

RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES DE INSTRUMENTAÇÃO PARA PESQUISA

Disciplina F 530 – Instrumentação I

Prof. Dr. José Joaquín Lunazzi

**Irradiação com nêutrons de cultura de células submetidas a vácuo:
desenvolvimento de um aparato experimental a ser utilizado para estudos de
BNCT**



Aluna: Bárbara Smilgys
(*bsmilgys at ifi dot unicamp dot br*)

Orientador: Prof. Dr. Sandro Guedes de Oliveira
Departamento de Raios Cósmicos e Cronologia, Instituto de Física “Gleb Wataghin”, Unicamp

Resumo

Neste projeto, buscou-se desenvolver um aparato experimental de uma câmara submetida a baixo vácuo para a irradiação de culturas de células com partículas α emitidas por uma fonte radioativa de ^{226}Ra . Tal câmara deve acomodar a placa de cultura de células e a fonte radioativa em seu interior, pois com a aplicação de baixo vácuo à montagem, minimiza-se as perdas de energia das partículas α devido às interações com o ar presente no percurso até as células, fazendo com que tenhamos uma melhor determinação da energia de incidência destas partículas, o que favorece a determinação mais precisa da dose entregue às células. Porém, a intensidade do vácuo a ser escolhida e o tempo de irradiação devem ser tais que não prejudiquem a cultura de células. Assim, para garantir que as células sofram danos somente devido à radiação, foi escolhida uma placa de cultura com vários *clusters* que permite que células de controle não sejam irradiadas, mas que sejam submetidas ao mesmo vácuo, pelo mesmo período de tempo, que aquelas células que foram irradiadas.

Foram realizados o planejamento e preparos iniciais do sistema de vácuo, tais como manutenção da bomba de vácuo, seleção da câmara que acomoda a montagem experimental, planejamento, pedido de confecção e de compra de peças relacionadas ao fechamento da câmara, além da montagem da placa e da tampa que são utilizadas para as irradiações dentro da câmara escolhida.

Para uma análise sistemática da intensidade de vácuo necessária para que as partículas α da fonte radioativa de ^{226}Ra cheguem ao alvo, foram irradiados detectores PADC sob baixo vácuo e em diferentes tempos. E para uma análise da sobrevivência de células, foram realizadas irradiações de células sem a presença de vácuo.

Introdução

Idealmente, tratamentos de cânceres devem destruir seletivamente as células tumorais sem que ocorram maiores danos ao tecido sadio. Com esta meta, uma terapia baseada na reação de captura de nêutrons térmicos pelo ^{10}B (um isótopo estável do boro), a Terapia de Captura de Nêutrons pelo Boro (*Boron Neutron Capture Therapy*, BNCT), vem sendo pesquisada mundialmente. A BNCT é uma radioterapia binária que consiste em injetar boro no tecido e irradiá-lo com nêutrons térmicos (com energia menor que 0,5 eV). Quando o ^{10}B captura nêutrons térmicos, decai em partícula α (1,47 MeV) e íon de ^7Li (0,84 MeV), ambos com alta transferência de energia linear ($\text{LET}_\alpha \sim 190 \text{ keV}/\mu\text{m}$ e $\text{LET}_{\text{Li}} \sim 160 \text{ keV}/\mu\text{m}$), e seus alcances combinados são da ordem do diâmetro de uma célula típica ($\sim 12 \mu\text{m}$). Assim, se a concentração de ^{10}B nas células tumorais é maior que nas células saudáveis, o dano causado pelo decaimento do boro será muito maior para o câncer. Pesquisas mostram que a BNCT pode ser eficiente no tratamento de tumores inoperáveis ou daqueles que já apresentam metástase (Coderre and Morris, 1999; Barth *et al.*, 2005; Altieri *et al.*, 2008; Ballarini *et al.*, 2009).

Neste trabalho, começou a ser desenvolvida uma montagem experimental na qual culturas de células são irradiadas sob vácuo de baixa intensidade, de forma que as partículas incidentes (escolheremos, aqui, partículas α de uma fonte de ^{226}Ra) não percam energia durante o percurso até o alvo. É importante notar que a intensidade do vácuo a ser escolhida deve ser baixa o suficiente para minimizar as perdas de energia das partículas α por interações com o ar presente no caminho até o alvo, mas não pode ser alta a ponto de prejudicar a cultura de células, já que para garantir a sobrevivência das células, estas são mantidas à atmosfera com concentração de CO_2 e temperatura bem definidas.

Para tentar avaliar a resposta das células à irradiação, é necessário que as energias das partículas incidentes sejam bem determinadas, pois assim teremos valores de dose entregue às células bem determinados. Logo, a montagem de uma câmara de baixo vácuo é feita com o propósito de se ter controle sobre as energias das partículas incidentes, uma vez que ao interagirem com o ar, perdem

energia e modificam a sua trajetória, de modo que ao invés de energias bem determinadas, temos uma distribuição de energias incidindo no alvo.

Para um estudo detalhado, é necessário antes de submeter as células à vácuo durante a irradiação, avaliar a intensidade de vácuo necessária para que as partículas incidentes cheguem ao alvo (após percorrerem uma distância pré-determinada entre a fonte radioativa e o alvo) e também a morte celular devido somente à irradiação (sem presença de vácuo). Assim, paralelamente ao desenvolvimento da câmara de vácuo foram realizados experimentos para determinar a intensidade do vácuo mínima para que as partículas α cheguem até o alvo e o tempo de irradiação para induzir morte celular.

Objetivos

Neste projeto, iniciou-se o desenvolvimento de um aparato que consiste de uma câmara submetida a vácuo de baixa intensidade para realizar irradiações de culturas de células. Para tanto, foi utilizada para as irradiações uma fonte radioativa de ^{226}Ra , que emite partículas α com energias entre 3,73 e 6,97 MeV.

Os principais objetivos deste projeto são garantir que a câmara a ser desenvolvida possa acomodar a montagem experimental de forma que as partículas incidentes cheguem às células com energia bem determinada e que a intensidade do vácuo utilizado durante as irradiações de culturas de células seja escolhida de forma a minimizar as perdas de energia das partículas incidentes devido às interações com o ar no percurso até o alvo sem alterar de forma prejudicial a atmosfera a qual as células devem ser mantidas para que sobrevivam.

Assim, este trabalho consiste de três etapas principais: análise da intensidade de vácuo mínima necessária para que as partículas α percorram uma distância pré-determinada entre a fonte radioativa e o alvo, análise da morte celular devido somente à irradiação com partículas α e o desenvolvimento da

câmara de vácuo que acomoda a montagem experimental durante as irradiações de culturas de células.

Resultados e análise de dados

– Desenvolvimento da câmara de baixo vácuo

A bomba de vácuo escolhida é uma bomba pequena que fornece um vácuo de baixa intensidade (com *range* nominal de 10^3 a 1 hPa) da fabricante Alcatel Vacuum acoplada a um motor de 2850 rpm da Elnor Motors N.V. (Figura 1). O valor do vácuo fornecido pela bomba ainda não foi medido, já que depende do término da construção da câmara, porém, o equipamento que será utilizado para tal finalidade já foi escolhido. Porém, um passo importante para a realização do experimento é o bom funcionamento da bomba, e para tanto, os responsáveis pela Oficina de Vácuo (IFGW/Unicamp) testaram-na (Ordem de Serviço nº 3211).

A câmara escolhida é um *crossing* (emprestado pelo Laboratório de Léptons, IFGW/Unicamp) usado em sistemas de vácuo (Figura 1) que não possuía flanges e para tanto, foi necessário planejá-las e solicitar a confecção. São necessárias quatro flanges cegas (sem aberturas) e duas flanges com aberturas, sendo que a uma destas seria acoplado o flexível ligado a uma válvula de abertura de vácuo (ligada à bomba de vácuo) e a outra é acoplada um manômetro. Ao todo, são nove peças: seis flanges de aço inox e três peças para acoplar o flexível (confecção em aço inox), o manômetro (confecção em aço inox) e a válvula (confecção em latão).

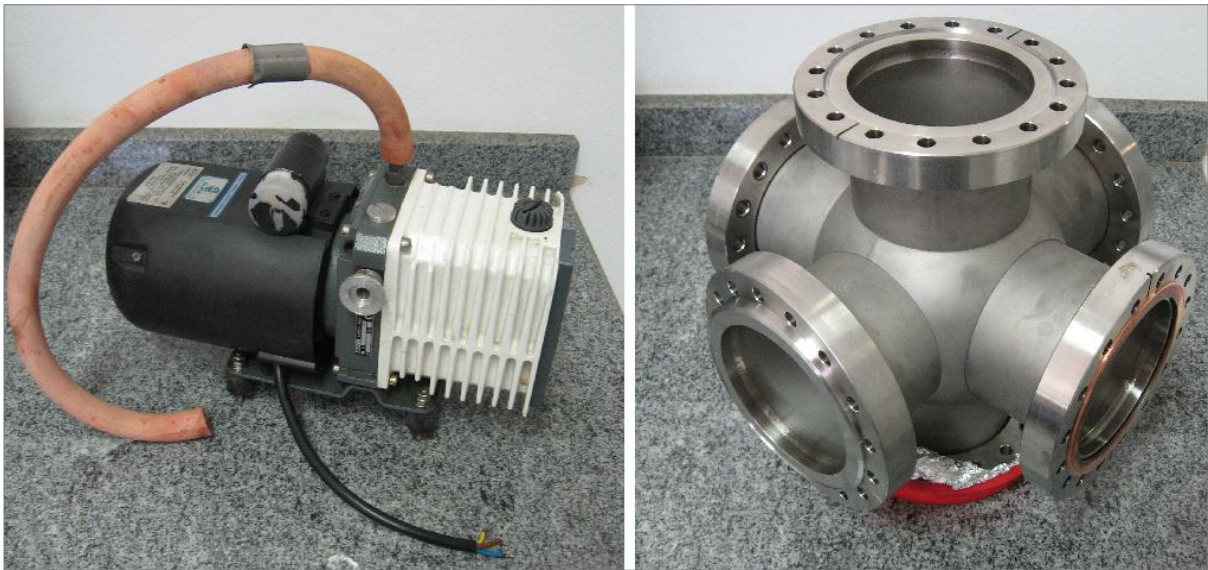


Figura 1: Bomba de baixo vácuo (à esquerda) e *crossing* que será utilizado como a câmara de vácuo (à direita).

A solicitação de confecção destas peças já foi encaminhada à Oficina Mecânica (IFGW/Unicamp), sob os cuidados do Sr. André Luis Pissolatti (Ordem de Serviço nº 3221) e o prazo para confecção era de 20 dias (a contar a partir de 01 de outubro de 2012), porém este prazo não foi cumprido e, portanto o desenvolvimento da câmara não foi finalizado. Somente os conectores (dois em aço inox, para serem soldados a uma flange, e um em latão, para ser soldado ao flexível) foram confeccionados e entregues e a solda entre o conector de latão e o flexível já foi realizada (Ordem de Serviço nº 3364).

- Aparato para irradiar células: adaptação da placa de cultura e da tampa para suporte da fonte radioativa

As células são crescidas em uma placa de cultura que contém 96 *clusters*, de poliestireno, com fundo plano, da Corning Incorporated®, com dimensões de 12,5 cm x 8,5 cm x 2,0 cm (modelo Costar® 3599). Para que a irradiação seja feita somente em alguns dos *clusters* da placa de cultura, a tampa da placa é utilizada como suporte para a fonte radioativa de ^{226}Ra e para que seja possível

encaixar a fonte na tampa, esta foi cortada a laser no Laboratório de Automação e Prototipagem para Arquitetura e Construção (LAPAC) da FEC/Unicamp.

Para avaliar o vácuo com relação às energias das partículas α incidentes, podemos usar a câmara somente para irradiar detectores plásticos PADC e, portanto, é necessário que os detectores sejam cortados de forma que possam ser colocados dentro de cada *cluster* da placa de cultura. Assim, cada detector PADC (com dimensões de 3 cm x 3 cm) foi cortado a laser, também no LAPAC, em 16 circunferências de tamanhos iguais (com 6 mm de diâmetro cada uma).

Por fim, com base nas informações de perda de energia no ar das partículas α emitidas pela fonte de ^{226}Ra , percebe-se que não há necessidade de se colocar uma placa móvel dentro da câmara de vácuo, pois somente com a abertura da válvula, que permite a entrada de ar na câmara, já teremos o interrompimento da irradiação. Assim, usaremos um arranjo para irradiação (Figura 2) no qual poderemos variar a distância entre a tampa (com a fonte de ^{226}Ra) e a placa de cultura usando parafusos e porcas.



Figura 2: Arranjo experimental para irradiação dentro da câmara de vácuo com a placa de 96 *clusters*. A fonte radioativa de ^{226}Ra é encaixada nos buracos da tampa.

– Escolha da intensidade de vácuo a ser utilizada

Para o sistema de irradiação de células sob vácuo, podemos usar uma câmara na qual a fonte radioativa é posicionada a uma distância de aproximadamente 7 cm das células, pois assim as partículas α da fonte de ^{226}Ra perdem toda sua energia nesse percurso e não atingem as células até que o vácuo seja feito dentro da câmara (esta distância foi escolhida com base em dados obtidos a partir de simulações realizadas no SRIM 2012 para partículas α percorrendo ar). Este é um mecanismo de início e término do intervalo de tempo de irradiação que não depende de estruturas físicas, tais como placas, bloqueando a passagem das partículas α , tornando o desenvolvimento da câmara mais simples.

Assim, é necessário irradiar detectores PADC com diferentes valores de intensidade de vácuo para que seja possível determinar qual o vácuo mínimo em que é possível observar traços nos detectores posicionados a 7 cm da fonte de ^{226}Ra . Os experimentos foram realizados no Laboratório de Vácuo do IFGW/Unicamp, utilizando o equipamento da Figura 2 (detalhes nas Figuras 3 e 4).

Para os primeiros testes, buscou-se irradiar os detectores a diferentes intensidades de vácuo (das ordens de 1 a 100 mbar) e a intervalos de tempo diferentes, para que fosse possível avaliar qual o menor vácuo para o qual é possível observar traços nos detectores. Os poços de irradiação são determinados de acordo com os cortes feitos na tampa da placa de cultura (para acomodar a fonte radioativa). Os tempos de irradiação, para as primeiras irradiações, foram marcados após se atingir o valor de vácuo desejado, mas observou-se que a bomba de baixo vácuo demora cerca de 1 minuto para atingir vácuos das ordens escolhidas, então se tornou necessário também marcar o tempo para que o vácuo seja atingido. Os parâmetros das irradiações encontram-se na Tabela 1.

A observação dos traços nos detectores PADC é feita em microscópio óptico (Axioplan Imaging 2) em magnificação de 1000 \times após tratamento químico dos detectores com solução de 6,25 M de NaOH a 70,0°C por 90 minutos.



Figura 2: Equipamento do Laboratório de Vácuo do IFGW/Uncamp utilizado para os testes referentes à análise de intensidade de vácuo necessária para que as partículas α provenientes da fonte radioativa de ^{226}Ra cheguem até os detectores PADC (posicionados a 7 cm da fonte).

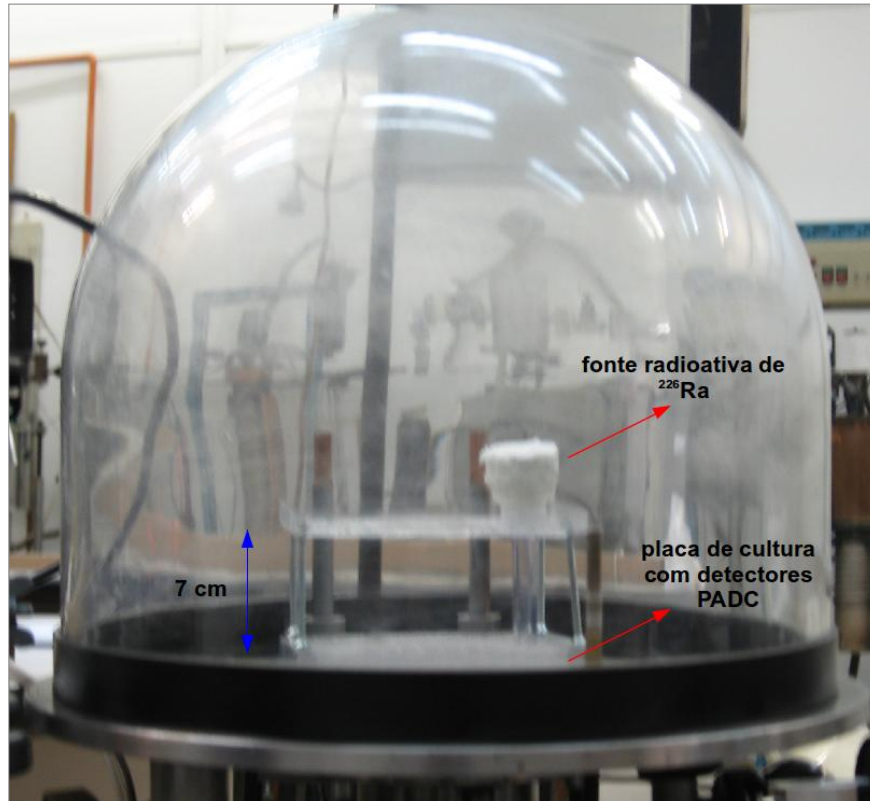


Figura 3: Detalhe da câmara de vácuo utilizada para os testes referentes à análise de intensidade de vácuo.

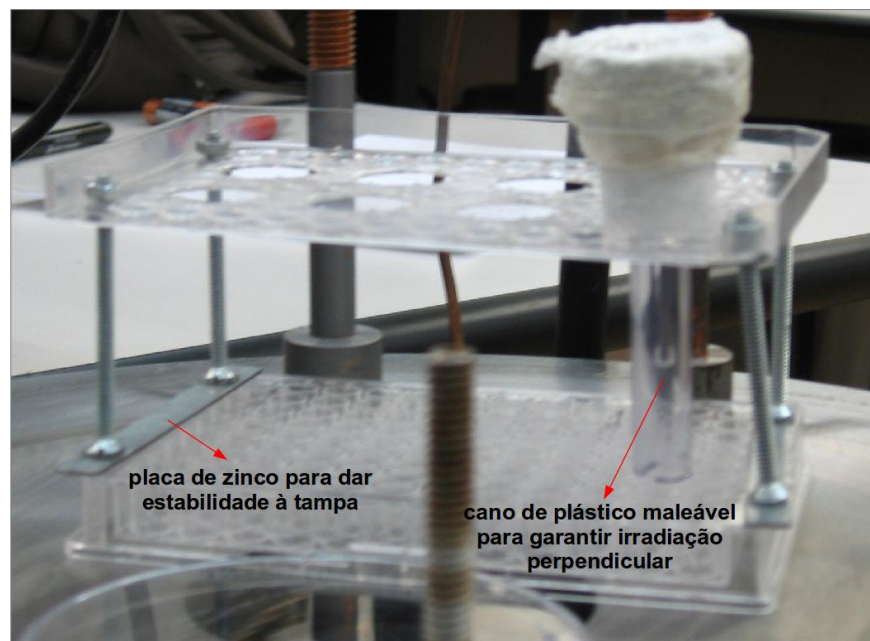


Figura 4: Detalhe da montagem da placa de cultura de células com a tampa dando suporte à fonte radioativa.

poço de irradiação	intensidade do vácuo (mbar)	tempo para atingir vácuo (s)	tempo de irradiação (s)
F2	$5,6 \cdot 10^2$	-	25"
C5	$5,4 \cdot 10^2$	-	15"
F5	$6,2 \cdot 10^2$	-	15"
C8	$6,0 \cdot 10^2$	-	10"
F8	$4,8 \cdot 10^2$	-	12"
C11	$6,0 \cdot 10^2$	-	7"
F11	$5,0 \cdot 10^2$	-	7"
C2	$6,4 \cdot 10^1$	-	20"
C5	$3,8 \cdot 10^1$	1'08"	17"
C8	$4,9 \cdot 10^1$	1'11"	11"
C11	$5,6 \cdot 10^1$	1'12"	6"
F2	$4,8 \cdot 10^0$	1'12"	18"
F5	$5,3 \cdot 10^0$	1'52"	14"
F8	$6,2 \cdot 10^0$	1'51"	10"
F11	$5,5 \cdot 10^0$	1'52"	13"

Tabela 1: Parâmetros das irradiações de detectores PADC com fonte de ^{226}Ra (a 7 cm de distância), submetidos a diferentes intensidades de vácuo, por diferentes tempos.

Os detectores irradiados conforme os dados apresentados na Tabela 1 apresentam traços apenas para vácuo de intensidade superior a $5,6 \cdot 10^1$ mbar e assim, este valor foi escolhido para se realizar um estudo mais sistemático, de forma a controlar melhor o tempo de irradiação, após se atingir intensidade de vácuo desejada, além de também ter maior controle sobre a quantidade de partículas α que atingem o detector durante o tempo em que o vácuo ainda não foi atingido. A intensidade de vácuo escolhida foi de aproximadamente $2,0 \cdot 10^1$ mbar e o tempo inicial usado para a irradiação foi escolhido como o tempo no qual era atingido o vácuo de $5,0 \cdot 10^1$ mbar, ou seja, após fechar a câmara e iniciar o bombeamento para formação de vácuo, o cronômetro só seria iniciado, para marcar o tempo de irradiação, ao se atingir $5,0 \cdot 10^1$ mbar. Os dados destas irradiações se encontram na Tabela 2.

poço de irradiação	intensidade do vácuo (mbar)	tempo de irradiação (s)	densidade superficial de traços (10^5 cm^{-2})
F11	$5,0 \cdot 10^1$	0	$0,64 \pm 0,25$
C2	$2,0 \cdot 10^1$	30	$0,89 \pm 0,30$
F2	$1,7 \cdot 10^1$	45	$0,98 \pm 0,31$
C5	$1,8 \cdot 10^1$	60	$1,17 \pm 0,34$
F5	$1,5 \cdot 10^1$	75	$1,21 \pm 0,35$
C8	$1,8 \cdot 10^1$	90	$1,46 \pm 0,38$
F8	$1,8 \cdot 10^1$	105	$1,52 \pm 0,39$
C11	$1,5 \cdot 10^1$	120	$1,69 \pm 0,41$

Tabela 2: Dados das irradiações de detectores PADC com fonte de ^{226}Ra (a 7 cm de distância), submetidos à intensidade de vácuo média de $1,7 \cdot 10^1$ mbar, por diferentes tempos. O tempo inicial da irradiação foi considerado como o tempo no qual o vácuo atinge $5,0 \cdot 10^1$ mbar.

Os detectores foram tratados quimicamente com solução de 6,25 M de NaOH a $70,0^\circ\text{C}$ por 90 minutos e a contagem de traços foi feita em magnificação de $1000\times$ em microscópio óptico (Axioplan Imaging 2). A partir dos valores de densidade superficial de traços, obtém-se o gráfico mostrado na Figura 5, que apresenta comportamento linear. A partir de seu ajuste, obtém-se coeficiente angular igual a $(8,7 \pm 3,0) \cdot 10^2 \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e coeficiente linear igual a $(6,2 \pm 2,0) \cdot 10^4 \text{ cm}^{-2}$, logo, podemos escrever a densidade superficial de traços observados no detector (σ) em função do tempo de irradiação (t) como:

$$\sigma(t) = kt + \sigma_0 \quad (\text{Equação 1})$$

com $k = (8,7 \pm 3,0) \cdot 10^2 \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e $\sigma_0 = (6,2 \pm 2,0) \cdot 10^4 \text{ cm}^{-2}$.

É importante notar que as partículas α começam a ser detectadas antes do tempo inicial escolhido, já que assim que o vácuo começa a ser feito dentro da câmara, a densidade do ar vai diminuindo e as perdas de energia dessas partículas vão se tornando menores, até que em certo tempo, conseguem chegar ao detector. Assim, a partir da Equação 1, podemos encontrar o tempo (antes do nosso zero escolhido) que corresponde ao intervalo de tempo em que as partículas α já começaram a chegar no detector, isto é, 72 segundos antes do nosso zero escolhido as partículas α já começaram a ser

detectadas.

Portanto, o sistema foi calibrado e embora isto tenha sido feito em uma câmara de vácuo diferente da que será utilizada no futuro, o mesmo método poderá ser empregado quando a câmara projetada for concluída.

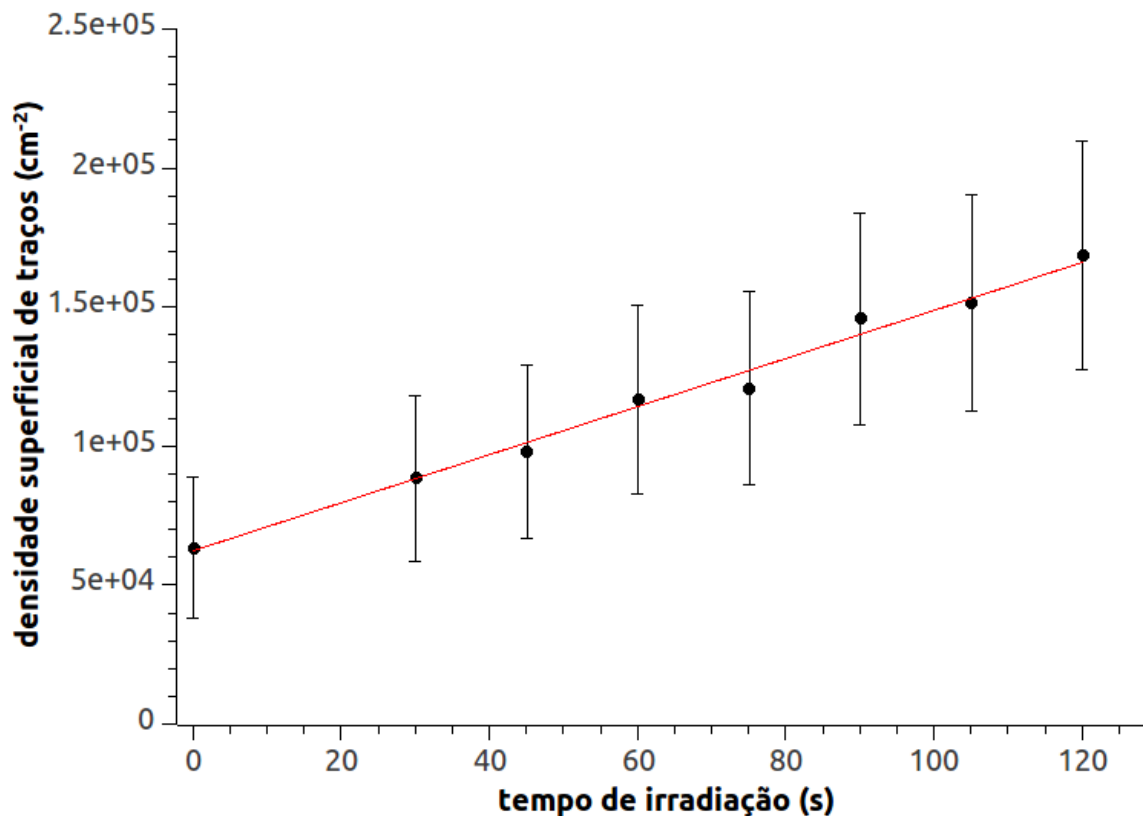


Figura 5: Gráfico de densidade superficial de traços (em detectores PADC) em função do tempo de irradiação com fonte de ²²⁶Ra (para intensidade média de vácuo igual a $1,7 \cdot 10^1$ mbar). O tempo inicial é dado para intensidade de vácuo de $5,0 \cdot 10^1$ mbar.

– Irradiação de células sem presença de vácuo

As células utilizadas neste trabalho foram a Hek293T (células epiteliais aderentes) que são cultivadas em meio de cultura (líquido no qual as células são crescidas) *Dulbecco's Modified Eagle's*

Medium (DMEM), que contém aminoácidos, sais, glucose e vitaminas, diluído em soro fetal bovino e solução de bicarbonato de sódio, e o volume padrão utilizado para a cultura de células em uma placa de cultura de 96 *clusters* é de 200 µl por *cluster*. Para este trabalho, usou-se para o plaqueamento das células, a quantidade de $5 \cdot 10^3$ células por poço, que se multiplicam (com ciclo celular de aproximadamente 19 horas) até o dia escolhido para a irradiação. Escolhemos irradiar as células depois de um ou dois dias do plaqueamento, para que não houvesse grande quantidade de células em cada poço, o que levaria à morte celular devido à falta de espaço para multiplicação. Todas as células foram cultivadas e irradiadas no LNBio/CNPEM, com a ajuda da doutoranda Fernanda Luisa Basei.

Como as primeiras irradiações são feitas sem a presença de vácuo, para avaliar a morte celular devido somente à irradiação com partículas α , é necessário que a fonte radioativa esteja o mais próximo possível das células, para minimizar a quantidade de ar que será percorrido pelas partículas α e, conseqüentemente, minimizar as perdas de energias. Além disso, após análise experimental da influência do meio de cultura na irradiação, que foi feita irradiando-se detectores PADC com meio de cultura em sua superfície (Figura 6), decidiu-se retirar a maior quantidade possível deste meio (após a cultura de células ter crescido e pouco antes da irradiação) de cada *cluster* a ser irradiado, para que o meio de cultura não levasse à perda de energia das partículas α provenientes da fonte de ^{226}Ra . Após a irradiação, o meio de cultura é colocado novamente nas células, para que estas não morram por falta de nutrientes.

Assim, as irradiações foram realizadas de acordo com a Figura 7, na qual é possível observar que a placa de cultura, durante as irradiações, foi colocada sobre uma chapa metálica à temperatura de 37°C, para que as células não sofressem mais do que a retirada do meio de cultura (para a boa sobrevivência das células, elas são mantidas com meio de cultura em uma estufa a 37°C, com concentração específica de CO₂).

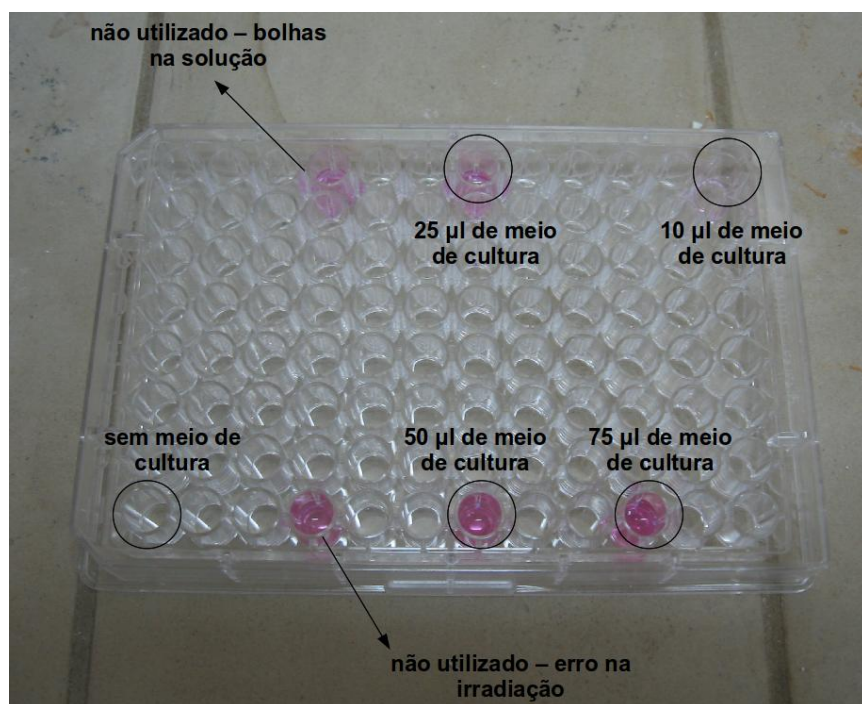


Figura 6: Placa de cultura com DMEM em alguns de seus *clusters* (os detectores PADC ficam cobertos pelo meio de cultura). Foram utilizados diferentes volumes de solução para avaliar a perda de energia das partículas α provenientes da fonte de ^{226}Ra neste meio.

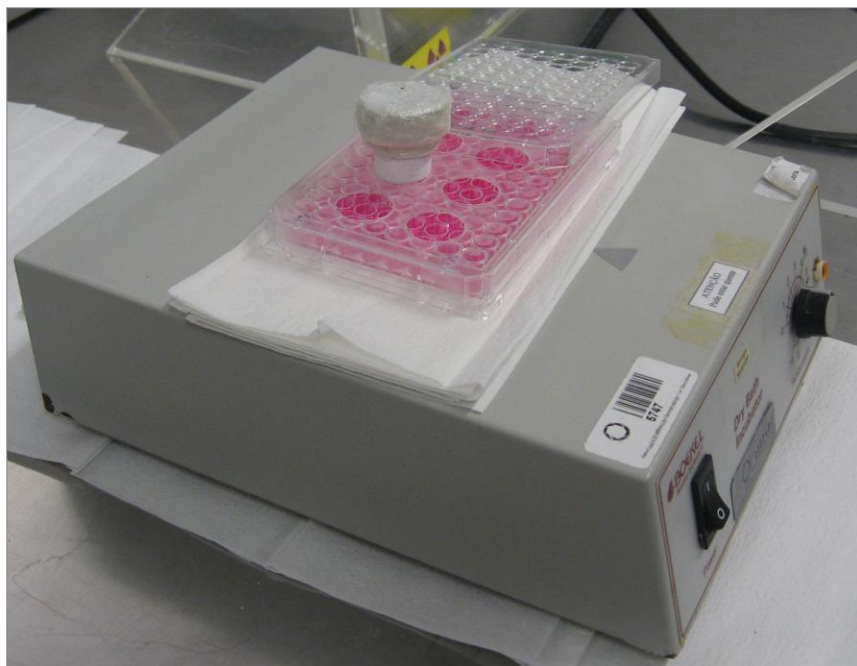


Figura 7: Irradiação de células com partículas α sem presença de vácuo. Para minimizar as perdas de energia das partículas incidentes, a fonte é posicionada encostada à placa de cultura e os poços que são irradiados têm o meio de cultura retirado pouco antes da irradiação. A placa é mantida sobre chapa metálica a 37°C para minimizar outros efeitos devido a não permanência das células em estufa apropriada.

Para a primeira irradiação das células, desejávamos ver a morte celular para termos um controle negativo do experimento. O controle negativo (assim como o controle positivo, no qual não há morte celular) é necessário como uma referência para a curva de dose vs resposta, ou seja, assim podemos estabelecer qual a dose necessário para se induzir morte celular.

O tempo de irradiação foi escolhido com base nas densidades superficial de células em cada poço e na densidade superficial de traços observados no detector PADC irradiado na mesma configuração por um intervalo de tempo determinado, da qual é possível obter o fluxo de partículas α emitidas pela fonte de ^{226}Ra usada ($\phi_\alpha \sim 3,84 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Assim, para uma quantidade de aproximadamente 10^5 células por poço (estimada para o dia da irradiação), escolheram-se tempos de irradiação de 5 s, 34 s, 68 s e 128 s. É importante ressaltar que todos os experimentos devem ser feitos em no mínimo duplicata ou triplicata, para garantir que o possível efeito observado não é causado por variação estatística.

Para analisar a quantidade de células vivas presentes em cada poço, é feito um teste colorimétrico usando um composto diluído em meio de cultura, o MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), que é metabolizado pelas células, para que então a absorvância seja medida e relacionada ao número de células vivas. Este teste tem valores bem estabelecidos para o número de células por poço em função da absorvância medida depois de 1 hora de colocado o MTS. Para o primeiro experimento, feito em triplicata, colocou-se MTS logo após a irradiação das células e após 1 hora foi feita a medida de absorvância, que mostrou que tanto os poços que foram irradiados quanto os poços que não foram irradiados possuíam em média a mesma quantidade de células vivas.

Assim, para o planejamento do segundo experimento, levou-se em consideração que apesar de se ter feito irradiações por um intervalo de tempo que resultaria em uma fluência de partículas α que corresponderia à densidade superficial de células, deveríamos levar em conta a probabilidade de interação dessas partículas com as células.

Para tanto, supõe-se que os eventos obedecem à probabilidade de Poisson e então podemos considerar que a probabilidade de ocorrer n ou mais eventos de interação de partículas, a dada fluência, em uma área é dada por:

$$P(n \text{ ou mais eventos}) = 1 - e^{-A\varphi} \sum_{i=0}^{n-1} \frac{A\varphi^i}{i!} \quad (\text{Equação 2})$$

onde A é a área de interesse e φ é a fluência (fluxo integrado no tempo) de partículas incidentes.

Assim, para a célula utilizada (Hek293T), que possui diâmetro médio de 13 μm , escolheram-se intervalos de tempos de irradiação para os quais as probabilidades de interação eram superiores a 90%, ou seja, tempos da ordem de 30 minutos. Logo, no segundo experimento, feito em duplicata, irradiou-se poços por 10 e 30 minutos. Além disso, com base em leituras de artigos (Chauhan *et al.*, 2011, 2012), a análise de MTS não foi feita logo após as irradiações; escolheu-se esperar um dia para realizá-la, porém, mesmo aumentando o tempo de irradiação e esperando um dia para que os efeitos aparecessem, a análise da absorbância resultou em número de células vivas iguais para os poços irradiados e os não irradiados.

Portanto, para o planejamento do terceiro experimento, foi levantada a hipótese de que 1 evento por célula não é suficiente para induzir morte celular, já que para que isto ocorra, é importante que ocorra dano ao DNA de forma irreversível. Logo, decidiu-se calcular tempos de irradiação para os quais as probabilidades de ocorrerem 4 ou mais eventos de interação das partículas α com o núcleo (volume de aproximadamente 10% do volume celular total) fossem superiores a 90%. Além disso, também foi planejada a irradiação de outro tipo de célula além da Hek293T, para avaliar a resistência desta célula à radiação. Portanto, foram feitas, em duplicata, irradiações (em cada poço de interesse) por 90 minutos, de células Hek293T e células NIH-3T3, e a análise de MTS será realizada somente após 96 horas da irradiação (Chauhan *et al.*, 2011, 2012).

Os experimentos com irradiações de células ainda não foram concluídos (a última irradiação foi realizada em 10 de novembro de 2012, às 22:00), pois este é um trabalho extenso que demanda de

grandes intervalos de tempo entre repicar as células, plaqueá-las, irradiá-las e analisar com MTS a sobrevivência e com os primeiros testes não foi possível observar morte celular devido à irradiação com partículas α (controle negativo). Por se tratar de experimentos na área de Biologia, muitos fatores, tais como contaminação do meio de cultura, contaminação das células, morte celular devido a *stress* por falta de meio (quando ocorrem irradiações por tempos muito longos), são importantes e podem atrapalhar o bom andamento do projeto.

Conclusões

O projeto consistia em três partes principais: a análise da intensidade de vácuo mínima necessária para que as partículas α percorram uma distância pré-determinada entre a fonte radioativa e o alvo, a análise da morte celular devido somente à irradiação com partículas α e o desenvolvimento da câmara de vácuo que acomoda a montagem experimental durante as irradiações de culturas de células.

Houve problemas com relação à entrega das peças cujas confecções foram solicitadas para a Oficina Mecânica do IFGW/Unicamp e assim, o término do desenvolvimento da câmara a vácuo foi comprometido. Porém, a análise do vácuo mínimo necessário para que partículas α provenientes de uma fonte de ^{226}Ra cheguem ao alvo, distantes 7 cm, foi realizada com o uso de equipamentos disponíveis no Laboratório de Vácuo do IFGW/Unicamp e concluiu-se que é preciso vácuo de intensidade da ordem de 10 mbar.

O método de calibração do sistema de vácuo para irradiações com estas partículas α provenientes da fonte de ^{226}Ra também foi feito (com o uso do mesmo equipamento) e pode ser repetido para a câmara em desenvolvimento tão logo esta esteja pronta. Foi possível observar o comportamento linear da densidade de traços observados em detectores PADC irradiados com a fonte de ^{226}Ra sob vácuo de intensidade pré-estabelecida (valor médio de $1,7 \cdot 10^1$ mbar) em função do tempo de irradiação e com isso também pudemos calcular o tempo para o qual as partículas α já conseguem

chegar ao detector (distante 7 cm da fonte radioativa), que é de 72 segundos antes de nosso tempo inicial escolhido (que corresponde ao tempo no qual o vácuo dentro da câmara era de $5,0 \cdot 10^{-1}$ mbar).

Com relação aos experimentos de irradiações de células, as dificuldades de se lidar com sistemas biológicos e a necessidade de se fazer os experimentos em duplicata, no mínimo, fez com que o tempo investido fosse muito longo, não permitindo ainda que fosse obtido o controle negativo do experimento, o qual corresponde à morte celular e é necessário como referência para o levantamento da curva de dose *vs* resposta. Porém, os experimentos continuam sendo realizados e o aprendizado envolvendo o cultivo, plaqueamento e manutenção de células e de análise de sobrevivência celular usando MTS, tanto quanto o aprendizado de mecanismos de biologia celular, bioquímica e radiobiologia, estão sendo imensos e serão usados para a continuação deste trabalho.

Agradecimentos

À Fernanda Luisa Basei (Laboratório de Micro-Análise, LNBio/CNPEM), pelo cultivo e ajuda com a irradiação das culturas de células e análise de morte celular, ao Renato Lopes de Souza (Laboratório de Vácuo, IFGW/Unicamp) pela colaboração com o desenvolvimento da câmara e com os testes de irradiação de detectores PADC sob vácuo, ao Arnaldo Luis Lixandrão Filho (Grupo de Cronologia, DRCC/IFGW/Unicamp) pelas idéias relacionadas ao sistema de abertura e fechamento de vácuo.

Parecer do orientador

“Durante o projeto, a Bárbara elaborou um projeto para irradiação de células com partículas alfa. O projeto está sendo muito bem executado. A câmara ainda não está completamente pronta porque houve atrasos na confecção de peças na nossa oficina mecânica. Mesmo assim, ela conseguiu

estabelecer, usando uma câmara de vácuo emprestada, o método de calibração considerando as especificidades do aparato do projeto. Também fez testes com irradiação de células. A Bárbara mostrou muita dedicação ao projeto. Considero o relatório muito bom.”

Referências

Altieri, S.; Bortolussi, S.; Bruschi, P.; Chiari, P.; Fossati, F.; Stella, S.; Prati, U.; Roveda, L.; Zonta, A.; Zonta, C.; Ferrari, C.; Clerici, A.; Nano, R.; Pinelli, T. 2008. Neutron autoradiography imaging of selective boron uptake in human metastatic tumours. *Appl. Radiat. Isot.* 66, 1850-1855

Ballarini, F.; Bakeine, J.G.; Bortolussi, S.; Bruschi, P.; Clerici, A.M.; De Bari, A.; Dionigi, P.; Ferrari, C.; Gadan, M.A.; Protti, N.; Stella, S.; Zonta, C.; Altieri, S. 2009. Nuclear Physics meets Medicine and Biology: Boron Neutron Capture Therapy. *In: 12th ICNRM*, 561-571

Barth, R.; Coderre, J.A.; Vicente, M.G.H.; Blue, T.E. 2005. Boron Neutron Capture Therapy of Cancer: Current status and future prospects. *Clin. Cancer Res.* 11, 3987-4002

Bortolussi, S. 2007. Boron Neutron Capture Therapy of Disseminated Tumours . *PhD thesis presented at Università degli Studi di Pavia*

Chauhan, V.; Howland, M.; Chen, J.; Kutzner, B.; Wilkins, R.C. 2011. Differential Effects of Alpha-Particle Radiation and X-Irradiation on Genes Associated with Apoptosis. *Radiol. Res. and Pract.*, article ID 679806

Chauhan, V.; Howland, M.; Greene, H.B.; Wilkins, R.C. 2012. Transcriptional and Secretomic Profiling of Epidermal Cells Exposed to Alpha Particle Radiation. *The Open Biochem. Journal* 6, 103-115

Coderre, J.A.; Morris, G.M. 1999. The radiation biology of Boron Neutron Capture Therapy. *Radiat. Res.* 151, 1-18

Deevband, M.R.; Abdolmaleki, P.; Kardan, M.R.; Khosravi, H.R.; Taheri, M. 2011. An investigation on the response of PADC detectors to neutrons. *Appl. Radiat. Isot.* 69, 340-345

Durham, J.S.; Blue, T.E.; Wehring, B.W.; Ragheb, M.H.; Blue, J.W. 1989. Microdosimetry in fast-neutron therapy by automatic readout of CR-39 solid state nuclear track detectors. *Nuc. Instr. Meth. Phys. Res.* B36, 319-331

Ferrari, C.; Bakeine, J.; Ballarini, F.; Boninella, A.; Bortolussi, S.; Bruschi, P.; Cansolino, L.; Clerici, A.M.; Coppola, A.; Di Liberto, R.; Dionigi, P.; Protti, N.; Stella, S.; Zonta, A.; Zonta, C.; Altieri, S. 2011. In Vitro and In Vivo Studies of Boron Neutron Capture Therapy: Boron Uptake/Washout and Cell Death. *Rad. Res.* **175**, 452-462

Gadan, M.A.; Bortolussi, S.; Postuma, I.; Ballarini, F.; Bruschi, P.; Protti, N.; Santoro, D.; Stella, S.; Cansolino, L.; Clerici, A.; Ferrari, C.; Zonta, A.; Zonta, C.; Altieri, S. 2012. Set-up and calibration of a method to measure ^{10}B concentration in biological samples by neutron autoradiography. *Nucl. Instr. Meth. Phys. B* **274** 51-56

Garabalino, M.A.; Monti Hughes, A.; Molinari, A.J.; Heber, E.M.; Pozzi, E.C.; Cardoso, J.E.; Colombo, L.L.; Nievas, S.; Nigg, D.W.; Aromando, R.F.; Itoiz, M.E.; Trivillin, V.A.; Schwint, A.E. 2011. Boron neutron capture therapy (BNCT) for treatment of liver metastases: biodistribution of boron compounds in an experimental model. *Radiat. Environ. Biophys.* **50**, 199-207

Maino, L.M. 2009. Caracterização de um detector de partículas alfa CR-39 exposto a uma fonte de rádio. *Projeto de Instrumentação I (F 530) desenvolvido no DRCC/IFGW/Unicamp*

Nikezic, D.; Yu, K.N. 2004. Formation and growth of tracks in nuclear track materials. *Materials Science and Engineering* **R46**, 51-123

Ogura, K.; Yanagie, H.; Eriguchi, M.; Lehmann, E.H.; Kühne, G.; Bayon, G.; Kobayashi, H. 2004. Neutron capture autoradiography study of the biodistribution of ^{10}B in tumor bearing mice. *Appl. Radiat. Isot.* **61**, 585-590

Smilgys, B.; Guedes, S.; Hadler, J.C.; Coelho, P.R.P.; Alencar, I.; Soares, C.J.; Salim, L.A. 2011. Manufacturing of boron thin films for the measurement of the $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ reaction in BNCT. *Proceedings of Science, XXXIV BWNP*

Smilgys, B.; Guedes, S.; Morales, M.; Alvarez, F.; Pinto, P.R.C.; Siqueira, P.T.D.; Soares, C.J.; Alencar, I.; Curvo, E.A.C.; Hadler, J.C. 2012. Boron thin films and CR-39 detectors in BNCT: a way to measure the $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ reaction rate. *Radiat. Meas.*

Smilgys, B. 2012. Confecção e calibração de filmes finos de boro para a medida da taxa da reação $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ na terapia por captura de nêutrons pelo boro. *Dissertação de Mestrado, IFGW/Unicamp*

Software SRIM 2012 (The Stopping and Range of Ions in Matter) disponível para download em <http://www.srim.org/#SRIM>

Wagner, G.A., Van den Haute, P. 1992. Fission-track dating, Kluwer Acad. Publ.