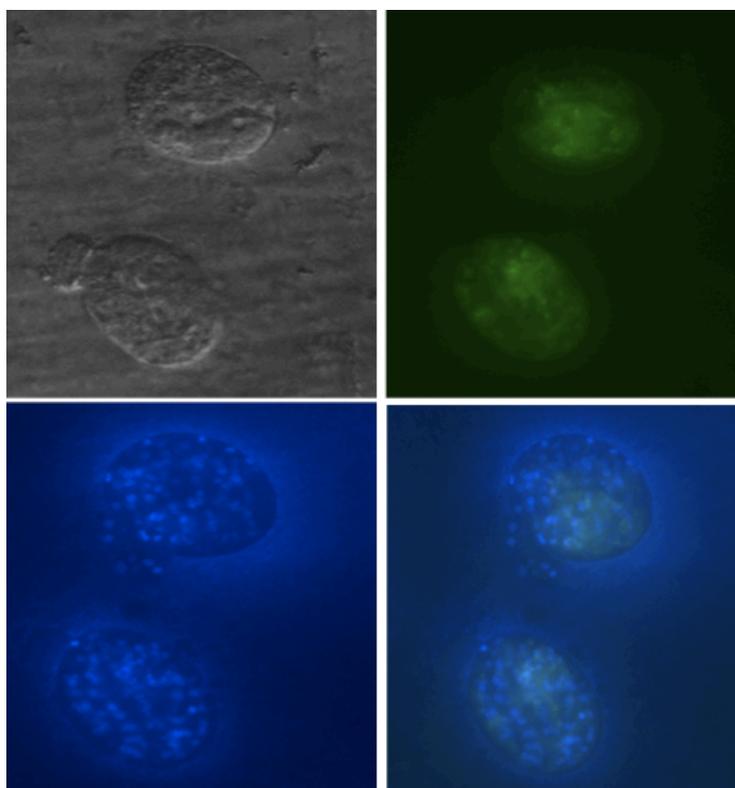


Figura 32. Conjunto de imagens obtidas por MF de embriões na fase de gastrulação, após 168 horas da irradiação e expostos a 10 μ Ah, em que se visualiza possíveis sinais de apoptose, sendo a primeira imagem em Brigh Field, a segunda DAPI, a terceira GFP e a quarta a fusão destas três.

Posteriormente elaborou-se um gráfico que representa todos os valores indicados na tabela 13, contudo antes da sua realização fez-se a normalização dos dados de modo a simplificar a sua análise, sendo assim um gráfico com valores normalizados da fluorescência basal.

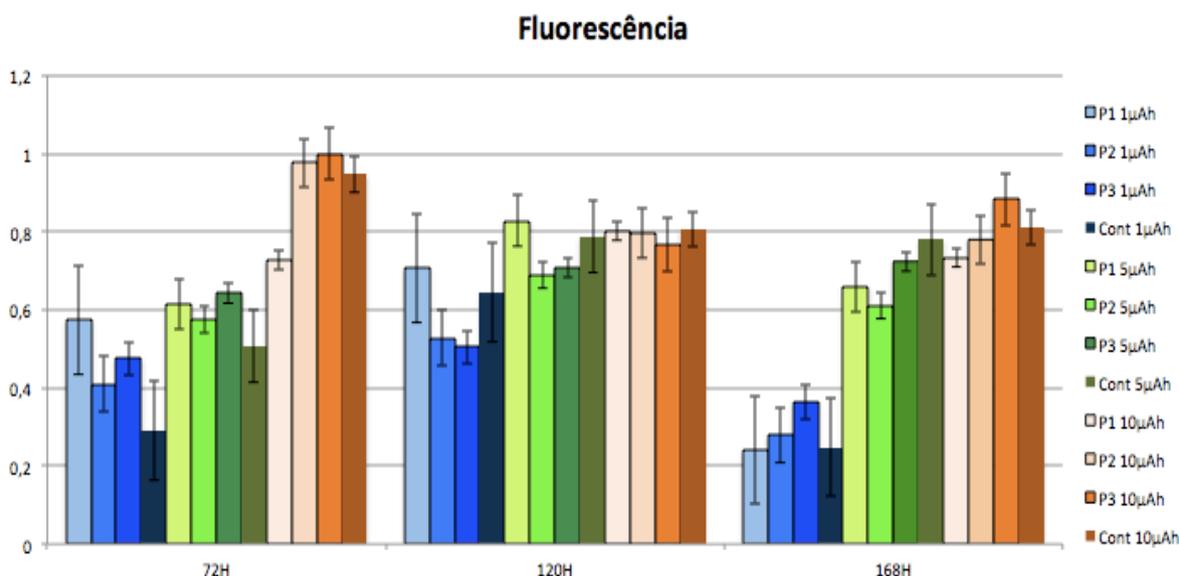


Figura 33. Representação gráfica dos valores normalizados da fluorescência de cada placa nas 3 experiências, de acordo com os 3 períodos de análise.

Na tabela 13, relativamente à primeira experiência, observa-se que os valores de fluorescência atingem o seu máximo após 120 horas da exposição, e o seu mínimo a 168 horas. No período de 72 horas a placa de controlo apresenta valores sempre inferiores às expostas, a 120h é superior a duas placas (2 e 3) e inferior a uma (1), facto que também se verifica a 168h, alterando apenas as placas a que é inferior e superior. Analisando de uma forma geral, ou seja, as médias da fluorescência, observa-se que a placa de controlo é inferior às placas expostas no primeiro e último período, sendo superior no segundo período.

Em relação à intensidade de corrente de 5μAh, a placa de controlo é inferior às expostas no primeiro período de análise, superior a duas (2 e 3) e inferior a uma irradiada (1) no segundo período e superior a todas expostas no terceiro período. Tendo em conta as médias de fluorescência, a placa de

controlo é inferior às sujeitas a radiação no período de 72h, mas superior nos restantes dois períodos, 120 e 168 horas.

Na terceira experiência a 72 horas a placa de controlo apresenta valor de fluorescência superior a uma placa exposta (1) e inferior a duas (2 e 3). A 120 horas, o seu valor é superior a todas as placas irradiadas e a 168h é superior a duas (1 e 2) e inferior a uma placa exposta (3). Observando apenas as médias de fluorescência, a placa de controlo tem sempre valores superiores às irradiadas por neutrões.

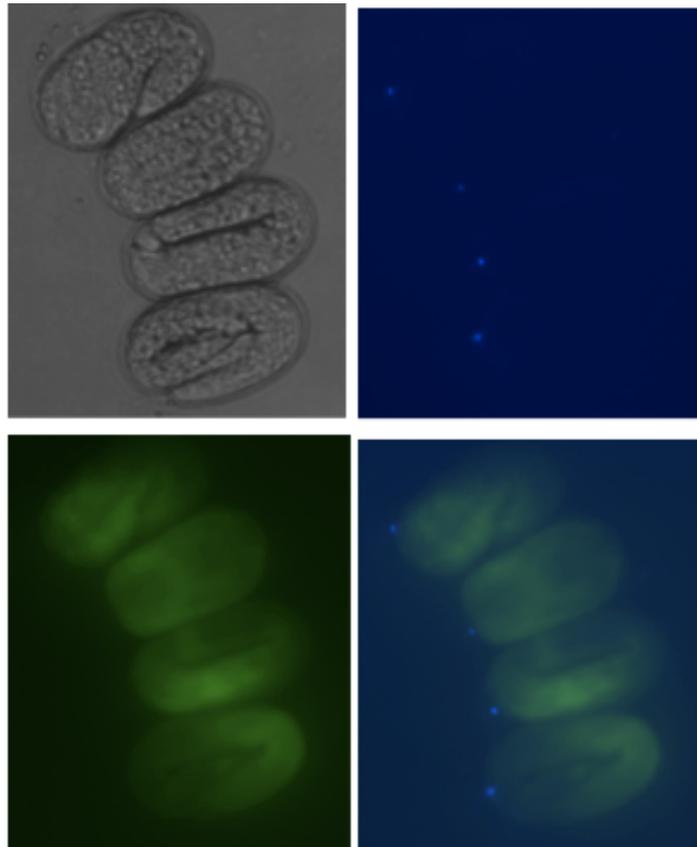


Figura 34. Imagens adquiridas no MF de 3 embriões na fase de gastrulação, após 72horas da irradiação expostos a 1 μ Ah, sendo a primeira imagem em Brighth Field, a segunda DAPI, a terceira GFP e a quarta a fusão de DAPI com GFP.

Além destes valores de fluorescência, foram também calculadas as médias de fluorescência das placas de controlo e das expostas ao longo dos 3 períodos de análise nas 3 experiências

Tabela 14. Valores médios de fluorescência nos 3 períodos de análise, nas placas expostas a irradiação e nas não expostas, de acordo com as 3 experiências.

	1 μ Ah	5 μ Ah	10 μ Ah
Média Fluo exposta	1035428	1536723	1895536
Média Fluo Controlo	899291,6	1581471	1954604

Os dados presentes na tabela 14 estão representados graficamente de modo a ser mais fácil observar as variações mencionadas.

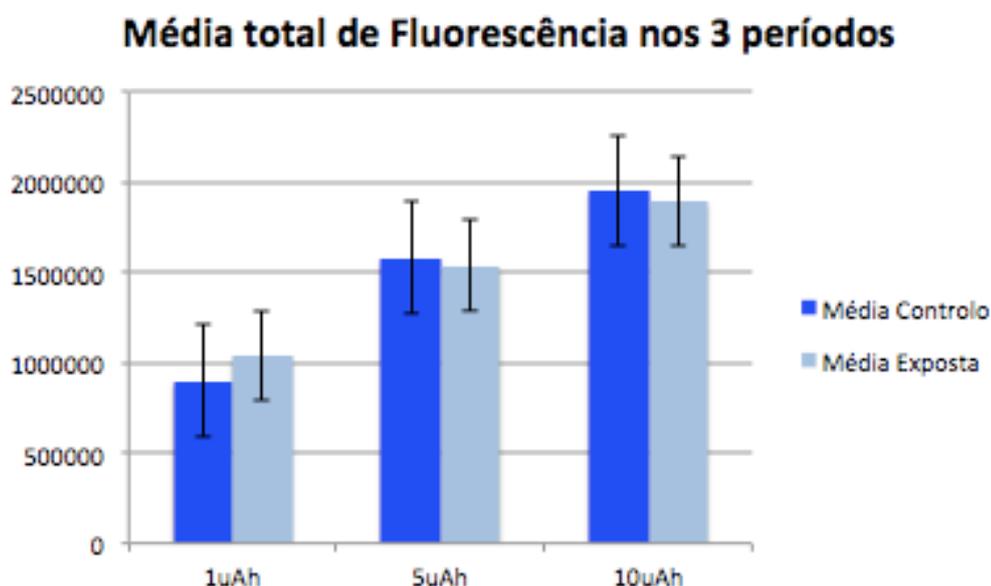


Figura 35. Representação gráfica dos valores médios de fluorescência das placas expostas e das não expostas nos 3 períodos de análise, nas respectivas intensidades de corrente.

Analisando a tabela 14 ou o gráfico da figura 35, verifica-se um aumento dos valores de fluorescência com o aumento da intensidade de corrente. A média da fluorescência das placas de controlo é superior às expostas na segunda e na terceira experiência, sendo inferior quando a intensidade de corrente é de 1 μ Ah.

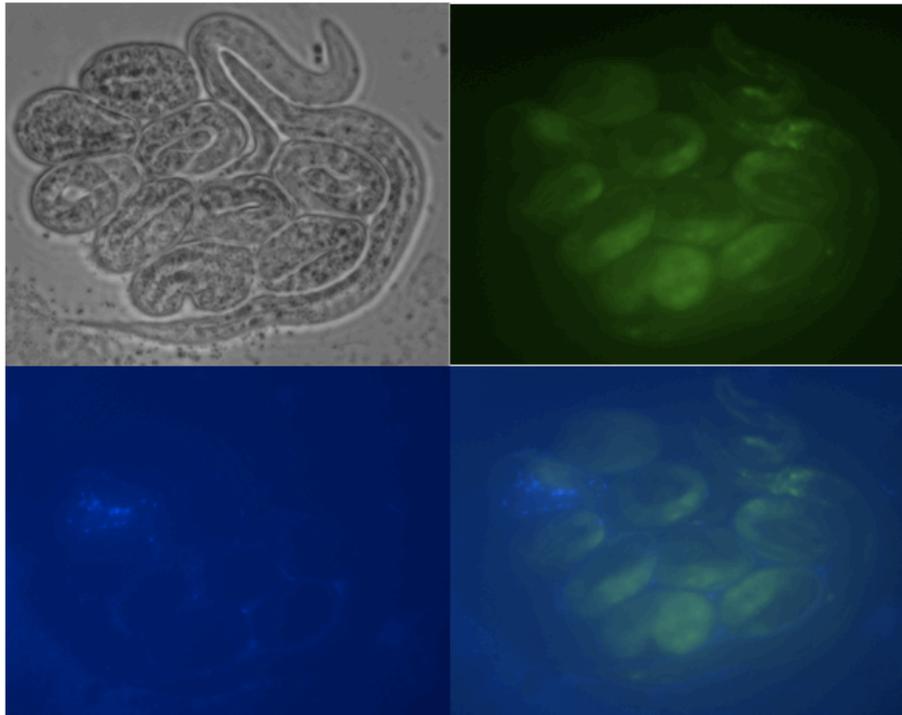


Figura 36. Conjunto de imagens obtidas por MF de embriões em diferentes fases de desenvolvimento (desde gastrulação até pretzel) e de nemátodos jovens, após 72 horas da irradiação e expostos a 5 μ Ah, em que se visualiza possíveis sinais de apoptose num dos embriões. A primeira imagem corresponde a Brighth Field, a segunda DAPI, a terceira GFP e a quarta a fusão das duas últimas.

Como referido anteriormente, realizou-se uma outra experiência nas mesmas condições que as primeiras 3 mas com um tempo de análise mais prolongado, em que se obteve os resultados descritos na tabela 15.

Tabela 15. Valores de fluorescência de uma experiência realizada posteriormente com tempo de análise de 216 horas após exposição.

	Controlo	1 μ Ah	5 μ Ah	10 μ Ah
T4=216h	650508,2	338273,7	360539,9	522362,8

Observando os dados indicados na tabela 15, verifica-se que a placa de controlo apresenta maior valor de fluorescência que as placas expostas às diferentes intensidades de corrente. No entanto, a placa irradiada a 10 μ Ah tem valor de fluorescência superior à irradiada a 5 μ Ah, tendo esta valor superior à irradiada a 1 μ Ah. Esta informação está representada no próximo gráfico, sendo a sua leitura mais evidente.

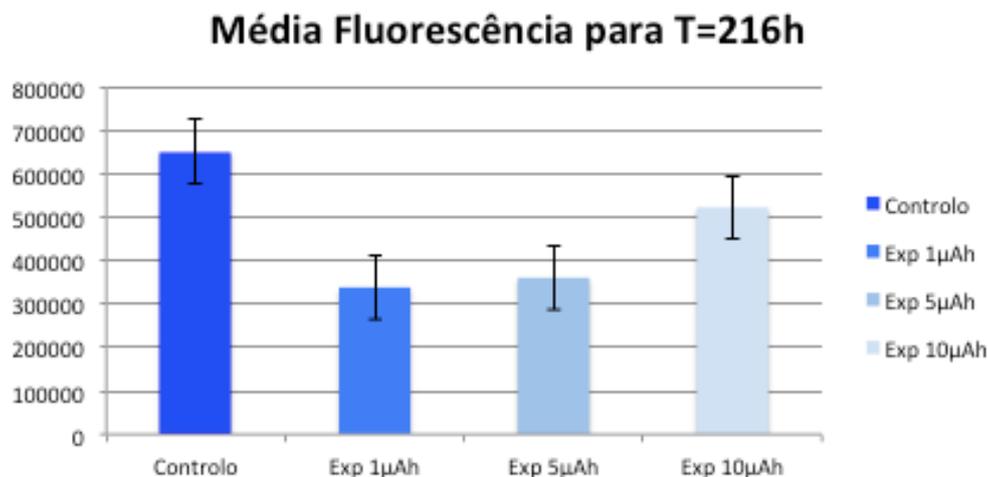


Figura 37. Representação gráfica dos valores de fluorescência de uma experiência realizada posteriormente com tempo de análise de 216 horas após irradiação.

Posteriormente a estes cálculos, foi aplicado o teste T-Student de modo a verificar se existe diferenças significativas entre a intensidade de corrente e a fluorescência nos 4 períodos de análise, uma vez que são amostras independentes que não estão directamente relacionadas e que apresentam o mesmo número de medições.

Tabela 16. Valores de fluorescência em cada período de análise para cada intensidade de corrente e respectivo valor do teste T-Student.

	Fluorescência			
	72h	120h	168h	216h
0µAh	1328428,7	1706303,33	1400637,53	650508,2
1µAh	1108560	1324157	673566	338273,7
5µAh	1394082	1695092	1520996	360539,9
10µAh	2059652	1800986	1825971	522362,8
T-Student	0,00556	0,00058	0,0115	0,0078

Os resultados estatísticos devem ser analisados com prudência devido ao tamanho reduzido da amostra, porém parecem indicar diferenças significativas entre os valores de fluorescência em cada período de análise e a respectiva intensidade de corrente aplicada.

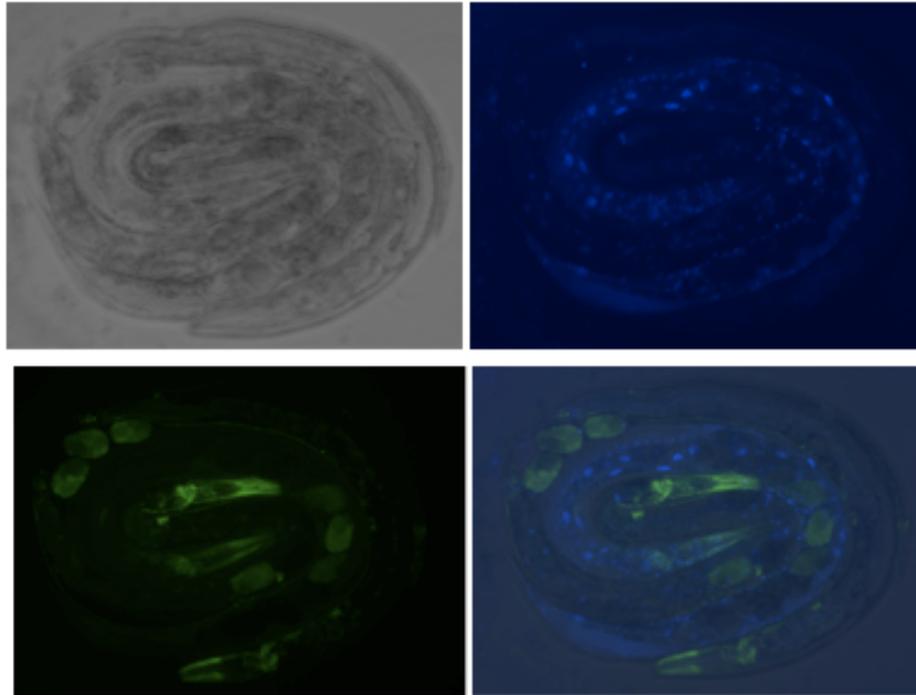


Figura 38. Imagens adquiridas por MF de dois nemátodos adultos, com embriões *in útero*, após 120 horas da irradiação expostos a $5\mu\text{Ah}$, sendo a primeira imagem em Brighth Field, a segunda DAPI, a terceira GFP e a quarta a fusão das três.

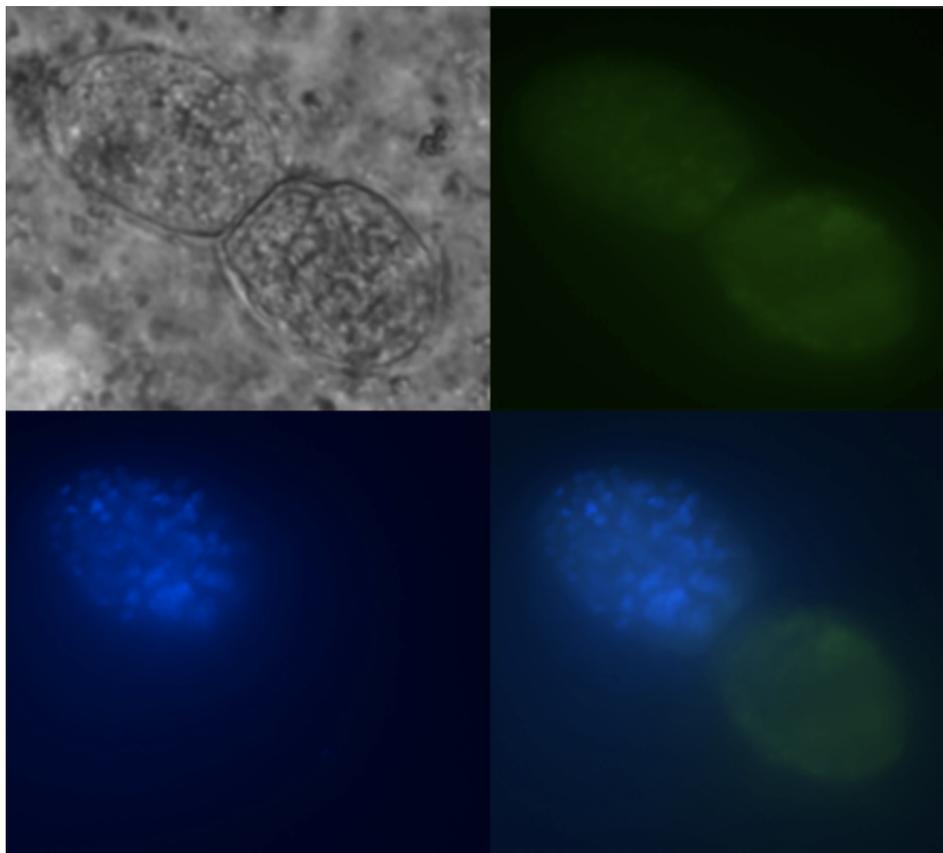


Figura 39. Imagens obtidas por MF de dois embriões na fase de gastrulação, após 168 horas da irradiação expostos a $10\mu\text{Ah}$, sendo a primeira imagem em Brighth Field, a segunda DAPI, a terceira GFP e a quarta a fusão das últimas duas.

Parte IV – Discussão de resultados

Os primeiros resultados apresentados são referentes ao número de *C.elegans* presentes em cada placa nos 3 períodos iniciais de contagens e no período adicional posterior, ou seja, a população de nemátodas existente em cada placa para cada intensidade de corrente após 72, 120, 168 e 216 horas da irradiação.

Na experiência 1 μ Ah a população de nemátodas de controlo apresenta um factor de reprodução ligeiramente superior à média das populações expostas. Na intensidade de corrente de 5 μ Ah verifica-se o contrário, ou seja, a média das placas irradiadas é muito superior à população de controlo. A 10 μ Ah a população não exposta volta a ser superior à população irradiada, tendo em conta apenas as médias do factor de reprodução. De acordo com estes aspectos comprova-se que existe uma alteração na reprodução dos nemátodas quando expostos a diferentes intensidades de neutrões.

Os resultados obtidos na primeira intensidade de corrente sugerem que a esta intensidade os mecanismos de recuperação celular são suficientes para reparar os possíveis danos que possam surgir com esta dose absorvida. A 5 μ Ah os estudos citados anteriormente não são suficientes para explicar estes resultados. Contudo, segundo alguns investigadores como por exemplo Thomas D. Luckey, “em doses baixas podem ocorrer efeitos benéficos no organismo exposto”, efeito designado de **Hormesis**. [39]

O efeito Hormesis indica que a radiação ionizante a baixas doses pode não ser prejudicial mas sim benéfica para os organismos irradiados. Alguns autores vão mais longe e defendem mesmo que pode ser um factor essencial à vida como outros elementos, pois acreditam que a radiação de baixa dose estimula certas funções biológicas. Takaji Ikushima descreve em parte o mecanismo que está na base deste efeito: baixas doses interagem nas moléculas de DNA e induzem a síntese proteica que vão corrigir estas moléculas, inicialmente danificadas. Russ VK também afirma que baixas doses podem provocar uma resposta do sistema imunológico dos organismos, tornando-os mais resistentes a certas doenças. O aumento da resistência a

infecções, o tratamento de lesões, o aumento da radioresistência e o aumento do crescimento e desenvolvimento do organismo são outras possíveis consequências do efeito Hormesis. [39]

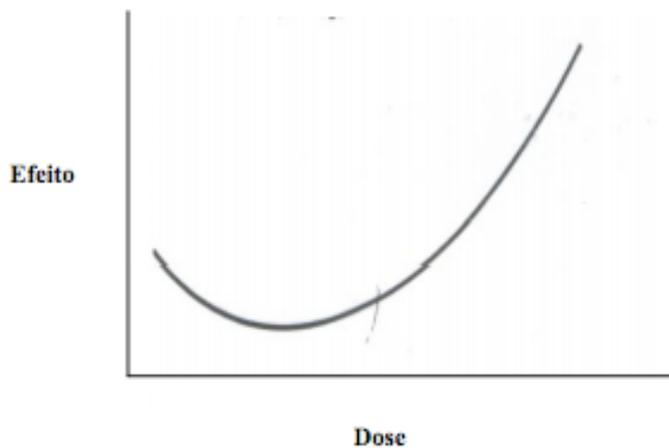


Figura 40. Efeito Hormesis – efeito em função de baixas doses [Ronald 1985, referência 39]

Este efeito pode ajudar a explicar os resultados obtidos na primeira e na segunda experiência em que o factor de reprodução das placas expostas é próximo ou mais elevado que a população de controlo, podendo este facto indicar que entre estas energias ocorre um efeito benéfico no organismo sujeito a radiação. Sendo $5\mu\text{Ah}$ a intensidade em que ocorre a maior discrepância do factor de reprodução entre a população controlo e a exposta, pode sugerir ser a energia limiar em que ocorre o máximo benefício da radiação nos *C.elegans*.

Os resultados obtidos na experiência 3, isto é, de intensidade de corrente de $10\mu\text{Ah}$ estão de acordo com as teorias defendidas por muitos autores, teorias estas referidas na introdução deste trabalho. Resumidamente, muitos investigadores acreditam e comprovaram com a elaboração de diversos estudos, que elevadas doses de radiação ionizante provocam alterações negativas nos organismos, desde modificações no seu comportamento, mutações e mesmo morte. Neste caso, os mecanismos desencadeados após irradiação não são suficientemente eficazes para reparar todas as possíveis lesões ocorridas nas células.

Observando os valores de factor de reprodução no global, estes tendem a aumentar com a dose provavelmente devido a possíveis variações

de temperatura no laboratório, pois foi desenvolvida em diferentes alturas com conseqüentes variações na temperatura exterior, considerando que o seu desenvolvimento ideal ocorre entre 20° a 25°C.

A análise feita após 216 horas da exposição revela que o factor de reprodução na população de controlo passa a ser superior a todas as intensidades de corrente aplicadas sendo a de 1µAh a mais próxima e a de 10µAh a mais distinta do seu valor. Os valores nesta última intensidade confirmam novamente os estudos indicados anteriormente: os mecanismos de recuperação celular não foram eficazes na reparação dos possíveis danos celulares originados pela radiação, resultando numa diminuição do número de nemátodas presentes nas placas. A notória diminuição do factor de reprodução nas intensidades de 1µAh e 5µAh comparando com a de controlo no período de análise mais prolongado, 216 horas, está de acordo com o designado período de latência explicado na parte introdutória do trabalho. Este período corresponde ao tempo decorrido entre o momento em que o organismo é exposto à radiação e o aparecimento de lesões não reparadas pelos mecanismos de recuperação celular, facto que pode justificar estes resultados a 216 horas após irradiação.

O estudo por microscopia de fluorescência incidiu principalmente nos embriões de uma estirpe de *C.elegans* uma vez que um dos objectivos deste estudo reside em avaliar o desenvolvimento do sistema nervoso dos *C.elegans* quando expostos a neutrões. Neste sentido, além de ser a fase em que se inicia este processo (fase embrionária) é também a fase mais radiosensível, aspecto defendido e explicado pela Lei de Bergonié e Tribondeau, apresentada no início do trabalho.

Relativamente aos resultados obtidos de fluorescência verifica-se que esta aumenta consoante o aumento da intensidade de corrente aplicada, sendo a média das placas expostas superior à de controlo apenas a 1µAh.

Quanto maior a fluorescência maior a expressão da proteína codificada pelo gene *UNC-119*, gene este interligado com o desenvolvimento do sistema nervoso. Comparando apenas a população de nemátodas expostas e a de controlo numa só intensidade, a expressão desta proteína nas placas expostas é superior à de controlo a 1µAh, e inferior a 5µAh e a 10µAh.

Os resultados a 1 μ Ah indicam que a esta intensidade de corrente as proteínas codificadas pelo gene *UNC-119* têm maior expressão e consequentemente maior actividade relativamente à placa de controlo, provavelmente por desencadear mecanismos de recuperação celular eficazes para os possíveis tipos de lesões celulares demonstrando um correcto desenvolvimento do sistema nervoso dos nemátodos, facto apoiado pelos valores apresentados de factor de reprodução, já que a média das placas expostas é pouco inferior à placa de controlo. Nas restantes intensidades o valor de fluorescência das populações expostas é inferior à população de controlo. Estes resultados podem significar que a estas doses absorvidas a expressão da proteína não é tão acentuada como acontece nas populações não expostas, indicando que ou os mecanismos de recuperação próprios das células não são completamente activados ou que não são suficientes, resultando num desenvolvimento mais lento ou mesmo inexistente do sistema nervoso dos nemátodos.

Após 216 horas da exposição a neutrões a intensidade com maior valor de fluorescência a seguir à de controlo é a 10 μ Ah, sendo a de 1 μ Ah a mais baixa. Este facto pode indicar que apesar de existir maior expressão da proteína codificada pelo gene *UNC-119* e consequentemente maior activação dos mecanismos de recuperação celular, estes não são suficientes para reparar os possíveis danos que possam surgir no sistema nervoso após irradiação (referidos no início do trabalho), ou seja, sendo a intensidade em que ocorre maior probabilidade de existir lesões, como observado pelo factor de reprodução que é o mais baixo, é necessário existir maior reparação celular. No entanto e apesar de estar presente essa maior reparação, já que a fluorescência é maior, ela não é totalmente capaz de corrigir todos os danos causados na radiação. Como explicado nos capítulos iniciais, as células quando expostas a radiação tendem a executar certos mecanismos que vão permitir corrigir as possíveis alterações, contudo, eles podem ser eficazes, ineficazes ou incorrectos, sendo estes dois últimos insuficientes para o correcto desenvolvimento do organismo. Resumindo, quanto maior a fluorescência maior a expressão da proteína codificada pelo gene *UNC-119* devido aos mecanismos de recuperação celular desencadeados, que por sua vez podem ser eficazes ou não, isto é, apesar de estarem presentes podem

ser suficientes ou não na recuperação das células após irradiação. Estes resultados juntamente com os verificados nas outras duas intensidades, sugerem que neste período de análise ocorrem lesões não corrigidas pelos mecanismos de recuperação, defendendo a definição do período de latência: período decorrido entre o momento da irradiação e o aparecimento das primeiras lesões.

O aumento do valor de fluorescência com o aumento da intensidade pode se dever ao facto de as condições atmosféricas no exterior terem variado podendo ter influenciado a temperatura no laboratório, como explicado anteriormente no factor de reprodução.

As imagens obtidas por DAPI não foram conclusivas uma vez que não sendo um objectivo primordial a sua análise não foi intensiva como no caso de fluorescência. Contudo conseguiu-se obter algumas imagens em que se verifica a possível existência de morte celular programada, ou seja, apoptose.

Parte V – Conclusão

A exposição de um feixe de neutrões no organismo *C.elegans* revelou provocar uma variação no factor de reprodução consoante a variação da intensidade de corrente aplicada. Deste modo, é possível concluir que existe uma correlação entre a energia de um feixe de neutrões e os parâmetros analisados, pois os valores obtidos neste estudo sugerem a presença de efeitos radiobiológicos que dependem da dose absorvida.

A análise do factor de reprodução a 1 μ Ah e 10 μ Ah permitiu verificar que existe uma diferença significativa entre estas duas intensidades, sendo que a última provoca maiores alterações quando comparado à população de controlo. A partir deste facto e considerando todas as informações e estudos anteriores é possível comprovar a existência de mecanismos de recuperação celular que são activos quando o organismo é exposto a um factor externo como é o caso da radiação. Estes permitem corrigir erros e alterações celulares que advém desses factores, no entanto nem sempre são correctos ou eficazes, como acontece na maior intensidade de corrente. Também se verificou uma possível energia limiar, 5 μ Ah, pois nesta intensidade o factor de reprodução é muito superior ao de controlo.

Após 216 horas da exposição os factores de reprodução diminuíram em relação ao de controlo, o que significa uma redução do número de nématodas das populações expostas, o que pode sugerir a ocorrência de alterações a nível celular e molecular.

Os resultados por microscopia de fluorescência também revelam alterações, nomeadamente a 1 μ Ah, o que permite concluir que nesta intensidade as proteínas codificadas pelo gene *UNC-119* têm maior expressão e por isso são mais eficazes para reparar as possíveis lesões originadas após exposição. Com esta técnica comprovou-se novamente a existência do período de latência, pois numa avaliação mais tardia observa-se um aumento da expressão do gene a 10 μ Ah, que apesar de estarem presentes os mecanismos de recuperação, estes não são suficientes.

A avaliação por DAPI não foi conclusiva uma vez que as imagens obtidas com actividade apoptótica anormal não foram significativas, não

revelando alterações no desenvolvimento biológico embrionário nas três exposições.

Os resultados apresentados neste trabalho corroboram com dados provenientes de outras experiências realizadas com outros modelos biológicos, nomeadamente o rato, a *medaka* e a *Drosophila melanogaster*, estudos apresentados nas referências 40 a 45. [40 a 45]

Estes estudos demonstram uma relação entre a dose aplicada e os efeitos biológicos provocados, ou seja, quanto maior a energia do feixe de neutrões, mais graves são os efeitos radiobiológicos originados. Deleções nas bases do DNA, quebra de uma ou de ambas as cadeias do DNA, modificações na recombinação genética, mutações, apoptose celular e aumento da taxa de mortalidade são os efeitos prováveis quando estes modelos biológicos são sujeitos a irradiação por neutrões, sendo as duas últimas consequências máximas da exposição. [40 a 45]

Devido às características, nomeadamente por possuírem um RBE elevado, apresentam uma significativa facilidade para originarem lesões desde a fase embrionária nos respectivos organismos, influenciando o desenvolvimento do sistema nervoso, entre outros. Além disto e dependendo do tipo e do local da lesão as gerações futuras podem também ser afectadas.[40 a 45]

O tamanho do organismo sujeito a exposição, as características do feixe de neutrões e a geometria da irradiação são algumas variáveis que podem influenciar os tipos de efeitos biológicos provocados nos organismos modelos. [40 a 45]

Em suma, é fundamental acompanhar a evolução das terapias por radiação com estudos que avaliem os efeitos radiobiológicos que possam surgir na interacção da radiação com diferentes modelos biológicos, de forma a otimizar as técnicas aplicadas no tratamento de patologias no ser humano.

Parte VI – Perspectivas futuras

A radiobiologia tornou-se numa área de estudo muito importante, principalmente com o avanço nas tecnologias de diagnóstico e terapêutica. Deste modo é importante conhecer e classificar todos os possíveis efeitos consequentes da interação da radiação com o meio.

Neste estudo o organismo modelo, *C.elegans*, foi exposto a três intensidades de corrente, nomeadamente 1 μ Ah, 5 μ Ah e 10 μ Ah, e analisado em quatro períodos de tempo: 72 horas, 120 horas, 168 horas e 216 horas após irradiação. Uma possível continuação deste projecto passa pela aplicação de intensidades de corrente mais elevadas ou entre 5 μ Ah e 10 μ Ah e pelo prolongamento do período de observação, ou seja, continuar a análise após 216 horas da exposição, de forma a poder estudar outras possíveis consequências, como por exemplo mutações ou alterações de comportamento.

Os resultados obtidos por microscopia de fluorescência foram exclusivamente através da análise dos embriões, no entanto de forma a complementar o estudo também se pode analisar a fluorescência do anel nervoso dos *C.elegans* adultos, ficando deste modo mais completo.

Este projecto não teve como objectivo principal a observação de *C.elegans* com DAPI, contudo num estudo futuro o protocolo com este marcador pode ser optimizado de forma a estudar ao pormenor se existe alguma correlação entre a ocorrência de morte celular programada e a intensidade de corrente aplicada, completando assim a informação obtida neste trabalho.

Um próximo estudo pode também incluir técnicas de biologia molecular, nomeadamente Western blotting, uma vez que é um método empregado na imunodeteccção de proteínas após a sua separação por eletroforese em gel e transferência para membrana absorvente. A partir desta técnica é possível detectar, caracterizar e quantificar inúmeras proteínas, sendo por isso interessante comparar os valores da intensidade de fluorescência presentes neste estudo com os possíveis valores que esta técnica em específico permite obter. [46]

Parte VII – Bibliografia

1. Zamboni, C. *Fundamentos da Física de Nêutrons*. 1.ed. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007.
2. Ferreira, R.; Pontedeiro, E.; Xavier, A. e Filho, P. *Segurança Nuclear e Proteção do Meio Ambiente*. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2004.
3. Demarco, G. *Simulação Monte Carlo em Terapia de Câncer por Captura de Nêutrons pelo Boro (BNCT) utilizando a plataforma GEANT4*. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.
4. Barroso, D. *A Física dos Explosivos Nucleares*. 2.ed. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2009.
5. Pinto, M. *Implementation of Cyclotron - Based Neutron Beamline: A Viability Study*. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Coimbra, 2010.
6. Salgado, A. *Avaliação da resposta dos monitores de área para Nêutrons em campo de Radiação gerado por um Acelerador clínico de 15MeV*. Dissertação (Mestrado em Radioproteção e Dosimetria), Instituto de Radioproteção e Dosimetria. Rio de Janeiro, 2011.
7. Lima, J. *Física em Medicina Nuclear, Temas e aplicações*. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2008.
8. International Atomic Energy Agency. *Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students*. Viena, 474- 512, 2010. Página Consultada a 7 de Maio de 2013,< http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/TCS-42_web.pdf>
9. Choppin, G.; Lijenzin, J. e Rydberg, J. *Radiochemistry and Nuclear Chemistry*. 3ed. Elsevier, 2002.
10. Raw, I.; Mennucci, L. e Krasilchik, M. *A Biologia e o Homem*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2001.
11. Azevedo, C. e Sunkel, C.; *Biologia Celular e Molecular*. 5.ed. Lousã: LIDEL – edições técnicas lda, 2012

12. Consiglio, A. e Ramos, A. *Efeitos Biológicos das Radiações*. UFRGS – Instituto de Biociências, 2011. Página consultada a 9 de Maio de 2013, < <http://www.ilea.ufrgs.br/radioisotopos/11.pdf>>.
13. International Atomic Energy Agency. *Basic Radiobiology*. Review of Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students, Viena, 397-412, 2005. Página consultada a 7 de Maio de 2013, < http://www.irsn.fr/fr/professionnels_sante/documentation/documents/syllabus_chapitre_14.pdf>.
14. Nouailhetas, Y. *Radiações Ionizantes e a vida*. Comissão Nacional de Energia Nuclear. Rio de Janeiro. Página consultada a 9 de Maio de 2013, <http://www.cnen.gov.br/ensino/apostilas/rad_ion.pdf>.
15. Pereira, M. *Optimização de um sistema de dosimetria individual para monitorização de extremidades*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Física). Universidade de Lisboa, faculdade de ciências. Lisboa, 2009.
16. Leitão, A. e Gomes, R. *Radiobiologia e Fotobiologia*, capítulo VI. UFRJ – Instituto de biofísica Carlos Chagas Filho, 1994.
17. Flores, F. e Maria, D. *Terapia de Captura de Nêutrons pelo Boro (BNCT) no Tratamento do Câncer*. Goiânia: Enciclopédia Biosfera, v.7, n.12. Centro Científico Conhecer, 2011
18. Campos, T. “Considerações sobre a Terapia de Captura de Nêutrons pelo Boro”. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 46(3):283-292. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2000
19. Machado, A.; Fortes, E. e Tijero, M. “A Física da Terapia de Captura de Nêutrons pelo Boro”. *Revista Brasileira de Ensino da Física*, v.32, n.4. Universidade Estadual Paulista. São Paulo, 2010
20. Schwartz, D.; Einck, J.; Bellon, J. e Laramore, E. *Fast Neutron Radiotherapy for Soft Tissue and Sarcomas at High Risk for Local Recurrence*. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, vol.50, n.2, pp. 449-456. Estados Unidos da América, 2001
21. Jones, D. e Wambersie, A. *Radiation Therapy with Fast Neutrons: A Review*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 580: 522-525. 2007
22. Altun, Z. e Hall, D. *WormAtlas*. Página consultada a 3 de Dezembro de 2012,

<<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>>

23. Diogo, A. e Mota, M. *Caenorhabditis elegans: modelo biológico para o século XXI*. Laboratório de Nematologia/ICAM. Universidade de Évora. Évora, 2001.
24. Faustino, R. *Efeito da Exposição a Ressonância Magnética de Elevado Campo no Desenvolvimento do Organismo: Caenorhabditis Elegans*. Dissertação (Mestrado em Biologia do Desenvolvimento), Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologias. Lisboa, 2009.
25. Waksman Student Scholars. *C.elegans as a Model System*. Página consultada a 4 de Janeiro de 2013, <<http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/introduction/worms.html>>.
26. Gilbert, S. *Biologia do Desenvolvimento*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2008
27. Grivicich, I.; Regner, A. e Rocha, A. “Morte Celular por Apoptose”. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007: 53(3): 335-343. Universidade Luterana do Brasil. Brasil, 2007
28. Stiernagle, T. *Maintenance of C.elegans*. The C.elegans Research Community, WormBook. University of Minnesota. Minneapolis, 2006. Página consultada a 3 de Dezembro de 2012, <http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.pdf>.
29. Dinis, J. *Sistema para Imagiologia de Fluorescência de Pequenos Animais*. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra. Coimbra, 2010.
30. Moreira, D. e Lins, U. “Técnicas de Microscopia para quantificação e identificação de microrganismo”. *Revista Saúde e Ambiente*, v.5, n.2. Universidade do Grande Rio – Unigranrio. Rio de Janeiro, 2010.
31. Farias, F. “GFP: Uma ferramenta brilhante para a visualização da vida”. *Revista Virtual de Química*, v.1, n.1. Universidade Federal Fluminense, Brasil, 2009

32. Viviani, V. e Bechara, E. “Um prêmio Nobel por uma Proteína Brilhante”. *Revista Química Nova na Escola*, n.30. Brasil, 2008.
33. Maduro, M.; Pilgrim, D.; *Identification and Cloning of unc-119, a Gene Expressed in the Caenorhabditis elegans Nervous System*. Department of Biological Sciences. University of Alberta. Canada, 1995
34. Knobel, K.; Davis, W.; Jorgensen, E. e Bastiani, M. *UNC-119 suppresses axon branching in C.elegans*. Department of Biology. University of Utah. Estados Unidos da América, 2001
35. Spring, K.; Davidson, M. *Introduction to Fluorescence Microscopy*. *Microscopy*, The source of Microscopy Education. Página consultada a 10 de Março de 2013, <<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>>.
36. Shaham, S. *Methods in cell biology*. The C.elegans Research Community, WormBook. The Rockefeller University. New York, 2006. Página consultada a 3 de Dezembro de 2012, <http://www.wormbook.org/chapters/www_intromethodscellbiology/intromethodscellbiology.pdf>.
37. Colhins, T. *ImageJ, Image Processing and Analysis in Java*. Wright Cell Imaging Facility. Toronto western Research Institute. University Health Network. Toronto, 2012
38. Burgess, A. e Vigneron, S. *Loss of Human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PPA balance*. *Proc Natl Acad USA*, v.7. Estados Unidos da América, 2010
39. Rêgo, F. *As radiações no Ensino*. Dissertação (Mestrado em Física para o Ensino). Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. Lisboa, 2004
40. Kuhne, W. *et al. Biological Effects of High-Energy Neutrons Measured In Vivo using a Vertebrate Model*. Radiation Research Society. *Radiat Res*. 2009
41. Delfin, A. *et al. Genetic effects induced by neutrons in Drosophila melanogaster I. Determination of absorbed dose*. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Mexico, 2001

42. Lee, H. *et al.* *Relative Biological Effectiveness of Fast Neutrons in a Multiorgan Assay for Apoptosis in Mouse*. Wiley Periodicals, Inc. Environ Toxicol 23. 2008
43. Yoshikawa, I.; Hoshi, M. e Ikenaga, M. *Distinct difference in relative biological effectiveness of ²⁵²Cf neutrons for the induction of mitotic crossing over and intragenic reversion of the white-ivory allele in Drosophila melanogaster*. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Elsevier Science B. V. 1996
44. Watanabe, H.; Toyoshima, M.; Ishikawa, M. e Kamiya K. *Paternal monoenergetic neutron exposure results in abnormal sperm, and embryonal lethality and transgenerational tumorigenesis in mouse F₁ offspring*. Research Institute for Radiation Biology and Medicine. Hiroshima University. Japão, 2010
45. Ishida, Y. *et al.* *Dose-Response and Large Relative Biological Effectiveness of Fast Neutrons with Regard to Mouse Fetal Cerebral Neuron Apoptosis*. J.Radiat. Res, v.47, n.7. 2006
46. Miguel, M.; Menezes, L. e Araújo, E. *Western Blotting: a técnica e aplicações na pesquisa e rotina diagnóstica em medicina veterinária*. Goiânia: Centro Científico Conhecer, Enciclopédia Biosfera, v.8, n.15. 2012
47. *Apoptose- Morte celular programada*. Página consultada a 3 de Dezembro de 2012, <www.virtual.unifesp.br/unifesp/bio40/apoptose/index-5>.