

Dosimetria e efeitos biológicos de radiação ionizante na linha de micro e nano tomografia (MOGNO) do Sirius

Pesquisador responsável: Murilo Carvalho

Co-orientadores: Débora P. Magalhães, Fernando A. Bacchim Neto, Fernanda N. Moura

Unidade do CNPq: Esse projeto será desenvolvido entre LNBio e LNLS (Sirius)

Abril 2020

1 Introdução

A tomografia computadorizada (CT) é uma técnica de imageamento tridimensional que permite a análise de estruturas internas de um corpo (amostra) de forma não destrutiva. O processo se resume na rotação de uma amostra em frente a um feixe de raios-X, com fluxo e energia suficientes para atravessá-la, enquanto um detector faz a aquisição de uma projeção (radiografia) por ângulo (passo de rotação) pré-definido (Fig. 1). Depois de feita a aquisição das imagens é possível aplicar um algoritmo de reconstrução tomográfica responsável por recuperar o dado tridimensional que será utilizado para realização das análises desejadas [1].

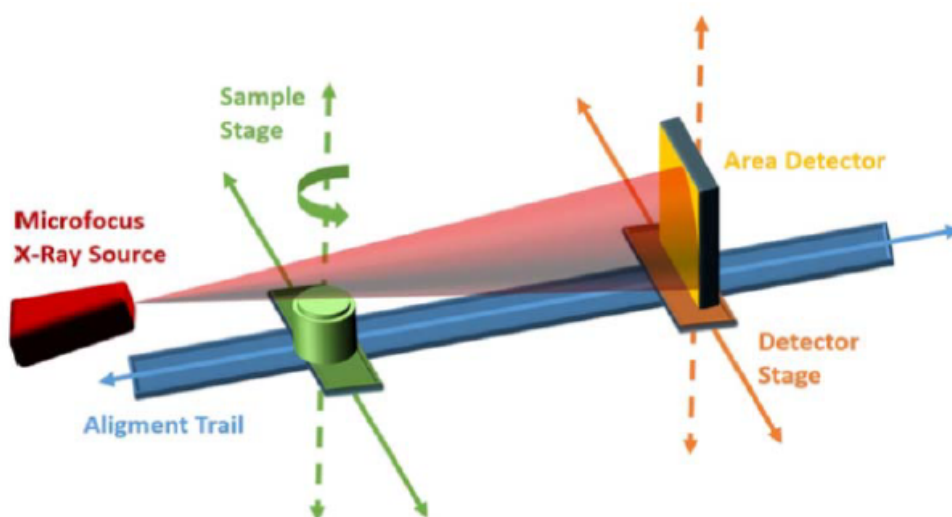


Figura 1: Exemplo dos principais processos presentes em uma tomografia, similar àquela a ser obtida pela linha MOGNO do Sirius, com feixe cônico de raios-X.

O SIRIUS [2], novo acelerador de partículas brasileiro, de 4ª geração, está em fase de comissionamento dos aceleradores e já conta com a instalação e desenvolvimento de, pelo menos, sete estações experimentais, também conhecidas como linhas de luz. As linhas de luz recebem a radiação (luz) gerada pela aceleração de elétrons no anel acelerador. O espectro da radiação é amplo, incluindo infravermelho, luz visível, ultravioleta e raios-X (mole, intermediário e duro). Cada linha, então, filtra os espectros, permitindo a passagem somente das energias desejadas de acordo com a instrumentação e experimentos a serem realizados. A linha de luz dedicada à tomografia de absorção foi batizada de MOGNO (**MicrO and NanO Tomography**), e está sendo desenvolvida para ser uma das mais avançadas linhas de luz de micro e nano tomografia do mundo. O diferencial desta linha será o uso de um feixe cônico de raios-X (ao invés de feixe paralelo, como empregado na linha correspondente do acelerador brasileiro de segunda geração, UVX) e alto fluxo de fótons em espectros praticamente monocromáticos. Isso permite realizar medidas de tomografia com zoom e resolvidas no tempo. No zoom, a configuração

óptica possibilita que uma amostra seja iluminada em uma grande área, com menor resolução e, ao aproximar do ponto focal, uma área menor seja analisada, mas com resolução nanométrica, conforme ilustrado na Fig. 2.

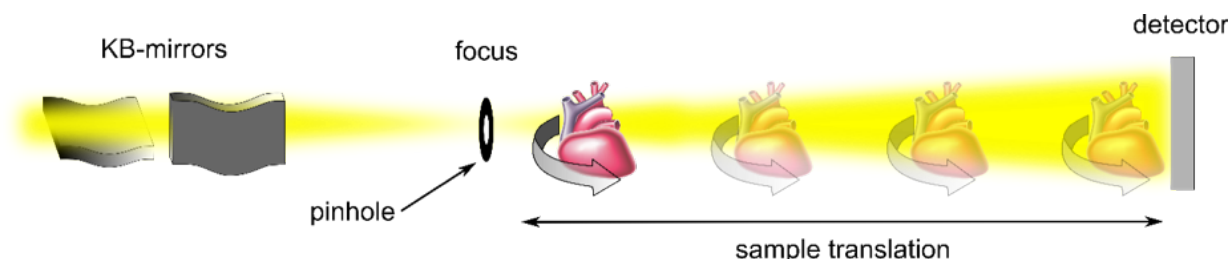


Figura 2: Processo de tomografia em zoom que será utilizado na MOGNO.

O ganho em fluxo de fótons oriundo das características do novo acelerador traz diversas vantagens para os experimentos, como a possibilidade de resolução temporal, ou seja, acompanhar fenômenos acontecendo em tempo real. Na MOGNO, isso permite experimentos de tomografia 4D (resolvida no tempo), onde estima-se que uma tomografia completa poderá ser realizada em 10 segundos. O alto fluxo, porém, também implica em uma maior dose de radiação depositada por esse feixe em todo o processo de sua conformação e até sua detecção. Os elementos óticos da linha precisam ser adaptados para lidar com a alta potência dissipada pelo feixe direto, e o detector precisa acompanhar a alta taxa de aquisição de imagens e também lidar com a alta dose de radiação ionizante incidente. Nesse contexto, é necessário considerar que a amostra estará também exposta a possíveis efeitos de degradação com a dose. No caso das amostras biológicas na MOGNO, esse efeito será reduzido pelas energias relativamente altas de operação (20, 40 e 67.5 keV), o que implica em uma dose depositada menor quando em comparação com energias mais baixas de raios-X. Ainda assim, no contexto da tomografia *in vivo*, uma análise dosimétrica cuidadosa do experimento se torna necessária, bem como uma avaliação dos possíveis efeitos dessa dose no material biológico em questão.

Foram feitas estimativas analíticas preliminares da taxa de dose depositada na amostra para as três energias previstas de operação. Essa informação pode ser observada na Fig. 3, onde a taxa de dose de cada energia (curvas cinza, amarela e azul) varia em função da posição da amostra na linha, desde o ponto focal até o detector, devido à variação da área irradiada pelo feixe cônico (curva verde). Nota-se que posições mais distantes do foco implicam em taxas muito menores de dose, em detrimento da resolução espacial proporcionada pelo experimento (ilustrada pelo tamanho do pixel virtual, curva vermelha).

Em relação aos efeitos biológicos e dosimetria das radiações, é necessário se aprofundar no estudo da interação da radiação com o material biológico e medidores de radiação (por exemplo, os dosímetros).

- **Interação energia-matéria e radiação ionizante:** Quando a radiação tem a capacidade de arrancar elétrons de um átomo, denomina-se radiação ionizante; por exemplo, raios X e gama. Os principais processos de interação da radiação com a matéria variam conforme o número atômico (Z) do material e da energia da radiação incidente, são eles: efeito fotoelétrico, efeito Compton e produção de pares. No efeito fotoelétrico, a energia do fóton incidente é absorvida pelo elétron, que sairá da eletrosfera e deixará uma vacância que será preenchida por elétron de camada mais externa, gerando como resposta raios-X característico do átomo, ou seja, radiação adicional no tecido. Este efeito predomina para elementos de alto Z e baixa energia. No efeito Compton, o fóton ao colidir com o elétron sofre mudança na sua trajetória original e cede parte da energia para o elétron que inicialmente estava em repouso. Já produção de pares está relacionada com fóton de alta energia que irá interagir com o campo coulombiano do núcleo, desaparecendo e cedendo lugar ao par pósitron e elétron [3].
- **Efeitos biológicos:** Amostras biológicas são especialmente sensíveis aos efeitos de radiação ionizante. Essa radiação pode romper pontes de hidrogênio ou remover elétrons de moléculas, prejudicando seu funcionamento. Os efeitos

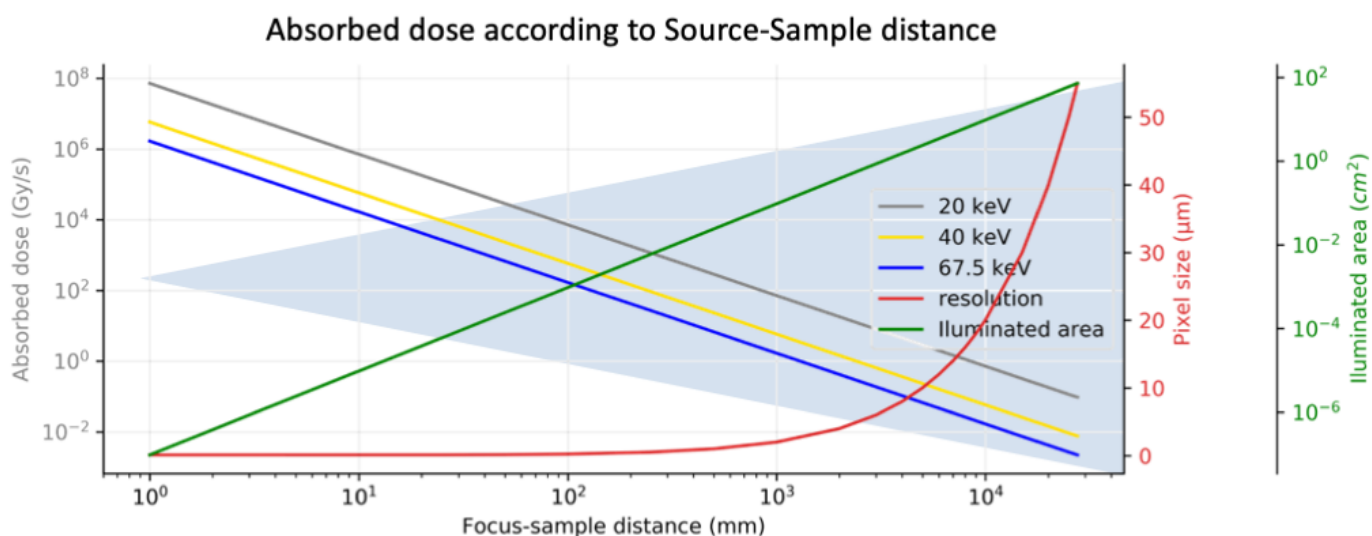


Figura 3: Estimativa preliminar de taxa de dose absorvida na linha MOGNO de acordo com a posição da amostra em relação ao foco. Triângulo azul ilustra perfil do feixe ao longo dos 30m desde a fonte (esquerda) até o detector (direita).

biológicos são originados por dois processos. No processo direto, a energia da radiação é depositada diretamente no DNA, causando quebra imediata desta molécula. Já no processo indireto, o efeito se dá pela ionização de H_2O (molécula mais abundante nos organismos vivos), formando íons H_2O^+ que reagem com H_2O e formam íon hidrônio e radical hidroxila. Esse radical possui um elétron não pareado, sendo altamente reativo, podendo reagir com qualquer molécula biológica (DNA, proteínas, enzimas, etc), levando a mal funcionamento celular. Os radicais livres podem ainda se recombinar e produzir peróxido de hidrogênio, agente oxidante, com o potencial de interagir com as moléculas de DNA resultando em dano biológico. Esses fenômenos são intimamente relacionados à formação de tumores em tecidos [3, 4].

- **Dosimetria luminescente:** A principal via de dosimetria passiva é a luminescente. Este processo se baseia no fato de que quando radiação ionizante incide em um dosímetro luminescente, eleva alguns elétrons da estrutura do cristal para bandas de energia superiores, produzindo pares elétrons-lacunas. O dosímetro possui armadilhas em sua estrutura cristalina a fim de capturar uma quantidade significativa de elétrons e não permitir que eles se recombinem imediatamente com suas lacunas. Ao manter esse armadilhamento estável, uma quantidade de energia proporcional à exposição passa a ser armazenada no material. Para quantificar esta energia, no processo de leitura, o elétron capturado recebe uma energia de excitação (calor no caso da termoluminescência e luz no caso da luminescência opticamente estimulada) para se liberar da armadilha e migrar para a lacuna. Durante este processo, um fóton de luz é emitido. No processo de leitura o número total de fótons produzidos e a energia desses fótons são coletados e é proporcional à radiação incidente no dosímetro [5, 6]. Os dosímetros do tipo TLD possuem de alta sensibilidade e linearidade de resposta em um amplo intervalo de dose. As vantagens do TLD encontram-se na precisão e facilidade de leitura, entretanto, o processo de repetição de leitura de um mesmo detector é impossibilitado. Já o dosímetro OSL é um cristal que possui alta sensibilidade à radiação. Um dos pontos fortes no OSL é a possibilidade de leituras e re-leituras da dose presente no dosímetro sem a perda integral da informação.
- **Dosimetria citogenética:** Dada a importância de se quantificar as doses de radiação entregues nos diferentes sistemas e indivíduos, faz-se necessária a padronização de métodos para fins biológicos capazes de avaliar os efeitos gerados. Um deles é a dosimetria citogenética, que pode ser descrito como um método experimental de avaliação da dose de radiação absorvida por meio da contagem da frequência de aberrações cromossômicas em cultura de linfócitos na amostra de sangue em análise [7]. Os primeiros estudos nesta área surgem a partir de acidentes radiológicos,

onde indivíduos foram expostos à radiação ionizante e almejava-se avaliar quanto de dose teriam recebido a partir da contagem de aberrações cromossômicas presentes na célula [8]. Os valores de dose são estimados a partir dos ensaios realizados com fontes de radiação bem definida e com instrumentos medidores que fornecem a informação de quanto de dose incidu na amostra para gerar os efeitos observados [9].

2 Justificativas

Amostras biológicas são especialmente sensíveis a danos oriundos de radiação ionizante. As medidas experimentais pretendidas na linha MOGNO, eventualmente, irão expor as amostras a altas taxas de dose de radiação. Assim, é crucial o conhecimento preciso do perfil radiométrico da linha e os consequentes efeitos biológicos para amostras viáveis como células e tecidos. Com isso, será possível a realização de pesquisas cujos desenhos experimentais incluam processos que necessitem de viabilidade do material após a exposição aos raios-X.

Dado o potencial da linha MOGNO, também será possível a realização de experimentos que envolvam o cálculo e medição da dose de radiação depositada na região de interesse, seja uma célula ou até em pequenos animais. Estudos quanto aos processos de interação da radiação da matéria e os efeitos biológicos desencadeados, conforme a dose depositada, são de grande interesse nas áreas de pesquisa e saúde, como em radioterapia, medicina nuclear, radiologia e até desenvolvimento de novos fármacos.

O projeto ainda contribui de maneira significativa para a formação acadêmica e profissional do candidato(a) permitindo contato multidisciplinar e desenvolvendo soluções que atendam requisitos técnicos envolvendo as áreas tecnológica, física e biológica.

3 Objetivos

O objetivo geral deste projeto é estudar e traçar o perfil de dose da linha a partir de ensaios práticos com detectores de radiação e avaliar os eventuais efeitos provocados pela dose em material biológico (danos celulares).

Objetivos específicos

- Análise das respostas obtidas por detectores passivos e ativos de radiação na linha;
- Aprendizado na área de simulação pelo método de Monte Carlo (Penélope e Fluka);
- Aprendizado de métodos analíticos de cálculo de dose;
- Experiência com técnicas laboratoriais de análise celular para avaliação dos efeitos biológicos.

4 Métodos

1. *Cálculos de dose*: Os cálculos de dose poderão ser feitos a partir do FLUKA [10], um pacote de simulações de Monte Carlo escrito em Fortran77, que tem como foco ser uma ferramenta de cálculo do transporte de partículas ionizantes de alta energia e traz informações da sua interação com a matéria, tal como a deposição de energia em meios conhecidos, a partir de modelos físicos. A possibilidade de compor geometrias específicas ao caso estudado, e feixes variados, faz do FLUKA uma ferramenta robusta que permita estimar doses de maneira similar à realidade experimental. Outra possível ferramenta para a simulação da interação da radiação com a matéria é o PENELOPE [11], um código feito em Fortran90 e também baseado em simulação Monte Carlo, que simula o transporte e interação de fótons, elétrons e pósitrons em diferentes materiais. A ferramenta possibilita simular interações de energias de 50 eV a 1 GeV, possui um amplo banco de dados de materiais e permite ainda criar materiais compostos e geometrias arbitrárias. Métodos analíticos de cálculo de dose já foram desenvolvidos e poderão ser aprimorados, caso necessário, durante este projeto.

2. *Dosimetria*: Os dosímetros empregados neste trabalho serão do tipo termoluminescente (TLD) e luminescência opticamente estimulada (OSL) fornecidos pela empresa Sapra Landauer®, empresa especializada na área de dosimetria há mais de 30 anos e parceira em projetos no CNPEM. Esses dosímetros já estão disponíveis para o uso. O processo de leitura dos TLD será feito pela Sapra Landauer® e os OSL poderão ser lidos tanto pela mesma empresa citada quanto em equipamento próprio (microStar® [12]). Outros tipos de detectores estão disponíveis e também poderão ser utilizados para medições adicionais e comparações, de acordo com a necessidade.
3. *Cultura de células*: Poderão ser utilizadas células de linhagens existentes no LNBio que estejam disponíveis no momento dos experimentos (e.g. linhagem Vero, HeLa, NIH-3T3, HEK, etc.). Elas serão mantidas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, USA), composto por 4mM de L-glutamina, 4500mg/L de glicose, 1500mg/L de bicarbonato de sódio, sem piruvato de sódio. Adicionamos 1% penicilina/estreptomicina (50U/mL penicilina e 50g/mL estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco), compondo o meio de cultura completo. As culturas ocorrerão em garrafas de cultura (Corning® 75 cm² Flask Cell Culture), em estufa 37°C e 5% CO₂. Subculturas serão feitas ao atingir 70% de confluência.
4. *Ética e obtenção de tecidos*: Todos os eventuais procedimentos de manutenção e manipulação dos animais para obtenção de explantes serão previamente submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) do CNPEM e realizados de acordo com suas condições de aprovação. Os camundongos serão produzidos e mantidos no Biotério de Camundongos do LNBio/CNPEM. Os tecidos explantados serão obtidos por procedimento cirúrgico após sacrifício do animal em câmara saturada de CO₂ e mantidos em meio de cultura similar ao método descrito para células.
5. *Execução dos testes de irradiação*: Os dosímetros serão expostos ao feixe direto da linha de luz na mesma condição de exposição das amostras biológicas, de forma a quantificar a dose depositada no experimento. Essa medida de dose será posteriormente correlacionada com os efeitos observados nas amostras biológicas irradiadas. Esses efeitos serão observados através de testes como:
 - Gel de agarose: extração de DNA genômico para verificação geral da integridade do DNA. É esperada degradação dependente da dose.
 - Marcação nuclear: histologia com coloração HE ou, eventualmente, DAPI, pode-se avaliar eventos de início de apoptose como picnose (condensação do núcleo), cariorrexe (fragmentação do material genético) ou cariólise (quebra do núcleo).
 - Ensaio de MTT: teste colorimétrico para medir atividade metabólica das células.
6. *Elaboração do relatório*: análise final dos dados e detalhamento das atividades desenvolvidas, resultados obtidos e respectivas discussões e conclusões. Apresentação do trabalho no Congresso de Estudantes do CNPEM + PIBIC.

5 Cronograma de Atividades

O cronograma de atividades é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Cronograma de execução das atividades

ATIVIDADES	SEMESTRE 1						SEMESTRE 2					
	TRI 1			TRI 2			TRI 3			TRI 4		
	1M	2M	3M	1M	2M	3M	1M	2M	3M	1M	2M	3M
1. Cálculo de doses												
2. Dosimetria												
3. Cultura de células												
4. Ética e tecidos												
5. Execução de testes												
6. Elaboração do relatório												

Referências

- [1] E. L. Ritman. Current status of developments and applications of micro-ct. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 13(1):531–552, 2011.
- [2] Projeto Sirius. <http://www.lnls.cnpem.br/sirius/projeto-sirius/>. Acesso em 20/04/2018.
- [3] Luiz TAUHATA et al. Radioproteção e dosimetria: fundamentos. 10. rev. *Rio de Janeiro: IRD/CNEN*, 2014.
- [4] Biological Effects of Radiation. <https://opentextbc.ca/chemistry/chapter/21-6-biological-effects-of-radiation/>. Acesso em 24/04/2020.
- [5] Ervin B Podgorsak et al. Radiation oncology physics. *Vienna: International Atomic Energy Agency*, pages 123–271, 2005.
- [6] Glenn F Knoll. *Radiation detection and measurement*. John Wiley & Sons, 2010.
- [7] D Beninson, DC Lloyd, AT Natarajan, G Obe, RJ Preston, and MS Sasaki. Biological dosimetry: Chromosomal aberration analysis for dose assessment. *Technical Reports Series*, (260), 1986.
- [8] Michelle Ricoul, Tamizh Gnana-Sekaran, Laure Piqueret-Stephan, and Laure Sabatier. Cytogenetics for biological dosimetry. In *Cancer Cytogenetics*, pages 189–208. Springer, 2017.
- [9] IAEA. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. *TECHNICAL REPORT SERIES-INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY*, 2001.
- [10] TT Böhlen, F Cerutti, MPW Chin, Alberto Fassò, Alfredo Ferrari, PG Ortega, Andrea Mairani, Paola R Sala, G Smirnov, and V Vlachoudis. The fluka code: developments and challenges for high energy and medical applications. *Nuclear data sheets*, 120:211–214, 2014.
- [11] F. Salvat. *PENELOPE-2014: A Code System for Monte Carlo Simulation of Electron and Photon Transport*. Barcelona, Spain, 2015.
- [12] microSTAR®: the mobile radiation dosimeter reader. <https://www.landauer.eu/produit/carry-out-your-own-dosimetry-program-with-the-mobile-radiation-dosimeter-reader-by-landauer-microstar/>. Acesso em 20/04/2020.