

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA NUCLEAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA VIABILIDADE DE LINHAGENS  
RADIOSENSÍVEL E RESISTENTE EM CINÉTICAS DE TAXA  
E DOSE DE RADIAÇÃO COM COBALTO-60**

Barbara Miranda Motta

Belo Horizonte  
2012

Barbara Miranda Motta

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA VIABILIDADE DE LINHAGENS  
RADIOSENSÍVEL E RESISTENTE EM CINÉTICAS DE TAXA  
E DOSE DE RADIAÇÃO COM COBALTO-60**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Técnicas Nucleares da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências e Técnicas Nucleares.

Área de Concentração: Ciências e Técnicas Nucleares

Linha de pesquisa: Radiações Ionizantes

Orientadora: Dra. Patrícia Lima Falcão

Co-orientador: Dr. Tarcísio Passos Ribeiro de Campos

Belo Horizonte  
Escola de Engenharia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2012

M917a

Motta, Barbara Miranda.

Avaliação *in vitro* da viabilidade de linhagens radiosensível e resistente em cinéticas de taxa e dose de radiação com cobalto-60 [manuscrito] / Barbara Miranda Motta. – 2012.  
60 f., enc.: il.

Orientadora: Patrícia Lima Falcão.

Co-orientador: Tarcísio Passos Ribeiro Campos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Bibliografia: f.56-60.

1. Engenharia nuclear – Teses. 2. Radiação ionizante – Teses. 3. Mamas – Câncer – Teses. I. Falcão, Patrícia Lima. II. Campos, Tarcísio Passos Ribeiro de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 621.039(043)

## AGRADECIMENTOS

À equipe da Radioterapia e da Física Médica do Hospital Luxemburgo, em especial ao Dr. Humberto Galvão Dias, pela colaboração com os cálculos e sugestões para realização dos experimentos.

Aos companheiros de sala Bruno, João e Reginaldo, pelas piadas, conversas e brincadeiras compartilhadas.

À Carla, Bruno e Fabiano, cujas colaborações foram essenciais.

Ao Zé, pela Factor que tanto facilitou meu trajeto.

Ao Douglas e Do Carmo, pela presença.

Ao Lucas Dias, pela grande ajuda ao final.

*“Viva la Vida”*

## RESUMO

O câncer de mama é uma doença de importância notável, sendo motivo de séria preocupação por parte das políticas de saúde pública. Estudos *in vitro* utilizando linhagens provenientes de tumores da mama têm se mostrado eficientes no que diz respeito à compreensão dos efeitos biológicos decorrentes das radiações ionizantes, especialmente os que ocorrem em escala celular.

O presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar o comportamento *in vitro* da linhagem de adenocarcinoma mamário MDA MB-231 que apresenta, geralmente, comportamento radorresistente em tratamentos radioterápicos, e de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), que compõem as linhagens envolvidas diretamente na resposta imunológica e são sensíveis à radiação. Essas linhagens foram submetidas a feixes de radiação de baixa LET (Linear Energy Transfer) de acordo com uma cinética de doses pré-determinadas (2, 4, 6, 8 e 10 Gy), com duas taxas de exposição distintas, sendo a última um quarto da primeira. As coletas pós-irradiação foram realizadas nos tempos pré-estabelecidos de 24, 48 e 72 horas.

A viabilidade celular após a cinética de irradiação apresentada para as PBMC apontou uma diminuição da Densidade Óptica (DO) diretamente proporcional ao aumento das doses administradas. Já a viabilidade celular da linhagem MDA MB-231 não apresentou uma diminuição acentuada em relação ao controle na menor dose administrada (2 Gy); apenas na dose mais extrema (10 Gy) houve uma diferença significativa entre controle e cultura irradiada. Entretanto, em todos os ensaios, mantendo constante a dose e assumindo duas taxas de dose, foi observado que, para a taxa de dose representativa de um quarto da padrão, as células irradiadas tiveram uma melhor recuperação entre 48 e 72 horas, indicando que o tempo de exposição à radiação influencia nas respostas celulares. Foi possível observar claramente a correlação entre a dose de radiação administrada e a viabilidade celular. As diferenças no tempo de recuperação celular frente a taxas de dose diferentes mostram a importância do planejamento terapêutico, uma vez que os efeitos da radiação tornam-se diferentes quando esta é aplicada variando-se o tempo e a distância.

## ABSTRACT

Breast cancer is a disease of great significance, being reason of a deep concern of the public health politics. *In vitro* studies using strains from breast tumors have shown to be efficient regarding the comprehension of biological effects due to the ionizing radiation, especially those that occur at a cellular level.

This study aimed to evaluate and compare the behavior *in vitro* of the breast adenocarcinoma MDA MB-231, that usually shows a radioresistant behavior in radiotherapy treatments, and of the peripheral blood mononuclear cells (PBMC), that compose the lineages directly involved in the the immune response and are sensitive to radiation. These lineages were submitted to low LET (Linear Energy Transfer) radiation beams according to a kinetic of predetermined doses (2, 4, 6, 8 and 10 Gy), with two distinct exposition rates, the last one being a quarter of the first. The post irradiation collections were performed in predetermined times of 24, 48 and 72 hours.

The cellular viability after the irradiation kinetics presented to the PBMC had shown the decrease of the Optic Density (OD) directly proportional to the increase of the administered doses. Although the cellular viability of the MDA MB-231 had not shown a marked decrease in relation to the control on the smallest administered dose (2 Gy), the extreme dose (10 Gy) had a significant difference between control and irradiated culture. However, in all assays maintaining constant the dose and employing two dose rates, it was observed that for the dose rate representing a quarter of the standard, the irradiated cells had a better recover between 48 and 72 hours, indicating that the time of exposure to radiation influences the cellular responses. It was clearly possible to observe the correlation between the dose of radiation administered and the cellular viability. The differences in the times of cellular recover against to the different dose rates show the importance of therapeutical planning once that radiation effects become different when it is applied varying time and distance.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1 Garrafas T-25 em processo de irradiação .....	21
Figura 5.2 Incorporação e metabolização de MTT em células controle de MDA MB-231 após 24h. Visualização ao microscópio óptico no aumento de 100 .....	22
Figura 5.3 Aparelho de radioterapia Gammatron 580 – Hospital Luxemburgo/Belo Horizonte .....	25
Figura 5.4 Esquema de irradiação considerando as duas taxas de dose utilizadas	25
Figura 6.1 Viabilidade de células PBMC <i>in vitro</i> irradiadas a 2 Gy, taxa de dose X. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. * representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem *. ( $p < 0,05$ ) .....	30
Figura 6.2 Viabilidade de células PBMC <i>in vitro</i> irradiadas a 2 Gy, taxa de dose X/4. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. * representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem *. ( $p < 0,05$ ) .....	31
Figura 6.3 Viabilidade de células PBMC <i>in vitro</i> irradiadas a 4 Gy, taxa de dose X. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. * representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem *. ( $p < 0,05$ ) .....	33
Figura 6.4 Viabilidade de células PBMC <i>in vitro</i> irradiadas a 4 Gy, taxa de dose X/4. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. * representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem *. ( $p < 0,05$ ) .....	33
Figura 6.5 Viabilidade de células PBMC <i>in vitro</i> irradiadas a 6 Gy, taxa de dose X. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. * representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem *. ( $p < 0,05$ ) .....	35



Figura 6.6 Viabilidade de células PBMC *in vitro* irradiadas a 6 Gy, taxa de dose X/4. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. (p < 0,05) .....36

Figura 6.7 Viabilidade de células PBMC *in vitro* irradiadas a 8 Gy, taxa de dose X. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. (p < 0,05) .....37

Figura 6.8 Viabilidade de células PBMC *in vitro* irradiadas a 8 Gy, taxa de dose X/4. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. (p < 0,05) .....38

Figura 6.9 Viabilidade de células PBMC *in vitro* irradiadas a 10 Gy, taxa de dose X. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. (p < 0,05) .....39

Figura 6.10 Viabilidade de células PBMC *in vitro* irradiadas a 10 Gy, taxa de dose X/4. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. (p < 0,05) .....40

Figura 6.11 Células PBMC irradiadas com Cobalto-60 após 72 horas. Aumento de 200x e 400x .....41

Figura 6.12 Viabilidade de células MDA MB-231 *in vitro* irradiadas a 2 Gy, taxa de dose X. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. (p < 0,05) .....42

Figura 6.13 Viabilidade de células MDA MB-231 *in vitro* irradiadas a 2 Gy, taxa de dose X/4. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. (p < 0,05) .....42

Figura 6.14 Viabilidade de células MDA MB-231 *in vitro* irradiadas a 10 Gy, taxa de dose X. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. (p < 0,05) .....44

Figura 6.15 Viabilidade de células MDA MB-231 *in vitro* irradiadas a 10 Gy, taxa de dose X/4. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. (p < 0,05) .....45

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 OBJETIVO.....	13
3 JUSTIFICATIVA.....	14
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
5.1 Material de cultura empregado .....	22
5.2 Linhagens celulares e manutenção das culturas .....	23
5.3 Separação das células PBMC .....	23
5.4 Irradiação das células com Cobalto-60.....	24
5.5 Coleta das amostras .....	27
5.6 Teste de MTT .....	27
5.7 Análise estatística .....	28
6 RESULTADOS E ANÁLISES.....	29
6.1 Viabilidade de células PBMC após irradiação com 2, 4, 6, 8 e 10 Gy .....	29
6.1.1 Viabilidade a 2 Gy .....	30
6.1.2 Viabilidade a 4 Gy .....	32
6.1.3 Viabilidade a 6 Gy .....	35
6.1.4 Viabilidade a 8 Gy .....	37
6.1.5 Viabilidade a 10 Gy .....	39
6.2 Viabilidade da linhagem MDA MB-231 após irradiação com 2 e 10 Gy .....	41
6.2.1 Viabilidade a 2 Gy .....	41
6.2.2 Viabilidade a 10 Gy .....	44
7 DISCUSSÃO .....	46
8 CONCLUSÕES .....	51

# 1 INTRODUÇÃO

A carcinogênese é um processo no qual a função fisiológica normal das células vivas é alterada, resultando em crescimento anormal e incontrolável de determinado órgão ou tecido (POLLOCK *et al.*, 2006).

O conhecimento de que o câncer provém do descontrole dos mecanismos de divisão celular é relativamente recente. Sabe-se que a divisão celular é controlada por uma rede de sinais que atuam em sinergia, determinando o momento exato da divisão, a sua frequência e como os erros ocorridos podem ser reparados. Mutações em um ou mais segmentos desta rede podem desencadear crescimentos tumorais. No entanto, é pouco provável que uma única alteração genética ou um único agente explique o câncer. Os estudos de suas causas têm sido, em grande parte, de caráter epidemiológico, com o suporte de estudos que envolvem técnicas de biologia celular e molecular (FENTIMAN, 1993; SANTOS; MELLO, 2008).

Dentre os estudos desenvolvidos na oncologia, encontram-se investigações de agentes possivelmente relacionados ao desenvolvimento, desencadeamento e/ou inibição do câncer, tais como genes, enzimas, quimioterápicos, radiações ionizantes, hormônios, receptores celulares, entre outros.

A radioterapia representa parte integrante do tratamento primário conservador do carcinoma mamário, com o objetivo de se obter um melhor controle tumoral *in situ* (ZUCALI, 1992; LIU, 2009). O estudo dos efeitos das radiações ionizantes em nível celular é importante para a compreensão da indução de alguns fenômenos, dentre os quais se encontra a apoptose (TAMAMOTO *et al.*, 1999; ANDRADE, 2002).

Apoptose é a morte celular programada que ocorre em resposta a determinados estímulos, como: fatores de crescimento, toxinas, radicais livres, cálcio, agentes oxidantes, agentes mutagênicos, glicocorticóides, infecções virais, supressão hormonal, etc. Trata-se de um processo de autodestruição celular modulado, que leva grupos de enzimas a atuarem nos meios intra e intercelular. Seu principal objetivo é a manutenção da fidelidade genética do organismo, minimizando a variação fenotípica e eliminando as alterações genotípicas (VALLE, 1999; LAN, 2008).

Dentro desse contexto, é importante avaliar as células cancerosas irradiadas para se conhecer a relação entre a dose de radiação recebida, o percentual de apoptose induzida e a viabilidade celular. Dessa forma, é possível verificar os efeitos deletérios das radiações ionizantes, de modo a auxiliar na definição do tratamento a ser seguido. Posteriormente, estudos da expressão de determinados receptores tumorais frente a essas exposições poderão ser realizados, dando continuidade a esse estudo.

## 2 OBJETIVO

Avaliar e comparar, por meio da viabilidade celular, o comportamento *in vitro* de uma linhagem de adenocarcinoma mamário (MDA MB-231) e de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) antes e após exposição a cinéticas de doses e taxas de doses de radiação gama.

### 3 JUSTIFICATIVA

A linhagem MDA MB-231 apresenta comportamento usualmente radorresistente, enquanto as PBMC, células envolvidas na resposta do sistema imune às agressões de natureza endógena e exógena, são bastante sensíveis à radiação.

Esse tipo de estudo, utilizando linhagens celulares cultivadas *in vitro*, torna-se valioso na expectativa de fornecer suporte aos pesquisadores na compreensão da resposta biológica de linhagens cancerosas a variações de doses e taxas de dose, muitas vezes presentes durante os processos de irradiação no tratamento radioterápico.

É observado que sob uma determinada exposição terapêutica, a variação da taxa de dose pode interferir na resposta de tratamentos de câncer e mesmo na resposta a doenças radioinduzidas.

Experimentos preliminares realizados pelo Núcleo de Radiações Ionizantes (NRI) do Departamento de Engenharia Nuclear (DEN) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) já haviam demonstrado alterações na viabilidade da linhagem celular PBMC, altamente radiosensível, e da linhagem de câncer de mama MDA MB-231, radorresistente, numa cinética de dose de radiação. Entretanto, não foi investigada a cinética em função da taxa de dose (ANDRADE, 2002).

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A radioterapia é uma das opções terapêuticas para o tratamento do câncer. A resposta celular à radiação ionizante produz um espectro de efeitos que vão desde a interrupção do crescimento até a morte celular por apoptose, senescência, necrose ou catástrofe mitótica, e autofagia (ILYENKO *et al.*, 2011). A apoptose é a principal causa de morte celular induzida pela radiação; entretanto, tumores sólidos provenientes de células epiteliais apresentam resistência à apoptose induzida por radiação (CHEN *et al.*, 2010).

Sendo a radioterapia estabelecida no tratamento do câncer de mama para aumentar tanto o controle local como a sobrevida, o desafio para este século é minimizar a morbidade causada por este tratamento, sem perder sua eficácia (COLES *et al.*, 2005).

O objetivo da radioterapia moderna é alcançar um índice terapêutico favorável, levando as células malignas a perderem a sua clonogenicidade e preservando ao máximo os tecidos normais.

A radiação gama, utilizada nos tratamentos de radioterapia para o câncer de mama, é classificada como ionizante. As radiações ionizantes, ao interagirem com os tecidos vivos, podem causar diversos danos celulares. Estas interações podem ser desde completamente reparadas, tornando-se inócuas, até tão graves que levem à morte celular, passando pelos seus possíveis efeitos mutagênicos ou de diminuição da função celular (MURAD; KATZ, 1996).

O planejamento de aplicação das radiações ionizantes está relacionado à radiosensibilidade e resistência celular, que são associadas à atividade mitótica das células em estudo e/ou alvo. Quanto mais indiferenciado e proliferativo o tecido, mais sensível à radiação e, no outro extremo, quanto mais diferenciado e estável, mais resistente.

Uma ampla variedade de sistemas bioquímicos celulares é ativada pela radiação ionizante. É provável que lesões a esses alvos desencadeiem uma expressão gênica alterada. As etapas do ciclo celular podem ser alteradas ou interrompidas, levando as células a entrarem em apoptose (POLLOCK *et al.*, 2006).

As radiações podem ser classificadas de acordo com a quantidade de energia média depositada na matéria por unidade de comprimento ( $\text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ ). A radiação gama é considerada de baixa LET (Linear Energy Transference), ou seja, possui uma baixa densidade de ionização por unidade de comprimento.

O uso de radiação de baixa LET é um importante instrumento na condução do tratamento do câncer. Os mecanismos de reparo do DNA após irradiação com baixa LET devem ser investigados para uma melhora contínua do resultado da radioterapia clínica (VANDERSICKEL *et al.*, 2010). Conforme se amplia a compreensão do efeito biológico molecular das radiações, também se aumenta a capacidade de conduzir esse processo para obtenção de vantagem terapêutica, com a identificação de alvos moleculares específicos.

O câncer é causado por mudanças na função ou na expressão de genes importantes



como consequência de mutação, translocação, amplificação, deleção ou de processos epigenéticos herdáveis (POLLOCK, 2006). O câncer de mama é uma doença que adquiriu uma importância notável nos últimos anos e é motivo de séria preocupação por parte das políticas de saúde pública, sendo alvo de pesquisas em todo o mundo devido à sua alta incidência e mortalidade, especialmente em países como o Brasil (COSTA, 1999; FERREIRA; ROCHA, 2004).

Durante os últimos 30 anos, grandes avanços foram alcançados na detecção precoce do câncer, no ato operatório, que se tornou menos radical, na radioterapia, que permitiu a cirurgia conservadora para muitas mulheres, e no uso da quimio e da hormonioterapia adjuvantes, que têm salvado um número significativo de vidas. Apesar desses progressos, muito permanece por ser alcançado, e maiores recursos econômicos serão necessários para se continuar buscando o controle dessa neoplasia (VALLE, 1999).

Síndromes de susceptibilidade ao câncer de mama foram relacionadas a mutações em diversos genes. Os genes câncer de mama 1 (*BRCA1*) e câncer de mama 2 (*BRCA2*) são responsáveis atualmente pela maioria dos cânceres hereditários de mama e ovário. As funções precisas desses dois genes permanecem desconhecidas. No entanto, ambos funcionam como genes supressores de tumor e têm proteínas parceiras (partner proteins) similares, sugerindo funções relacionadas (MEIJERS-HEIJBOER *et al.*, 2001; FACKENTHAL; OLOPADE, 2007).

Os detalhes da regulação da apoptose por oncogenes e genes supressores ainda não estão totalmente compreendidos, embora saiba-se da participação do gene *p-*

53. Outro importante fator preditivo é a expressão do gene *c-erbB-2*, cuja amplificação ocorre em um terço dos carcinomas mamários e está associado ao alto grau histológico e à redução da sobrevida (FARIAS, 2005). Diversos genes ligados ao câncer foram descobertos nos últimos 30 anos (MURAD *et al.*, 2002).

Estudos *in vitro* de células do câncer de mama são necessários para melhor entendimento da probabilidade dos efeitos biológicos das radiações ionizantes, especialmente os que ocorrem em escala celular. É de interesse observar as respostas produzidas pelas células frente às doses administradas, buscando, assim, dar subsídio aos planejamentos terapêuticos.

As células MDA MB-231 constituem uma linhagem proveniente de adenocarcinoma de mama imortalizado, disponível para pesquisas *in vitro*. É uma cepa aneuplóide oriunda de uma mulher, cujos cromossomos normais N8 e N15 estão ausentes. Onze marcadores estáveis reorganizaram os cromossomos que são observáveis como não-assinalados, além de muitos autossomas trissômicos. Muitos dos cromossomos de marcador são idênticos aos mostrados no cariótipo (YANG; WEINBERG, 2008).

Farias e colaboradores (2005) investigaram a presença de células apoptóticas em carcinoma ductal infiltrante da mama. A apoptose *in situ* foi detectada, e os resultados demonstraram que pacientes com alto índice apoptótico estão associados a maiores níveis de proliferação celular. Estes achados indicam que em carcinomas ductais da mama o número de células em apoptose está diretamente associado à progressão histológica e de outros fatores de mau prognóstico, influenciando no

comportamento biológico desses tumores.

O estudo de Fränk e colaboradores (1996) investigou a adequação da produção de translocação observada em células irradiadas *in vitro* para a predição da sensibilidade à radiação intrínseca dessas células. Em culturas celulares irradiadas a 4 Gy, a produção de translocação foi maior em células de adenocarcinoma mamário radiosensíveis (MCF-7 e MDA MB-436) que em fibroblastos e células de carcinoma de colo uterino radorresistentes (CaSki). Os resultados também indicam que a radiosensibilidade individual cromossômica não é simplesmente uma função do comprimento dos cromossomos.

O gene do retinoblastoma, *Rb-1*, um gene supressor de tumor, tem sido encontrado alterado em 15 a 20% de pacientes com câncer de mama. Com grande frequência têm sido encontradas mutações no gene produtor da p53. O oncogene *c-myc* está amplificado em cerca de um terço dos tumores malignos de mama, e foram encontrados pontos de mutação no proto-oncogene *H-ras*. A compreensão acerca da instabilidade genética que acompanha o câncer de mama, bem como da amplificação ou mutação de genes específicos, poderá fornecer os dados de sua causa e progressão (VALLE, 1999).

Dentre os vários efeitos que as alterações da função do gene *p53* podem ter no processo maligno, estão as alterações na proliferação e apoptose, as quais têm sido relacionadas a mudanças na sensibilidade à radioterapia e quimioterapia (THOMPSON, 1995; MURAD *et al.*, 2002).

O uso de quimioterápicos ou radiações ionizantes promove uma destruição celular cujo efeito predomina sobre as células neoplásicas em consequência de seu acelerado ritmo proliferativo (PINHO, 2005). Uma forma de se eliminar mais células tumorais que sadias é o fracionamento, isto é, administrando-se múltiplas vezes a radiação, ao invés de uma dose única. Dessa forma, é permitido que as células normais se recuperem mais eficientemente que as patológicas. Fatores relacionados a radorresistência intrínseca ou a hipóxia sugerem que um maior número de frações na radioterapia possa resultar em uma melhor resposta do tumor ao tratamento. Assim, na prática, a radioterapia é feita de forma fracionada, normalmente com cinco aplicações por semana durante aproximadamente 6 semanas (KERR; SEARLE, 1980; FARIA, 1994; METTLER; UPTON, 1995).

O estabelecimento de fatores que levam ao prognóstico tem especial importância quando estes contribuem para o planejamento terapêutico. Dentre os fatores mensuráveis, encontram-se o grau de diferenciação do tumor, tempo de evolução, estadiamento e alterações histológicas. O prognóstico dos pacientes depende de inúmeros fatores. Alguns estão relacionados ao paciente e outros à biologia tumoral e aos tratamentos instituídos (FARIA, 1994; JOBSEN *et al.*, 2001).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi dividido em duas etapas, referentes aos dois tipos de linhagens empregadas. A primeira foi constituída por experimentos utilizando-se a linhagem celular PBMC *in vitro*, que conferiu boa eficiência para demonstrar a cinética de viabilidade celular frente a diferentes doses de radiação e duas taxas de dose, sendo uma o quarto da primeira. Em uma segunda etapa, foram realizados os experimentos utilizando a linhagem de câncer de mama MDA MB-231.

Os procedimentos experimentais foram realizados como seguem:

*Linhagens pré-estabelecidas:* Células Mononucleares do Sangue Periférico – PBMC e linhagem de adenocarcinoma de mama – MDA MB-231.

*Controle:* o controle foi feito com culturas de PBMC e MDA MB-231 não irradiadas.

*Irradiação:* garrafas T-25 de culturas *in vitro* foram submetidas à irradiação com Cobalto-60 do aparelho de radioterapia Gammatron 580 do Hospital Luxemburgo/Belo Horizonte, em cinco doses diferentes, conforme Figura 5.1.



Figura 5.1 Garrafas T-25 em processo de irradiação

*Cinética de dose:* foram empregadas as doses de 2, 4, 6, 8 e 10 Gy.

*Cinética de taxa de dose:* foram empregadas duas taxas de dose. Uma foi tomada o quarto da primeira.

*Cinética no tempo:* alíquotas das culturas *in vitro* que foram submetidas às doses supracitadas e alíquotas das culturas não irradiadas (controles) foram coletadas em tempos pré-estabelecidos de 24, 48 e 72 horas.

*Viabilidade Celular:* o teste de viabilidade celular foi feito pelo teste de MTT (sal tetrazólio), que tem como princípio a verificação da viabilidade e quantificação da proliferação celular baseada na clivagem desse sal (Figura 5.2).



Figura 5.2 Incorporação e metabolização de MTT em células controle de MDA MB-231 após 24h. Visualização ao microscópio óptico no aumento de 100x

## 5.1 Material de cultura empregado

Foram utilizados frascos T-25 (25cm<sup>2</sup>) da Techno Plastic Products para cultura celular e placas de 6 e de 96 poços de fundo plano da Biofil; tubos Falcon de 15 mL da JPROLAB; meios RPMI-1640, gentamicina, estreptomicina, soro fetal bovino (SBF) e MTT da Sigma Chemical Company. As células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foram obtidas por centrifugação em solução HISTOPAQUE<sup>®</sup> – 1077 da Sigma-Aldrich. Para descarte de material contaminado,

utilizou-se solução diluída a 4% de NaOH da Reagen. As células PBMC foram coradas para contagem com Líquido de Türck da Newprov.

## 5.2 Linhagens celulares e manutenção das culturas

As células de carcinoma mamário humano MDA MB-231 foram doadas pela Dra. Mirian Paz do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UFMG. As células PBMC foram obtidas do sangue periférico humano. As culturas celulares foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF e antibióticos gentamicina ( $50 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) e estreptomicina ( $500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), em frascos de cultura T-25 em atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ .

## 5.3 Separação das células PBMC

As células mononucleares do sangue periférico foram separadas segundo procedimento descrito por Gazzinelli e colaboradores (1983). O sangue heparinizado foi aplicado em tubos Falcon de 15 mL contendo uma mistura de HISTOPAQUE<sup>®</sup>, na proporção de uma parte deste reagente para duas partes de sangue. A preparação foi submetida a centrifugação por 30 minutos, a 1400 rotações por minuto (rpm) à temperatura ambiente. Ao final da centrifugação obteve-se um anel de células mononucleares na interface entre o HISTOPAQUE<sup>®</sup> e o plasma, o qual foi cuidadosamente removido e transferido para tubos de fundo cônico de 15 mL estéreis (2070 Graduated conical tube, Falcon). O volume foi completado para 15 mL com solução RPMI-1640 não suplementado e procedeu-se a outra centrifugação (10 min, 1200 rpm). As células foram lavadas por mais duas vezes (10 min, 1200 rpm). Ao final, uma alíquota da suspensão de células foi coletada e diluída (1:20) em tubo

ependorf contendo 90  $\mu\text{L}$  de líquido de Türck, e o número de células determinado através de contagem em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio ótico. A concentração de células foi ajustada para uma suspensão contendo  $10 \times 10^6$  células/mL de RPMI-1640 suplementado. Toda manipulação das células foi realizada em condições estéreis, em capela de fluxo laminar VECO.

#### 5.4 Irradiação das células com Cobalto-60

As garrafas T-25 contendo as células foram vedadas com Parafilm e transportadas dentro de um frasco plástico rígido tampado, previamente descontaminado com álcool 70% p/p. As células foram irradiadas com a fonte de Cobalto-60 do aparelho de radioterapia Gammatron 580 do Hospital Luxemburgo em Belo Horizonte/MG (Figura 5.3).

O Cobalto-60 é um radioisótopo que emite raios gama com energia média de 1,25 MeV. É utilizado em tratamentos de radioterapia desde a década de 1950 e possui meia-vida de 5,261 anos.





Figura 5.3 Aparelho de radioterapia GammaMatron 580 – Hospital Luxemburgo/Belo Horizonte

As amostras foram posicionadas a uma distância de 51,5 cm da fonte para a maior taxa de dose ( $X$ ). Já para a menor taxa de dose ( $X/4$ ), a distância foi de 103 cm, conforme Figura 5.4.

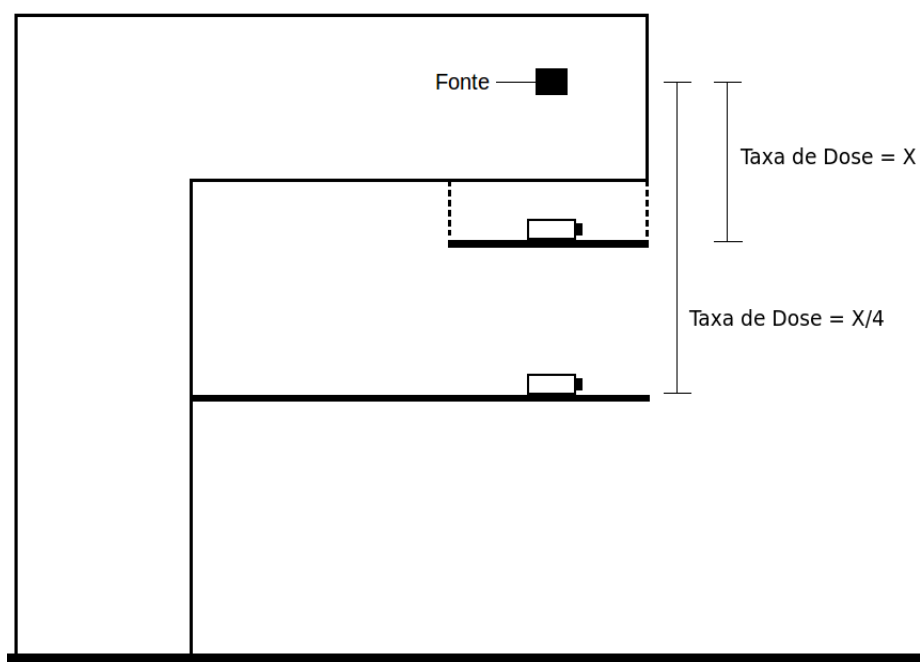


Figura 5.4 Esquema de irradiação considerando as duas taxas de dose utilizadas

A dose de radiação equivale à energia depositada em uma quantidade de massa. É dada em Gray (Gy), onde 1 Gy equivale a 1 Joule (J) por quilograma (kg);  $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J.kg}^{-1}$ . Assim, quando se fala em uma dose de 2 Gy, por exemplo, significa ceder à matéria uma quantidade de 2 J de energia para cada quilograma. Já a taxa de dose reflete a cinética de como a dose é absorvida ao longo do tempo.

Para se aplicar uma mesma dose em duas amostras posicionadas a distâncias diferentes da fonte (como mostrado na Figura 04), a amostra com maior taxa de dose (mais próxima à fonte) fica exposta à radiação durante menos tempo que a amostra mais distante. De acordo com os cálculos realizados no Departamento de Física Médica do Hospital Luxemburgo no dia de irradiação das amostras, as taxas de dose utilizadas foram  $X = 339,56 \text{ cGy.min}^{-1}$  e  $X/4 = 84,89 \text{ cGy.min}^{-1}$ . Dessa forma, o tempo de exposição das amostras para a taxa de dose X foram:

2 Gy – 0,54 minutos

4 Gy – 1,08 minutos

6 Gy – 1,62 minutos

8 Gy – 2,16 minutos

10 Gy – 2,7 minutos

Para a taxa de dose X/4, os tempos de exposição foram:

2 Gy – 2,14 minutos

4 Gy – 4,28 minutos

6 Gy – 6,42 minutos

8 Gy – 8,56 minutos

10 Gy – 10,7 minutos

O campo utilizado foi de 35 x 35 cm<sup>2</sup>. As células foram expostas às doses de 2, 4, 6, 8 e 10 Gy à temperatura ambiente. Após a exposição, as células retornaram à incubadora de CO<sub>2</sub>.

### 5.5 Coleta das amostras

Alíquotas de 500 µL foram coletadas das garrafas T-25 e transferidas para eppendorfs de 1,5 mL utilizando-se pipeta automática Eppendorf® Series 2100 após os tempos de 24, 48 e 72 horas pós-irradiação. Os eppendorfs foram identificados e as amostras congeladas para realização do teste de MTT.

### 5.6 Teste de MTT

O teste de MTT é baseado na capacidade das células de reduzirem o brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (um sal amarelo metabolizado no interior das mitocôndrias) em cristais de Formazan. Estes cristais se apresentam na cor púrpura e podem ser facilmente visualizados em células viáveis através de microscopia óptica invertida.

Em placas de 96 wells foram adicionados 20 µL de MTT e 100 µL de amostra em cada well. As amostras ficaram na estufa metabolizando o MTT por 4 horas. Após a metabolização, 80 µL foram descartados de cada well e foram adicionados 80µL de isopropanol (0,04 M). As placas foram incubadas por mais 18 horas. A viabilidade

celular foi mensurada pela medida da Densidade Óptica (DO) utilizando o leitor de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) marca Stat Fax 303/Plus no comprimento de onda de 595 nm. Dessa forma, foi possível correlacionar a absorvância com o número de células viáveis.

Os dados foram obtidos através da viabilidade obtida no instante zero e após 24, 48 e 72 horas após irradiação com 2, 4, 6, 8 e 10 Gy para as populações presentes nas culturas. A normoxia se configurou então no momento zero (anterior à adição da exposição à radiação) e hiperoxia (após a radiação com os raios gama). A medida de DO obtida permite demonstrar alteração na metabolização do MTT.

Procedimento para medida da viabilidade:

1. Separar placas de 96 poços;
2. Na primeira fileira correspondente ao branco da leitora de ELISA, adicionar 20 µL de MTT, 100 µL de meio RPMI e SFB a 10% e 70 µL de SDS a 10%/HCl p/V em todos os poços da fileira que adquiram a cor amarela;
3. Em seguida, remover a suspensão celular de cada poço e inseri-la em poços separados em nova placa;
4. Fazer a leitura da placa com o comprimento de onda de 595 nm para determinação da DO no aparelho de ELISA.

## 5.7 Análise estatística

Realizou-se uma comparação intragrupos, de acordo com cinco doses (2, 4, 6, 8 e

10 Gy) e duas taxas de dose diferentes para cada uma dessas doses. A média da densidade óptica e o desvio padrão foram obtidos através do teste T-student; adotando-se um nível de significância de 5%. O software utilizado para as análises foi o SPSS (Statistical Package for Social Sciences) para Windows 7.

## 6 RESULTADOS E ANÁLISES

Inicialmente serão apresentados os resultados da viabilidade de PBMC, incluindo a linhagem linfocitária, cuja sensibilidade à radiação pôde ser detectada através de um estudo de cinética de doses de radiação em tempos pré-estabelecidos, na presença de exposição à radiação de baixa LET, buscando uma possível correlação entre a dose administrada e a viabilidade celular em diferentes tempos, com duas taxas de dose diferentes. Posteriormente serão apresentados os resultados da linhagem MDA MB-231.

### 6.1 Viabilidade de células PBMC após irradiação com 2, 4, 6, 8 e 10 Gy

Os resultados serão apresentados de acordo com as doses de radiação utilizadas.

### 6.1.1 Viabilidade a 2 Gy

A Figura 6.1 mostra a viabilidade celular determinada pelo teste de MTT para a suspensão homogeneizada de células PBMC de garrafas T-25 que foram irradiadas a 2 Gy na taxa de dose X. Por sua vez, a Figura 6.2 mostra a viabilidade celular determinada para as células PBMC irradiadas a 2 Gy na taxa de dose X/4.

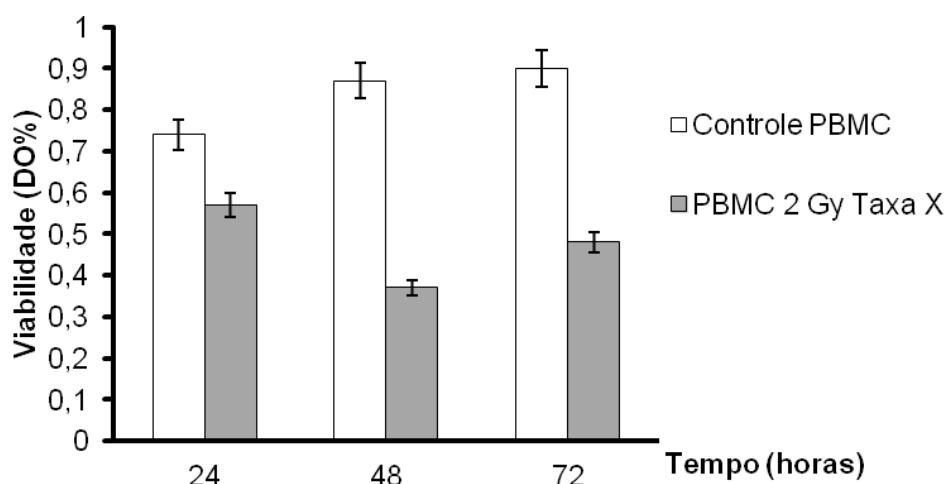


Figura 6.1 Viabilidade de células PBMC *in vitro* irradiadas a 2 Gy, taxa de dose X. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. ( $p < 0,05$ )

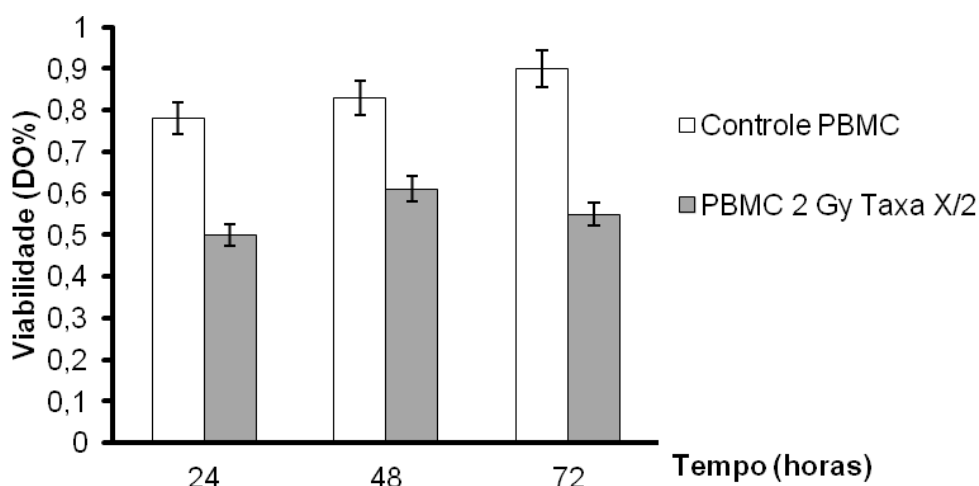


Figura 6.2 Viabilidade de células PBMC *in vitro* irradiadas a 2 Gy, taxa de dose X/4. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. ( $p < 0,05$ )

Os dados mostram uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) da DO na dose de 2 Gy em relação ao tempo de 48h com a taxa de dose X, sugerindo que, numa linhagem radiosensível, os efeitos da radiação já podem ser percebidos pela alteração da viabilidade celular. Foi observado o aumento da proliferação celular no controle (não irradiado), provavelmente devido ao processo fisiológico de replicação celular (mitose).

No caso das células irradiadas, pode-se sugerir que a alteração observada na diminuição da proliferação após a dose de 2 Gy seria devida ao papel que a radiação ionizante exerce provocando alterações biomoleculares, induzindo a cascata de apoptose numa linhagem que apresenta radiosensibilidade exacerbada, e que esse efeito já pôde ser observado numa dose considerada baixa, se for comparado com as doses da cinética que varia ente 2 e 10 Gy.

Em contrapartida, pode-se mencionar uma observação importante em relação ao efeito da taxa de dose associado à própria cinética de dose, lembrando que a taxa de dose reflete a maneira como a dose é absorvida ao longo do tempo. Na dose de 2 Gy, o efeito da aplicação diluída no tempo parece ter um efeito reconhecível ao se comparar o percentual médio de DO da Figura 6.2 com a Figura 6.1.

A diminuição da viabilidade foi menos perceptível com a taxa  $X/4$  nos tempos de 24, 48 e 72h, muito embora se tenha observado uma diferença em relação ao controle não irradiado.

#### 6.1.2 Viabilidade a 4 Gy

A Figura 6.3 mostra a viabilidade celular determinada pelo teste de MTT para a suspensão homogeneizada de células PBMC que foram irradiadas a 4 Gy na taxa de dose  $X$ . Por sua vez, a Figura 6.4 mostra a viabilidade celular determinada para as células PBMC irradiadas a 4 Gy na taxa de dose  $X/4$ .



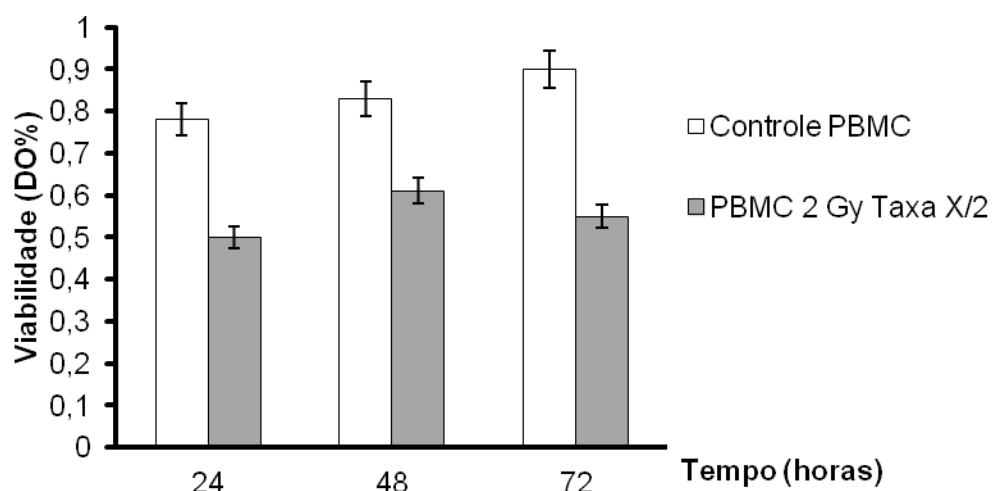


Figura 6.3 Viabilidade de células PBMC *in vitro* irradiadas a 4 Gy, taxa de dose X. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. ( $p < 0,05$ )

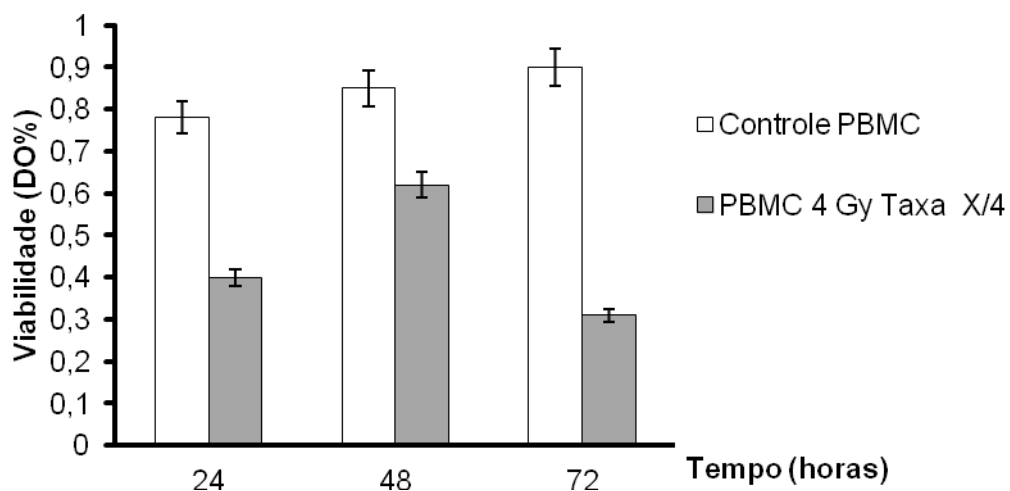


Figura 6.4 Viabilidade de células PBMC *in vitro* irradiadas a 4 Gy, taxa de dose X/4. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. ( $p < 0,05$ )

Dando seguimento à avaliação da cinética de doses de radiação, considerando a

diluição dessa dose no tempo no qual foi administrada, as duas taxas de dose avaliadas e sua investigação nos tempos pré-determinados de 24, 48 e 72h, enfatiza-se a importância do impacto desse tempo na recuperação das células, especialmente na indução do processo fisiológico de replicação e/ou na mutagênese celular.

A Figura 6.3 demonstra uma diminuição (embora não significativa) da viabilidade celular nas primeiras 24h após a cultura de células ser irradiada a 4 Gy. Essa queda foi significativa no tempo de 48h ( $p < 0,05$ ), sugerindo que as funções vitais das PBMC já parecem ter sido afetadas após a exposição com essa dose, considerando que vários fatores podem influenciar os efeitos radiobiológicos, tais como a qualidade da energia ionizante, a intensidade da radiação (efeito reversível e irreversível), a maneira da exposição – isto é, se de corpo inteiro ou de parte dele, se externa ou interna, se simples, continuada ou fracionada – o tempo de exposição e a distribuição de doses entre os diversos tecidos. É interessante notar que a recuperação não significativa observada com o tempo de 72h pode ter ocorrido devido ao processo fisiológico de blastogênese, e não porque os danos celulares possam ter diminuído.

Quando se compara o efeito da dose na taxa X/4, observa-se na Figura 6.4 que o processo fisiológico de replicação foi reconhecível, uma vez que houve uma recuperação significativa do percentual de DO, que reflete a viabilidade dessas células em detrimento do tempo, sugerindo que a taxa de dose parece exercer um papel importante na forma como esses danos são potencializados na célula e, possivelmente, que a própria indução da cinética de morte celular possa ser

desencadeada por vias de sinalização alternativas em função da dose administrada. Essa explicação é aceitável quando se observa que no tempo de 72h houve, novamente, a diminuição da viabilidade das células após a exposição a 4 Gy.

### 6.1.3 Viabilidade a 6 Gy

A Figura 6.5 mostra a viabilidade celular determinada pelo teste de MTT para a suspensão homogeneizada de células PBMC de garrafas T-25 que foram irradiadas a 6 Gy na taxa de dose X. Por sua vez, a Figura 6.6 mostra a viabilidade celular determinada para as células PBMC irradiadas a 6 Gy na taxa de dose X/4.

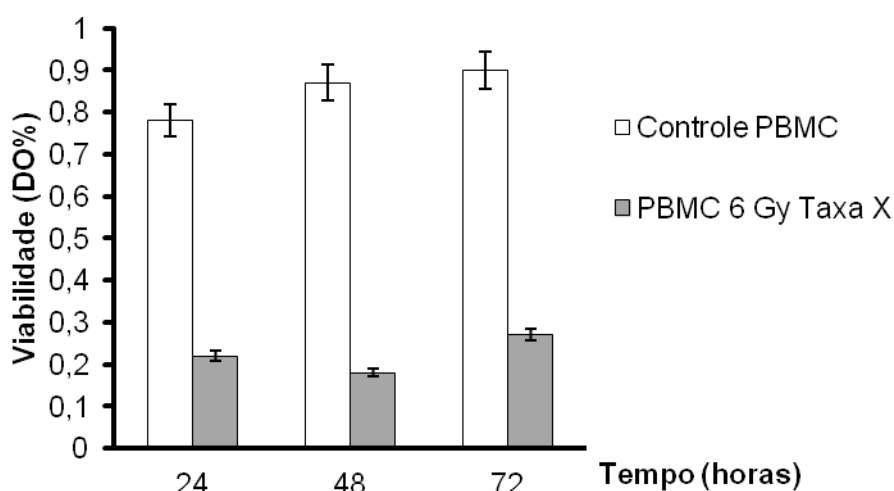


Figura 6.5 Viabilidade de células PBMC *in vitro* irradiadas a 6 Gy, taxa de dose X. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. ( $p < 0,05$ )

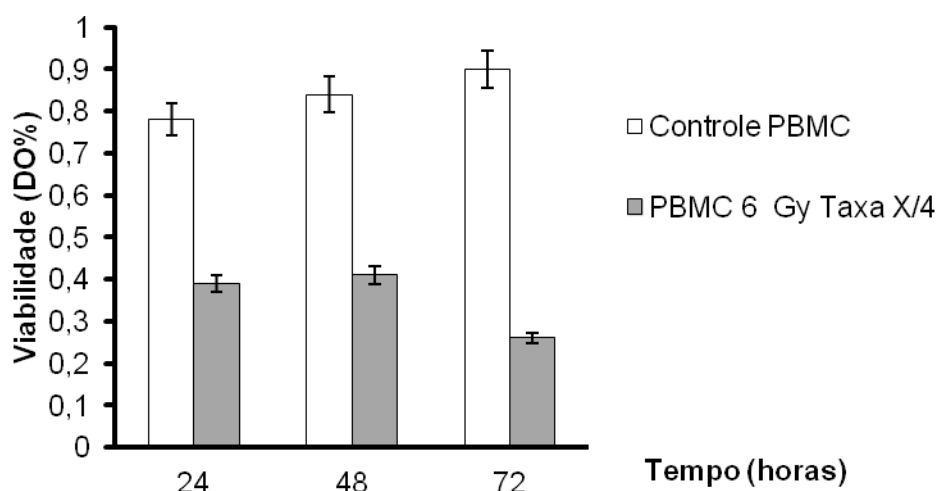


Figura 6.6 Viabilidade de células PBMC *in vitro* irradiadas a 6 Gy, taxa de dose X/4. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. ( $p < 0,05$ )

O efeito crescente de doses de radiação foi impactante na dose intermediária de exposição à radiação, como observado nas culturas de PBMC *in vitro* expostas a 6 Gy. A Figura 6.5 demonstra uma diminuição bastante significativa ( $p < 0,05$ ) do percentual de viabilidade celular já nas primeiras 24h após a exposição coma taxa X, tendo esse percentual se mantido significativamente baixo nas 48 e 72h, se comparado com a dose de 4 Gy (Figura 6.3).

Em contrapartida, quando essa mesma dose foi administrada à cultura num intervalo de tempo maior (X/4), observa-se que o efeito sobre a viabilidade foi bastante intenso nas 48 horas, causando diferença significativa em relação ao controle, o que não ocorreu com as doses de 2 e 4 Gy nesse mesmo intervalo de tempo pós-irradiação. Nota-se que com 72h ocorre uma diminuição bastante significativa da viabilidade celular. O efeito de doses fracionadas de radiação já havia sido

demonstrado anteriormente por Soto & colaboradores (1996), utilizando uma linhagem de câncer mamário com resistência intermediária na qual foi avaliada a proliferação de fibroblastos submetidos a doses muito mais baixas do que as utilizadas nesse estudo.

#### 6.1.4 Viabilidade a 8 Gy

A Figura 6.7 mostra a viabilidade celular determinada pelo teste de MTT para a suspensão homogeneizada de células PBMC de garrafas T-25 que foram irradiadas a 8 Gy na taxa de dose X. Por sua vez, a Figura 6.8 mostra a viabilidade celular determinada para as células PBMC irradiadas a 8 Gy na taxa de dose X/4.

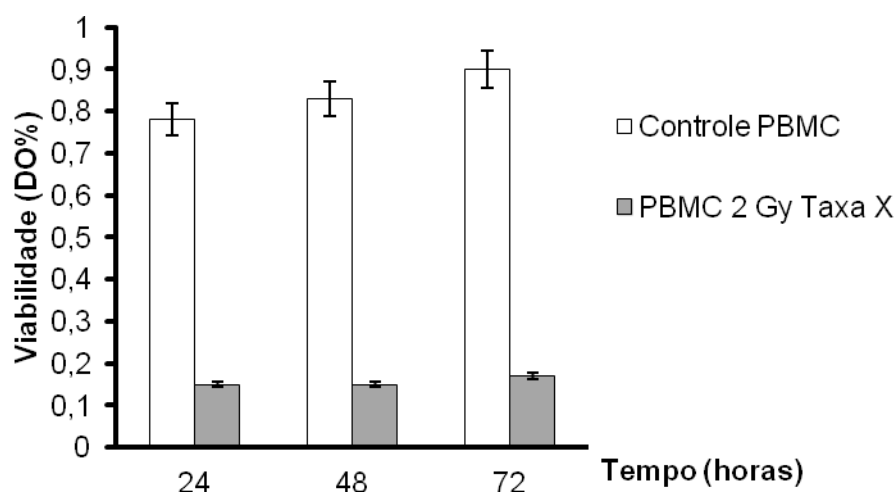


Figura 6.7 Viabilidade de células PBMC *in vitro* irradiadas a 8 Gy, taxa de dose X. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. ( $p < 0,05$ )

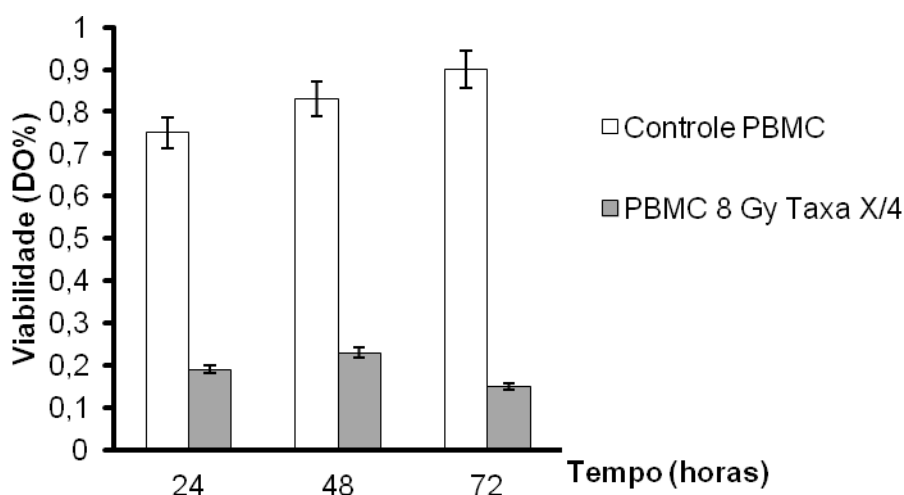


Figura 6.8 Viabilidade de células PBMC *in vitro* irradiadas a 8 Gy, taxa de dose X/4. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. ( $p < 0,05$ )

Anteriormente foi mencionada uma observação importante em relação ao efeito da taxa de dose associado à própria cinética de dose. A diminuição da viabilidade na exposição a 8 Gy foi extremamente significativa nos tempos de 24, 48 e 72h, não somente em relação ao controle não irradiado, mas em relação também à dose de 6 Gy, conforme é observado na Figura 6.5. Isso sugere que o efeito da dose de 8 Gy pode ter potencializado a morte celular em cultura, com uma tendência de irreversibilidade na viabilidade da mesma, quando a dose foi aplicada na taxa de dose X. O efeito da taxa de dose ainda pôde ser reconhecido com 8 Gy conforme observa-se na Figura 6.8, principalmente nas 72h seguintes à exposição à radiação, muito embora tenha ficado claro que o efeito da dose em si foi considerado impactante para indução de morte celular, levando, provavelmente, ao desbalanço entre proliferação e apoptose.

### 6.1.5 Viabilidade a 10 Gy

A Figura 6.9 mostra a viabilidade celular determinada pelo teste de MTT para a suspensão homogeneizada de células PBMC de garrafas T-25 que foram irradiadas a 10 Gy na taxa de dose X. Por sua vez, a Figura 6.10 mostra a viabilidade celular determinada para as células PBMC irradiadas a 10 Gy na taxa de dose X/4.

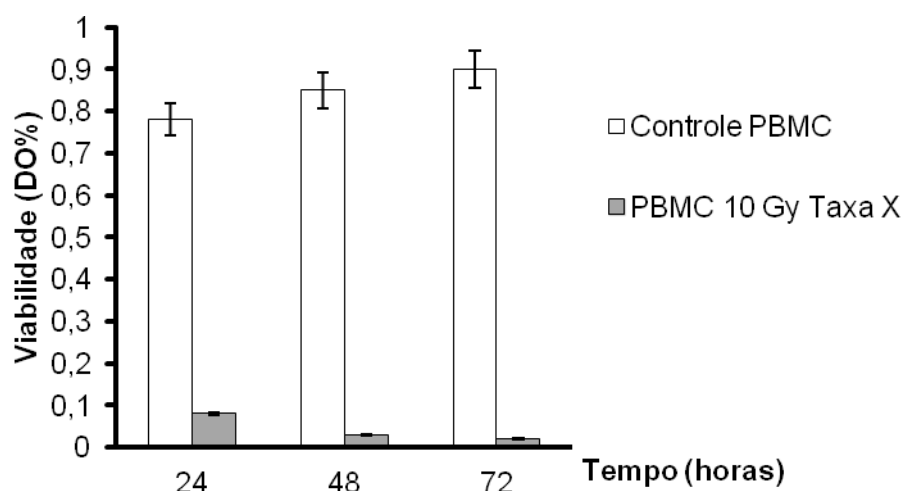


Figura 6.9 Viabilidade de células PBMC *in vitro* irradiadas a 10 Gy, taxa de dose X. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. (p < 0,05)

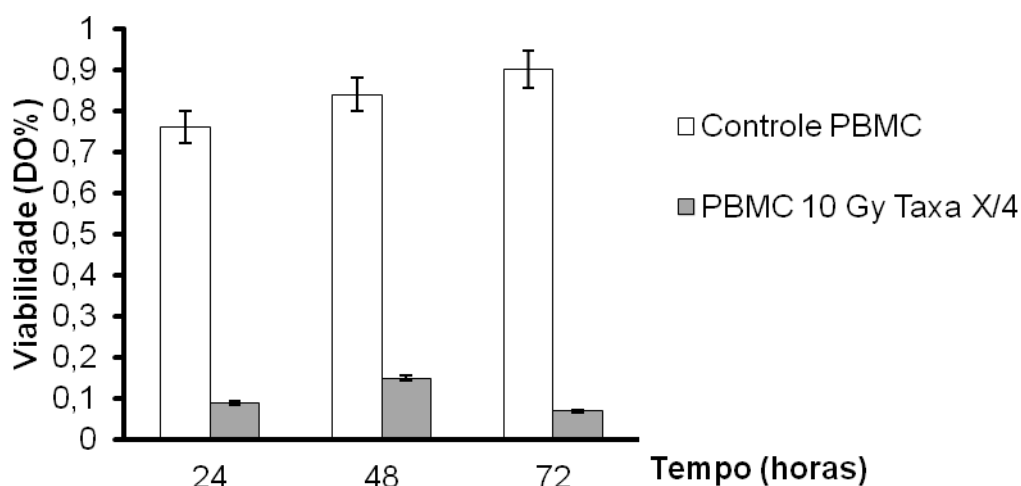


Figura 6.10 Viabilidade de células PBMC *in vitro* irradiadas a 10 Gy, taxa de dose X/4. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. ( $p < 0,05$ )

Os dados mostram uma diminuição estatisticamente significativa da DO em relação ao controle não irradiado, conforme comportamento biológico esperado para uma linhagem altamente radiosensível. No entanto, a observação mais relevante diz respeito à diminuição significativa da viabilidade das células em cultura, já nas primeiras 24h, com uma queda drástica observada em 48 e 72h. Considerando-se que essas culturas foram irradiadas na taxa de dose X, sugere-se que os efeitos nocivos decorrentes da radiação em alta dose foram suficientes para interferir na blastogênese celular. É interessante notar os efeitos deletérios da radiação bastante acentuados nas 72h que se seguiram após a irradiação conforme a Figura 6.11.



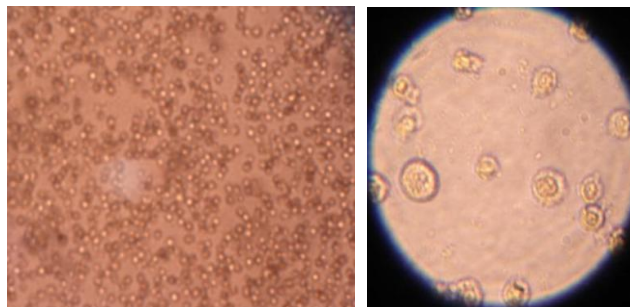


Figura 6.11 Células PBMC irradiadas com Cobalto-60 após 72 horas.  
Aumento de 200x e 400x

Em contrapartida, é interessante notar que a viabilidade celular apresentou um comportamento semelhante ao observado para as doses anteriores, quando as células foram irradiadas na taxa de dose X/4, muito embora o aumento da DO observado em 48h, significativo em relação aos tempos de 24 e 72h, possa ser apenas o reflexo de processos de mitose interrompidos.

## 6.2 Viabilidade da linhagem MDA MB-231 após irradiação com 2 e 10 Gy

### 6.2.1 Viabilidade a 2 Gy

A Figura 6.12 mostra a viabilidade celular determinada pelo teste de MTT para a suspensão homogeneizada de células MDA MB-231 de garrafas T-25 que foram irradiadas a 2 Gy na taxa de dose X. Por sua vez, a Figura 6.13 mostra a viabilidade celular determinada para essas células irradiadas a 2 Gy na taxa de dose X/4.

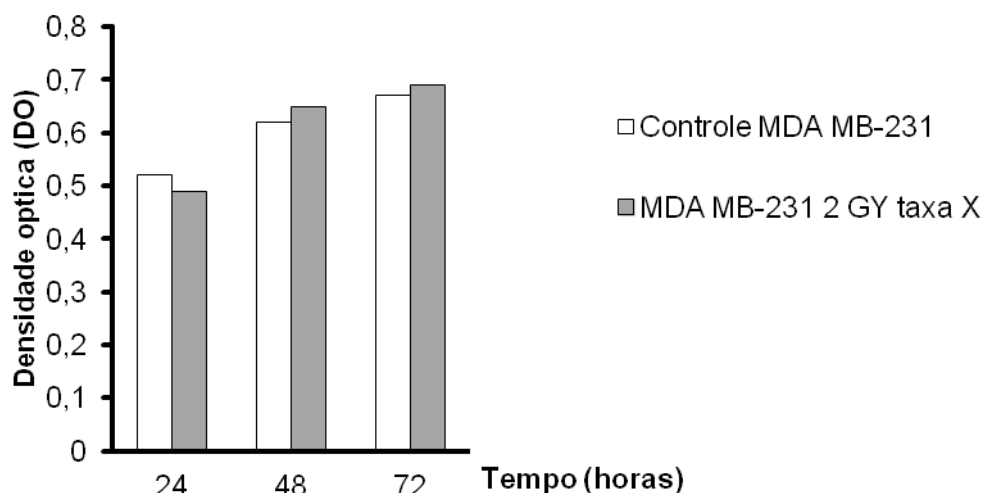


Figura 6.12 Viabilidade de células MDA MB-231 *in vitro* irradiadas a 2 Gy, taxa de dose X. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. ( $p < 0,05$ )

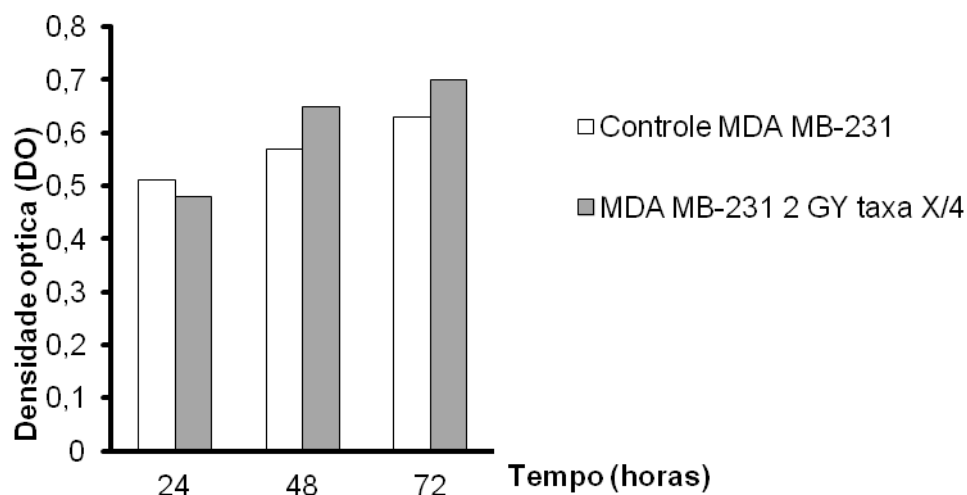


Figura 6.13 Viabilidade de células MDA MB-231 *in vitro* irradiadas a 2 Gy, taxa de dose X/4. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. ( $p < 0,05$ )

Os dados apresentados na Figura 6.12 mostram a viabilidade celular da linhagem MDA MB-231 antes e após a exposição das garrafas de cultura *in vitro* dessas células à dose de 2 Gy.

O experimento controle mostrou a capacidade das células MDA MB-231 preencherem o frasco T-25 e manterem-se clonogênicas além de 48h pós confluência sem troca de meio, conforme se observa na viabilidade do controle (Figuras 6.12 e 6.13). O experimento controle mostrou também que após 72h a concentração de células é alta e a densidade celular leva ao elevado consumo de nutrientes do meio suplementado, tornando-o ácido devido aos subprodutos excretados no período de tempo de 70-120h, nas condições de não troca de meio.

Considerando uma baixa dose de radiação, os resultados observados nesse ensaio foram opostos às observações feitas para as PBMC em cultura nas mesmas condições de exposição e dose. Os dados, além de não apontarem diminuição da viabilidade celular após a adição do sobrenadante da cultura irradiada com 2 Gy às culturas não irradiadas (comparado ao controle não irradiado), mostraram um aumento dessa viabilidade, sugerindo uma expansão clonal nessa dose, principalmente após 48h em cultura e que possivelmente os co-fatores ou enzimas produzidas pelas células irradiadas não foram capazes de induzir a viabilidade de células “naive”, não irradiadas. As mesmas observações foram feitas para a dose de 2 Gy na taxa de X/4, sugerindo também uma radiorresistência quando a dose foi administrada num intervalo de tempo maior (Figura 6.13).

### 6.2.2 Viabilidade a 10 Gy

A Figura 6.14 mostra a viabilidade celular determinada pelo teste de MTT para a suspensão homogeneizada de células MDA MB-231 de garrafas T-25 que foram irradiadas a 10 Gy na taxa de dose X. Por sua vez, a Figura 6.15 mostra a viabilidade celular determinada para essas células irradiadas a 10 Gy na taxa de dose X/4.

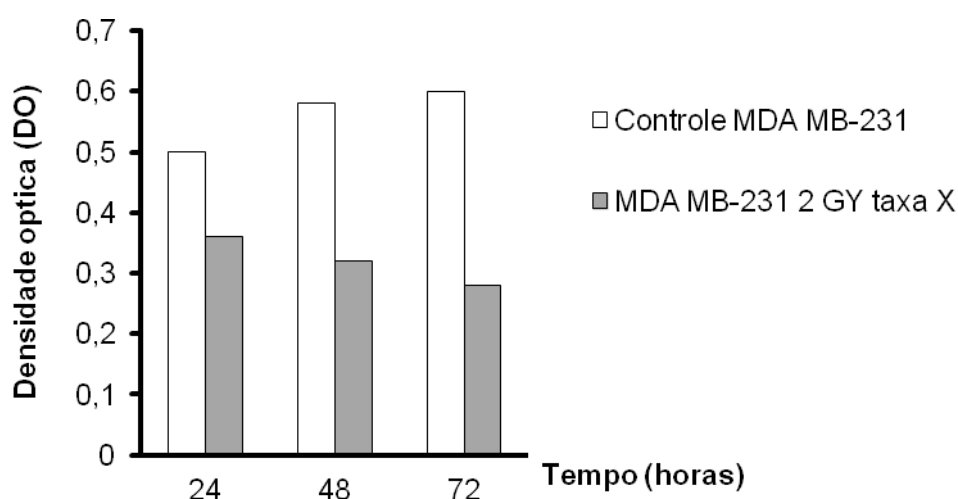


Figura 6.14 Viabilidade de células MDA MB-231 *in vitro* irradiadas a 10 Gy, taxa de dose X. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. ( $p < 0,05$ )

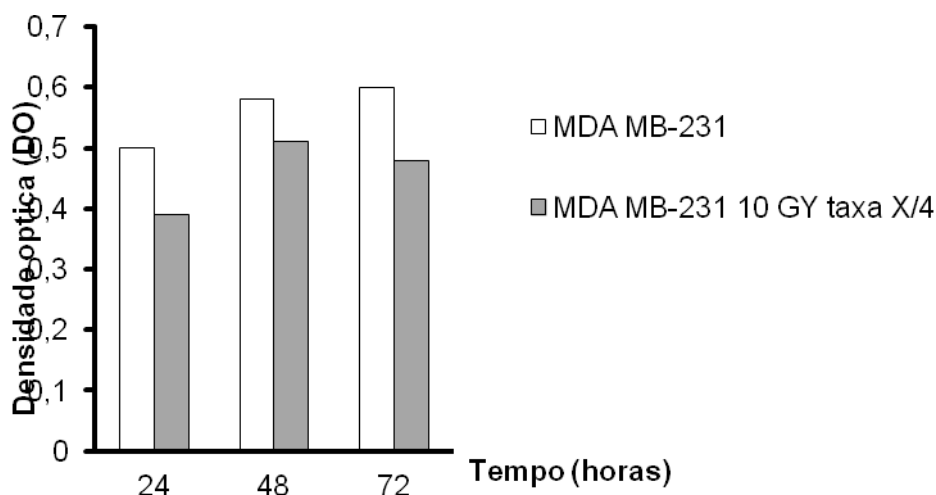


Figura 6.15 Viabilidade de células MDA MB-231 *in vitro* irradiadas a 10 Gy, taxa de dose X/4. A barra branca representa o controle (células não irradiadas) e a barra cinza representa suspensão de cultura pós-irradiada. As barras expressam a média de triplicatas e apresentam o desvio-padrão. \* representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem \*. ( $p < 0,05$ )

Os dados apresentados na Figura 6.14 confirmam os achados de Cockerham (2002), que mostram que os efeitos tóxicos da radiação sobre linhagens celulares radorresistentes dependem da dose total absorvida. No presente estudo, observa-se que a viabilidade de linhagens de células tumorais humanas pode ser influenciada pela dose e pelo tempo de exposição. A Figura 6.14 evidencia uma diminuição significativa da viabilidade celular da linhagem MDA MB-231 nas 72h que se seguiram após a irradiação com 10 Gy na taxa X em comparação aos tempos de 24 e 48h, sugerindo que, mesmo com a aparente proliferação (confluência) da linhagem, tais efeitos tóxicos sobre as células foram reconhecidos a partir da queda na curva de viabilidade.

Alguns aspectos morfológicos de células em cultura da linhagem de adenocarcinoma mamário MDA MB-231 já haviam sido abordados anteriormente em

estudo sugerindo efeitos deletérios nas doses mais elevadas (10 Gy). Estudos de Campos e colaboradores (2010) mostram a análise de imagens providas de frascos com células da linhagem MDA MB-231 durante a irradiação, sugerindo a existência de processos apoptóticos. As células apoptóticas apresentam uma morfologia diferenciada em relação ao tamanho e granulosidade, sendo muito mais granulosas que aquelas que não sofreram os danos decorrentes da radiação. Há indícios de presença de vacúolos e corpos apoptóticos existentes. Há também a presença de células disformes com possível indicação de necrose.

## 7 DISCUSSÃO

O envolvimento do sistema imune na destruição dos tumores tem constituído tema central em pesquisas imunológicas. Este conceito se fundamenta em casos bem documentados de regressão espontânea de tumores, na descoberta de grande variedade de antígenos tumor-específicos e no desenvolvimento de modelos experimentais, em que a imunização com esses antígenos modifica o comportamento da neoplasia (MARSILLAC, 1980).

A escolha de células do sangue periférico para comparação com uma linhagem resistente se justifica, considerando que o quadro sanguíneo já se altera a partir de 0,25 Gy. Todas as células do sangue são alteradas, obedecendo, no entanto, a certo grau de radiosensibilidade. Em geral, os primeiros elementos a desaparecerem são os linfócitos (em poucas horas), logo após os granulócitos (alguns dias), em seguida as plaquetas e, finalmente, os eritrócitos (algumas semanas). Antes da linfocitopenia, há hiperleucocitose passageira (somente neutrófilos) com redução dos eosinófilos e, logo a seguir, dos linfócitos (BRABO, 2010).

A leucopenia reinstala-se dois a três dias depois e envolve todas as células brancas, levando o indivíduo a um grau variado de imunossupressão, que certamente irá se refletir no sucesso do tratamento da doença. Em geral, em seguida ao oitavo dia após a exposição aos raios ionizantes, inicia-se a fase de regeneração da série linfática, mesmo antes que a neutrofilopenia tenha chegado ao nível mais baixo. Usualmente a regeneração total da série branca se dá 4 a 6 semanas após as irradiações. As alterações morfológicas das células sanguíneas são de caráter degenerativo. Aparecem, todavia, no sangue circulante, células jovens com certo grau de atipia. Os linfócitos, geralmente após irradiação do corpo todo, tornam-se picnóticos. Os granulócitos neutrófilos sofrem degeneração vacuolar do núcleo e do plasma, sendo este achado frequente em portadores de leucemia tratados por raios-X. Nos granulócitos aparecem também granulações basófilas atípicas e não rara a formação de granulócitos gigantes multilobulados (REZENDE, 1995).

As células expostas à ação direta das radiações podem sofrer danos biológicos que levam a mutações gênicas. Essas mutações correspondem a alterações introduzidas na molécula de DNA, resultando na perda ou transformação de informações codificadas na forma de genes, e em quebras, que resultam na perda da integridade física do material genético (quebra da molécula), podendo desencadear diferenciações celulares descontroladas.

Os tipos de alterações ou aberrações cromossômicas que as células expostas à radiação podem sofrer são, a princípio, quatro: deleção (deficiência), constituída pela falta de um pedaço do cromossomo (podendo ser terminal ou intercalar); duplicação, onde há duplicidade de um pedaço do cromossomo (a mesma

sequência de genes se repete); translocação, onde dois cromossomos sofrem fratura e os pedaços são trocados; inversão, onde é preciso que o cromossomo sofra duas fraturas e que o pedaço solto se ligue, após um giro de 180°, aos locais fraturados do cromossomo (READ; DONNAI, 2008).

Os efeitos biológicos das radiações ionizantes podem ser avaliados através de ensaios de viabilidade celular (monitoramento da proliferação celular), ensaios bioquímicos (detecção de receptores associados à apoptose ou à diferenciação celular descontrolada; receptores tumorais) e biologia molecular (detecção de citocinas e fatores de crescimento, além dos grupos de enzimas associadas à transcrição de genes tumorais, envolvendo resistência e sensibilidade *in vitro*). A avaliação dos perfis de citocinas/fatores de crescimento e/ou enzimas torna-se importante na busca de uma correlação entre dose de radiação administrada e a indução da capacidade de proliferação e diferenciação dessas células.

Exposições de linhagens de células tumorais fornecem um importante modelo para verificar os efeitos deletérios da irradiação ionizante sobre células. Linhagens de células MDA MB-231 e MCF-7 são usadas para investigação do câncer de mama humano.

Estudos anteriores demonstraram a eficiência de se avaliar cineticamente os efeitos de doses de radiação sobre células em culturas *in vitro*. Michelin e colaboradores (2009) avaliaram o efeito da cinética de doses de radiação ionizante na modulação da expressão de moléculas de superfície celular através da citometria de fluxo.



Soto e colaboradores (1996) demonstraram o efeito de baixas doses de radiação utilizando linhagem tumoral de mama MCF-7, avaliando a proliferação de fibroblastos submetidos a doses de 10-15  $\mu$  Gy e observaram um efeito na diminuição da proliferação dessas células.

Radiossensibilidade de MCF-7 foi demonstrada enquanto radiorresistência da linhagem MDA MB-231 foi demonstrada na dose 10 Gy (HUNÁKOVÁ *et al.*, 2000). Estudos propuseram um modelo resistente à radiação através de clones de MDA MB-231 para irradiação a baixa LET fracionada com 40 ou 60 Gy, 2 ou 4 Gy por fração. Outro estudo já havia demonstrado o comportamento de radiorresistência da linhagem MDA MB-231 (PEARCE, 2001).

Estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisas do NRI compararam a linhagem MDA MB-231 com células PBMC irradiadas com raios gama nas doses de 10, 25 e 50 Gy. Os resultados demonstraram a radiorresistência da linhagem de câncer de mama humano, mostrando que MDA MB-231 é capaz de sobreviver à radiação, apesar de ter recebido altas doses de raios Gama oriundos de Cobalto-60, enquanto as células do sangue periférico apresentaram radiossensibilidade em todas as doses testadas (ANDRADE, 2002).

O estudo supracitado forneceu embasamento para se comparar a cinética de doses das duas linhagens, sendo possível atribuir um papel crucial das radiações, sugerindo efeitos deletérios sobre células normais em cultura *in vitro*.

No presente estudo foi demonstrado que as linhagens de células humanas podem ter sido influenciadas pelo tempo de exposição. Os efeitos imediatos observados

apontam sinais clínicos resultantes da morte celular e, tardiamente, o efeito estocástico, devido à lesão do material nuclear podendo levar ao surgimento de câncer ou mutação gênica. Estudos de Chockerham (2002) mostram que os efeitos toxicológicos da radiação sobre linhagens celulares dependem da dose total absorvida.

Ao se comparar a viabilidade da linhagem MDA MB-231 irradiada com as doses de 2 e 10 Gy, utilizando-se duas taxas de dose distintas e considerando-se não somente a capacidade de manutenção de viabilidade dessas células, mas também as aberrações cromossomiais, pode-se inferir que o fator tempo é, decerto, crucial para induzir a um número maior de aberrações e alterações morfológicas.

Outros estudos mostraram a ação da radiação sobre o sistema nervoso, que era considerado relativamente resistente. O longo período de latência para o aparecimento de lesões dificulta as avaliações, como a desmielinização, que é iniciada cerca de duas semanas após a irradiação. Em animais de laboratório expostos a uma única dose de 15 Gy, já foi relatada necrose do tecido branco, assim como alterações morfológicas também já foram detectadas com dose a partir de 10 Gy (CHOCKERHAM, 2002). Segundo esse autor, animais irradiados mesmo com doses baixas de 0,005 a 0,5 Gy também parecem apresentar alterações vasculares, com quebra da barreira hematoencefálica.

Dentro do contexto de que uma cinética de dose de radiação poderia induzir efeitos deletérios do sistema nervoso – visto que doses baixas em torno de 0,02 Gy são capazes de induzir não somente um aumento da síntese de acetilcolina, mas

também refletir sobre o próprio sistema imunológico do animal, já que altera toda a mobilização iônica intracelular – pode-se supor que essas alterações estariam associadas à própria resposta e capacidade de modular os efeitos das injúrias, pelas células do sistema nervoso, alterando inclusive a maturação das mesmas.

Torna-se de fundamental importância avaliar futuramente possíveis alterações biomoleculares das linhagens MDA MB-231 e PBMC, considerando-se que o observado é a probabilidade carcinogênica a partir de células irradiadas ser superior à probabilidade de ocorrência deste processo a partir de células não irradiadas.

## 8 CONCLUSÕES

As exposições *in vitro* de linhagens de células MDA MB-231 e PBMC fornecem um importante modelo para se investigar os efeitos deletérios da irradiação ionizante em células radorresistentes e radiosensíveis, respectivamente.

Foi possível observar a correlação entre a dose de radiação administrada e a viabilidade celular. A radiação ionizante ativa diversos sistemas bioquímicos ao interagir no núcleo das células. À medida que as células receberam maior dose, o índice de apoptose também aumentou. Mesmo na linhagem radorresistente, uma dose elevada fez com que a população celular diminuísse.

Mantendo-se constante a dose e assumindo-se duas taxas de dose, foi observado que, para a taxa de dose representativa de um quarto da padrão, as células irradiadas tiveram uma melhor recuperação entre 48 e 72h, indicando que o tempo de exposição à radiação influencia nas respostas celulares.

Os resultados da diminuição de viabilidade celular após irradiação poderiam ser explicados pela presença de co-fatores solúveis e/ou enzimáticos potencialmente nocivos à sobrevivência das células, levando ao desencadeamento da cascata de apoptose celular. Ao considerar-se que o efeito de uma dose mais baixa (2 Gy) seja capaz de desencadear a apoptose, poderia-se inferir que esse efeito observado com uma dose mais elevada (10 Gy) teria um impacto sobre as vias enzimáticas que levariam as células a entrar em apoptose de uma forma mais rápida, o que reflete a baixa DO observada nos três tempos de coleta (24, 48 e 72h), se comparado com as observações feitas com as doses menores e intermediárias.

Observa-se que, para todas as doses, a linhagem radiosensível demonstra uma cinética no tempo característica, ao se comparar as duas taxas de dose. Considerando-se a taxa de dose X, nas primeiras 48h sempre ocorre uma queda de viabilidade, seguida de uma leve recuperação. Já na taxa de dose X/4, ocorre primeiramente recuperação, seguida de uma queda de viabilidade.

Ainda a respeito da cinética das células PBMC, poderia-se inferir, ao observar os tempos de 24 e 48h nas taxas de dose X, que no tempo de 72h a viabilidade diminuiria, seguindo uma tendência de apenas morte celular ocorrendo. Mas o observado, em todas as doses, é uma recuperação celular nesse tempo, mostrando a importância de se avaliar detalhadamente uma cinética para se compreender o comportamento das células *in vitro*. Já na taxa de dose X/4, após as 48h, o inferido poderia ser o aumento da viabilidade em 72h, mas isso não é observado. Após receberem uma dose de radiação diluída no tempo, há um maior intervalo para o processamento das reações celulares, que acaba resultando em queda de

viabilidade. Esse modelo de estudo torna-se importante para mostrar os diferentes comportamentos dessa linhagem quando exposta a uma dose de maneiras diferentes em relação ao tempo.

A linhagem de adenocarcinoma mamário apresentou um comportamento mais linear ao receber uma dose elevada de radiação na taxa de dose X. As células não conseguiram reverter os processos apoptóticos induzidos pelos raios gama, tendo a viabilidade diminuído ao longo do tempo. Para a taxa de dose X/4, as células conseguiram recuperação da viabilidade em 48h, mas houve nova queda em 72h, demonstrando que, mesmo após essa recuperação aparente, a cultura pode estar contaminada com subprodutos apoptóticos liberados, que levam as células sadias a perderem a capacidade de proliferação devido à toxicidade do meio.

É importante comparar esse modelo de estudo (linhagem radiosensível e radorresistente) com o próprio organismo dos pacientes, pois ali são aplicados feixes de radiação e todo o ambiente atingido passa por transformações bioquímicas, havendo subprodutos tóxicos, variação no nível de oxigenação, células sadias e tumorais sendo afetadas ao mesmo tempo, entre outros.

Considerando os efeitos da radiação sobre o processo de imunossupressão no tratamento radioterápico, pode-se supor que tais efeitos impactariam sobre a repercussão do tratamento de tumores em pacientes que, ao receberem doses maiores de radiação, apresentariam quadros graves de imunossupressão. Essa imunossupressão, num momento posterior, poderia contribuir, inclusive, para indução de novos focos tumorais em outros microambientes do organismo, que não

o foco primário, podendo levar também a recidivas tumorais.

As fontes de Cobalto-60 dos equipamentos de radioterapia nem sempre são substituídas de acordo com a meia-vida deste isótopo. Assim, os planejamentos dos tratamentos muitas vezes são feitos variando-se o tempo de exposição ou a distância do paciente em relação à fonte. De acordo com o presente estudo, esse tipo de planejamento poderia causar diferentes resultados nos tratamentos, uma vez que o comportamento das células se dá de maneira distinta quando estas são expostas a taxas de doses maiores ou menores. Assim, as variações na taxa de dose podem interferir no protocolo de radioterapia, e este estudo abre possibilidades para novas pesquisas referentes a linhagens celulares, doses, tempos de exposição, viabilidade, fontes de radiação, distribuição de dose, fracionamento de doses, comportamentos celulares, entre outros, no intuito de fornecer melhor suporte a futuros planejamentos terapêuticos.

É interessante reportar sobre a possibilidade de posterior avaliação das linhagens celulares utilizadas neste estudo utilizando a citometria de fluxo como uma técnica importante para o monitoramento do efeito da radiação com doses crescentes, inclusive na determinação de co-fatores solúveis, a exemplo do TNF-beta nos sobrenadantes das culturas irradiadas para, dessa forma, compreender de forma mais clara os efeitos desencadeadores de proliferação tumoral que ocorrem nessa doença.

Torna-se de fundamental importância avaliar futuramente, sequencialmente, possíveis alterações biomoleculares dessas linhagens, considerando que o

observado é que a probabilidade carcinogênica a partir de células irradiadas é superior à probabilidade de ocorrência deste processo a partir de células não irradiadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAPRO, M. S. Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer: A Review of Key Findings from the 7th International Conference, St. Gallen, February 2001. *The Oncologist*, Switzerland, v. 6, n. 4, p. 376-385, 2001.

AGUIAR, G.; *et al.* Padrão de metilação e análise da expressão do gene RASSF1 em linhagens celulares de carcinoma mamário. In: *Congresso de Iniciação Científica da UNESP*, 2009, São José do Rio Preto. Trabalho Científico... São José do Rio Preto: [s.n.], 2009.

ANDRADE, L. M. *Estudos "in vitro" de câncer de mama humano da linhagem MDA MB-231 irradiado por Co-60 & estudos correlatos*. Dissertação (Mestrado em Ciências e Técnicas Nucleares) – Faculdade de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2002. 112 p.

BERNIER, J.; HALL, E. J.; GARCIA, A. Radiation oncology: a century of achievements. *Nature Reviews Cancer*. v. 9, n. 4, p. 737-747, 2004.

BRABO, L. L.L. *Biofísica das radiações ionizantes: coleção de textos em radiologia*. [S.l.] : apostila, 2010. Disponível em: <[http://media.wix.com/ugd/2aacdb\\_80b95334e9685b1d6cfb25b86e41efa9.pdf](http://media.wix.com/ugd/2aacdb_80b95334e9685b1d6cfb25b86e41efa9.pdf)>. Acesso em: 12 nov. 2011, 14:17:07.

CAMPOS, T. P. R.; *et al.* Efeito de sementes de Sm e Ho em culturas de células MDA MB-231. In: COLAOB, 2010 – The 6th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, 2010.

CARIGNAN, J. Biologia do Câncer: Carcinogênese, Oncogens e Epidemiologia In ROSENTHAL, S.; CARIGNAN, J. E SMITH, B.D. *Oncologia Prática: cuidados com o paciente*. 2ed., Rio de Janeiro: Revinter, 1995. p.1-11.

CHEN, W.; *et al.* Depletion o securin induces senescence after irradiation and enhances radiosensitivity in human cancer cells regardless of functional p53 expression. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. v. 77, n. 2, p. 566-574, 2010.

CHOCKERHAM, K. P.; KENNERDELL, J. S. Does radiotherapy have a role in the management of thyroid orbitopathy? *British Journal of Ophthalmology*. v. 1, n. 86, p. 102-107, 2002.



COLES; *et al.* Reduction of radiotherapy-induced late complications in early breast cancer: the role of intensity-modulated radiation therapy and partial breast irradiation. Part I – normal tissue complications. *Clinical Oncology*. v. 17, n. 2, p. 16-25, 2005.

COSTA, M. M. *A saúde dos seios*. Rio de Janeiro: Diagraphic, 1999. 127 p.

DE BACCO, F.; *et al.* Inductions of MET by ionizing radiation and its role in radioresistance and invasive growth of cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. v. 8, n. 103, p. 645-661, 2011.

FACKENTHAL, J. D.; OLOPADE, O. I. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nature Reviews Cancer*. v. 7, p. 937-948, 2007.

FARIA, S. L.; LEME, L. H. S.; OLIVEIRA SILVA, J. A. *Câncer da mama: diagnóstico e tratamento*. Rio de Janeiro: MEDSI, 1994. 283 p.

FARIAS, R.E.; SOUZA, A.R.; AARESTRUP, F.M. Avaliação da apoptose no carcinoma ductal infiltrante da mama: associação com graus histológicos e fatores prognósticos. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 3, n. 51, p. 209-218, 2005.

FENTIMAN, I. S. *Diagnóstico e tratamento do câncer inicial de mama*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1993. 223 p.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Atheneu, 2004. 469 p.

GAZZINELLI, G.; *et al.* Immune response during human schistosomiasis mansoni x production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral mononuclear cells from treated, but not active cases of schistosomiasis. *Journal of Immunology*. v. 130, n. 6, p. 2891-2895, 1983.

HUNÁKOVÁ, L. Radiation-induced apoptosis and cell cycle alterations in human carcinoma cell lines with different radiosensitivities. *Neoplasma*. v. 1, n. 47, p. 25-31, 2000.

ILYENKO, I.; LYASKIVSKA, O.; BAKYCA, D. Analysis of relative telomere length and apoptosis in humans exposed to ionising radiation. *Experimental Oncology*. v. 4, n. 33, p. 235-238, 2011.

JOBSEN, J.J.; PALEN, J.V.D; MEERWALDT, J.H. The impact of age on local control in women with pT1 breast cancer treated with conservative surgery and radiation therapy. *European Journal of Cancer*. v. 37, n. 15, p. 1820-1827, 2001.

KERR, J.F.R.; SEARLE, J. Apoptosis: its nature and kinetic role. *Radiation Biology Cancer Research*. p. 367 – 384, 1980.

LAN, L.; *et al.* Effect of amlodipine on apoptosis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *Journal of Medical Colleges of PLA*. v. 23, n. 6, p. 358 – 363, 2008.

LIU Y. *et al.* p53 and gamma radiation in the normal breast. *International Journal of Radiation Biology*. v. 11, n. 85, p. 1026-1031, 2009.

MARSILLAC, J.B.; ROCHA, A.F.G. *Cancerologia: conceitos atuais*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980. 421 p.

MEIJER-HEIJBOER, H.; *et al.* Breast cancer after prophylactic bilateral mastectomy in women with a BRCA1 ou BRCA2 mutation. *The New England Journal of Medicine*. n. 345, p. 235-240, 2001.

METTLER, F.A; Jr, UPTON A. C. *Medical Effects of Ionizing Radiation*. 2nd ed., Philadelphia: W.B Saunders Company. 1995.

MURAD, A. M.; KATZ, A. *Oncologia: bases clínicas do tratamento*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 435 p.

MURAD, A. M.; *et al.* *Oncologia Clínica*. Vol 2/4. Rio de Janeiro: Medsi. 2002. 705 p.

NOUAILHETAS, Y; ALMEIDA, C.E.B; PESTANHA, S. Radiações ionizantes e a vida. Rio de Janeiro: apostila, 2003. 42 p. Disponível em: <<http://ns1.sismepe.pe.gov.br/caosaude/arquivos/md/CNEN-RadiacoesIonizantesVida.pdf>>. Acesso em: 07 nov. 2011, 13:00:00.

PEARCE, A. G. *et al.* The generation and characterization of a radiation-resistant model system to study radioresistance in human breast cancer cells. *Radiation Research*. v. 6, n. 156, p. 739-50, 2001.

PINHO, M. *Biologia molecular do câncer: fundamentos para a prática médica*. Rio de Janeiro: Revinter, 2005. 228 p.

POLLOCK, R. E.; *et al.* *UICC manual de oncologia clínica*. 8 ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 2006. 919 p.

READ, A.; DONNAI, D. *Genética Clínica: uma nova abordagem*. Rio de Janeiro: ARTMED, 2008. 448 p.

REZENDE, A. F. *Nós e as radiações*. [S.l.: s.n.], nov. 1995. Disponível em: <<http://www.cultura.com.br/radiologia/trabalho/noseas/noseasra.htm>> Acesso em: 20 nov. 2011, 09:38:00.

SANTOS, C. E. R.; MELLO, E. L. R. *Manual de cirurgia oncológica*. 2 ed. São Paulo: Tecmedd, 2008. 1180 p.

SOTO, J.; *et al.* Influence of low doses of radiation due to  $^{222}\text{Rn}$  on proliferation of fibroblasts and MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Science of the Total Environment*. v. 3, n. 181, p. 181-185, 1996.

TAMAMOTO, T.; OHNISHI, K.; TAKAHASHI, A.; *et al.* Correlation between gamma-ray-induced G2 arrest and radioresistance in two human cancer cells. *International Journal of Radiation Oncology Biological Physics*. n. 44, p. 905-909, 1999.

THOMPSON C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. v. 1, n. 267, p. 456-462, 1995.

VALENÇA, P. L. F. *Esquistossomose mansoni humana: influência da IL-10 no fenótipo celular do granuloma in vitro*. Tese (Doutorado) Fundação Oswaldo Cruz, pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Área de concentração: Imunologia. Rio de Janeiro, Maio 2000. 125 p.

VALLE, J. C. *Câncer de mama locorregional avançado*. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999. 221 p.

VANDERSICKEL, V.; *et al.* The radiosensitizing effect of Ku70/80 knockdown in MCF10A cells irradiated with X-rays and p(66)+Be(40) neutrons. *Radiation Oncology*. v. 5, n. 30, p. 1-7, 2010.

YANG, J.; WEINBERG, R. A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental Cell*. v. 14, n. 6, p.818–829, 2008.

ZUCALI, R. *A conservação da mama: indicações e técnicas da quadrantectomia, dissecação axilar e radioterapia no câncer de mama*. São Paulo: Ícone, 1992. 171 p.