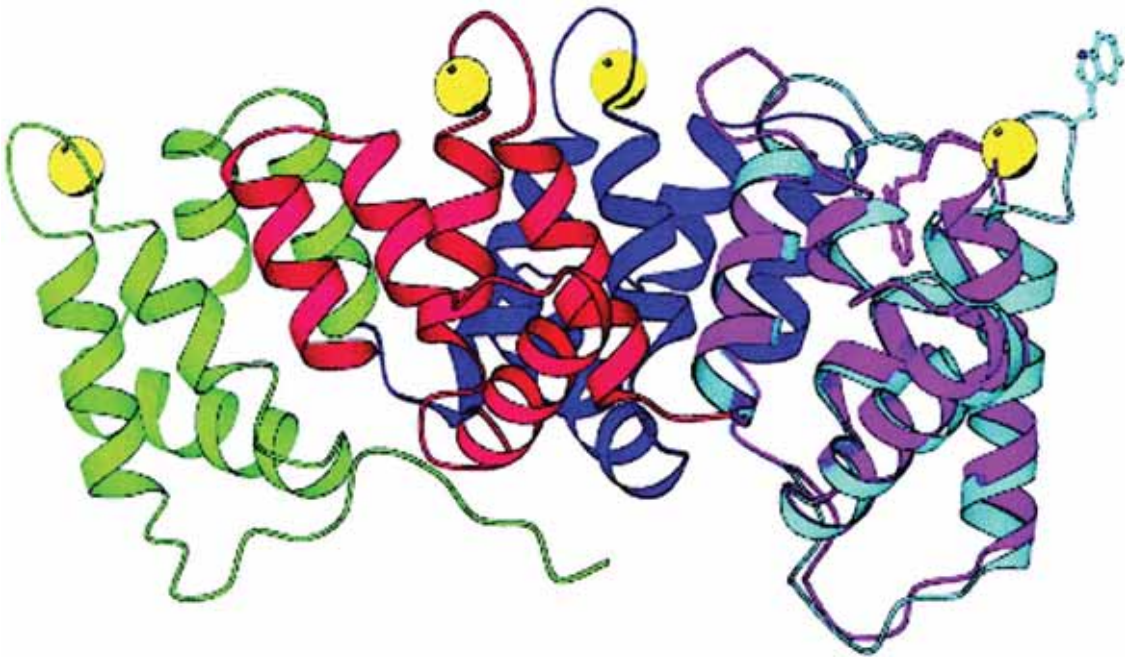


Bruno de Oliveira Cabalcanti

Indução de Morte Celular por Apoptose Decorrente da

Irradiação com Raios X”

Um Ensaio com Células Mamárias Humanas Tumerais”



Trabalho de Conclusão de Curso

Botucatu

2010

Bruno de Oliveira Cavalcanti

**“Indução de Morte Celular por Apoptose Decorrente da Irradiação
com Raios-X”**

Um Ensaio com Células Mamárias Humanas Tumerais

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências
de Botucatu, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, Para a Obtenção do
Título de Bacharel em Física Médica.**

Orientador: Professor Doutor Carlos Eduardo de Almeida

Botucatu

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Cavalcanti, Bruno de Oliveira.

Indução de morte celular por apoptose decorrente da irradiação com Raios-X: um ensaio com células mamárias humanas tumorais / Bruno de Oliveira Cavalcante. – Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado – Física médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2010

Orientador: Carlos Eduardo de Almeida

Assunto CAPES: 20000006

1. Física médica. 2. Apoptose. 3. Citometria de fluxo.

Palavras-chave: Anexina V; Apoptose; Citometria de fluxo; Iodeto de propídeo; Radiações de baixo LET; Raios-X; Software WinMDI.

Agradecimento

Em primeiro lugar a toda minha família, sem os quais a vida não seria possível!

À professora Doutora Cláudia Pellizon, agradeço a ajuda nas correções feitas na parte textual deste trabalho, sem a qual este trabalho jamais ficaria pronto.

Ao professor Doutor Paulo Mancera, agradeço pela disponibilização dos meios tecnológicos pelos quais foi possível completar este trabalho.

Ao professor Doutor Carlos Eduardo de Almeida, agradeço por ter me concedido uma oportunidade de estágio.

A todo pessoal do LCR-UERJ, pelos meses de agradabilíssima convivência.

Agradeço a toda rapaziada do bloco 8 da moradia estudantil da UNESP Botucatu, pois durante quase 1 ano, eles foram a minha segunda família.

Ao Departamento de Bioestatística pela grande receptividade e calor humano.

Muito Obrigado a todos vocês!

Resumo

Apoptose é uma forma de morte celular programada que remove seletivamente células alteradas, e assim contribui para a manutenção do equilíbrio da dinâmica da reprodução celular. Portanto a verificação da ocorrência da morte celular por apoptose após um dado estímulo patológico é de crucial importância para a análise da manutenção do ciclo celular normal de um dado tecido ou órgão. Neste experimento foram utilizadas as linhagens de células mamárias humanas tumorais, MCF7, T47, MDAMB231, que foram irradiadas com raios-X a uma dose de 5 Gy em um intervalo de tempo de 15 segundos, e filtração de 1 mm de alumínio. As amostras com as células foram cultivadas num meio de cultura específico que continha soro fetal bovino e fator de crescimento, e foram preparadas duas amostras com cada uma das linhagens de células, uma para ser irradiada, e outra, que não foi irradiada, que se denotou por controle negativo da irradiação. O objetivo fundamental do experimento foi o de verificar e comparar os índices de apoptose em cada uma das linhagens de células, nas que foram irradiadas e nas que não foram irradiadas, utilizando a citometria de fluxo como método de detecção da morte celular por apoptose, em conjunto com os marcadores específicos anexina V e iodeto de propídeo. Os dados das leituras feitas pela citometria de fluxo foram analisados e interpretados através da utilização do software gráfico-estatístico WinMDI. Através da comparação dos índices relativos às leituras de positivo e negativo para os marcadores específicos de apoptose, com base nas diferenças apresentadas nos dados estatísticos das leituras referentes às células irradiadas e não irradiadas, conclui-se que as células em questão uma vez submetidas à irradiação com raios-X podem sofrer apoptose, o que ratifica o resultado esperado, que para células

irradiadas com radiações de baixo LET um dos resultados esperados é a morte celular por apoptose.

Palavras chave: Apoptose; Radiações de baixo LET; Anexina V; Iodeto de propídeo; Citometria de fluxo; Raios-X; Software WinMDI.

Abstract

Apoptosis is a form of programmed cell death selectively removes abnormal cells, and thus contributes to maintaining the balance of the dynamics of cell reproduction. Therefore the verification of the occurrence of apoptotic cell death after a pathological stimulus is crucial for the analysis of the maintenance of normal cell cycle of a given tissue or organ. In this experiment were used cells lines human mammary tumor MDAMB231, T47, MCF7, which were irradiated with X-rays at a dose of 5 Gy in a time interval of 15 seconds, and filtration of 1mm aluminum. Samples containing the cells were grown in a specific culture medium, containing fetal bovine serum and growth factor, and two samples were prepared with each of the cell lines, one to be irradiated, and another that has not been irradiated, which denoted by negative control of the irradiation. The primary goal of the experiment was to verify and compare the rates of apoptosis in each cell lines, in which were irradiated and that were not irradiated, using flow cytometry as a method for detecting apoptotic cell death in together with specific markers annexin V and propidium iodide. Data from the readings made by flow cytometry were analyzed and interpreted using the software WinMDI statistical graph. By comparing the indices relating to the readings of positive and negative for specific markers of apoptosis, based on differences in the statistical data presented lectures regarding the cellular irradiated and not irradiated, collude cells in question once

subjected to irradiation X-ray, may undergo apoptosis, which confirms the expected result that for cells irradiated with low LET radiation of the expected results in cell death by apoptosis.

Keywords: Apoptosis; Low LET radiation; Annexin V: Propidium iodide; Flow cytometry; X-rays; WinMDI software.

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Siglas

Resumo

Abstract

1- Introdução	11
2 – Objetivo	13
3 – Material e Método	13
3.1 – Delineamento Experimental	13
3.2 – Procedimento de Irradiação	13
3.3 – Preparação das Células para a Leitura	15
4 – Resultados	18
4.1 – Grupo Celular MDAMB231	18
4.2 – Grupo Celular T47	22
4.3 – Grupo Celular MCF7	25
5 – Discussão	29
6 – Conclusão	33

7 – Referências Bibliográficas	34
--------------------------------	----

Lista de Figuras

Figura 1: Fotografia da máquina de raios-X do <i>LCR IBRAG UERJ</i> .	14
Figura 2: Estrutura tridimensional da molécula de A5 humana.	17
Figura de Leitura A: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MDAMB231 não irradiadas e sem marcação.	18
Figura de Leitura B: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MDAMB231 irradiadas e sem marcação.	18
Figura de Leitura C: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MDAMB231 não irradiadas e marcadas com A5 ligante.	19
Figura de Leitura D: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MDAMB2331 irradiadas e marcadas com A5 ligante.	19
Figura de Leitura E: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MDAMB231 não irradiadas e marcadas com iodeto de propídeo.	20
Figura de Leitura F: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MDAMB231 irradiadas e marcadas com iodeto de propídeo.	20
Figura de Leitura G: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MDAMB231 não irradiadas e com dupla marcação, A5 + iodeto de propídeo.	21

Figura de Leitura H: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MDAMB231 irradiadas e com dupla marcação, A5+ iodeto de propídeo. **21**

Figura de Leitura I: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células T47 não irradiadas e sem marcação. **22**

Figura de Leitura J: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células T47 irradiadas e sem marcação. **22**

Figura de Leitura K: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células T47 não irradiadas e marcadas com A5 ligante. **23**

Figura de Leitura L: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células T47 irradiadas e marcadas com A5 ligante. **23**

Figura de Leitura M: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células T47 não irradiadas e marcadas com iodeto de propídeo. **23**

Figura de Leitura N: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células T47 irradiadas e marcadas com iodeto de propídeo. **23**

Figura de Leitura O: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células T47 não irradiadas e com dupla marcação, A5 + iodeto de propídeo. **24**

Figura de Leitura P: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células T47 irradiadas e com dupla marcação, A5 + iodeto de propídeo. **24**

Figura de Leitura Q: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MCF7 não irradiadas e sem marcação. **25**

Figura de Leitura R: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MCF7 irradiadas e sem marcação.	25
Figura de Leitura S: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MCF7 não irradiadas e marcadas com A5 ligante.	26
Figura de Leitura T: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MCF7 irradiadas e marcadas com A5 ligante.	26
Figura de Leitura U: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MCF7 não irradiadas e marcadas com iodeto de propídeo.	27
Figura de Leitura V: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MCF7 irradiadas e marcadas com iodeto de propídeo.	27
Figura de Leitura X: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MCF7 não irradiadas e com dupla marcação, A5 + iodeto de propídeo.	28
Figura de Leitura Y: Gráfico gerado pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MCF7 irradiadas e com dupla marcação, A5 + iodeto de propídeo.	28

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados da irradiação.	14
Tabela 2: Condições de incubação das células.	15
Tabela 3: Dados da primeira centrifugação.	15
Tabela 4: Dados da segunda centrifugação.	16

Tabela 5: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura A.	19
Tabela 6: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura B.	19
Tabela 7: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura C.	19
Tabela 8: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDi, correspondente a figura de leitura D.	19
Tabela 9: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura E.	20
Tabela 10: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura F.	20
Tabela 11: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura G.	21
Tabela 12: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura H.	21
Tabela 13: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura I.	22
Tabela 14: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura J.	22
Tabela 15: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDi, correspondente a figura de leitura K.	23
Tabela 16: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura L.	23

Tabela 17: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDi, correspondente a figura de leitura M.	24
Tabela 18: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura N.	24
Tabela 19: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura O.	24
Tabela 20: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura P.	25
Tabela 21: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura Q.	26
Tabela 22: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura R.	26
Tabela 23: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura S.	26
Tabela 24: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura T.	26
Tabela 25: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura U.	27
Tabela 26: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura V.	27
Tabela 27: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura X.	28
Tabela 28: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura Y.	28

Siglas

LCR = Laboratório de Ciências Radiológicas.

IBRAG = Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

UERJ = Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

A5 = Molécula de Anexina 5.

PS = Molécula de Fosfatidilserina.

FITC = Isotiocianato de Fluoresceína

PBS = Solução Base Padrão.

Gy = Unidade de energia padrão para dose absorvida, Grays, 1 Gray = 1 Joule/Kilograma.

LL = *Low Left*, ou baixo à esquerda, indica o quadrante inferior esquerdo nas figuras de leitura por citometria de fluxo fornecida pelo software WinMDI. As células que se encontram nesta região apresentam leituras negativas para ambos os marcadores, o que significa que são células que não entraram em apoptose.

LR = *Low Right*, ou baixo à direita, indica o quadrante inferior direito nas figuras de leitura por citometria de fluxo. As células que aí se encontram apresentam indicação de positivo para o marcador A5 ligante e negativo para o iodeto de propídeo, o que significa que as células que estão nesta região estão nos estágios iniciais de apoptose.

UL = *Up Left*, ou acima à esquerda, indica o quadrante superior esquerdo nas figuras de leitura por citometria de fluxo. As células que aí estão apresentam indicação de positivo para o marcador iodeto de propídeo e negativo para o marcador A5 ligante, o

que evidencia células em estados mais avançados de apoptose, onde a integridade da membrana plasmática já está comprometida.

UR = *Up Right*, ou acima à direita, indica o quadrante superior direito das figuras de leitura por citometria de fluxo. As células que aí estão apresentam indicação de positivo para ambos os marcadores, o que significa que as células pertencentes a esse quadrante podem estar em estágios avançados de apoptose, ou até mesmo necrose.

% Gated = Nas tabelas referentes às figuras de leitura por citometria de fluxo indica a porcentagem de células inscritas nos polígonos das figuras de leitura, em relação ao total de células de toda a figura. Nas tabelas aparece fornecendo a porcentagem de células que estão inscritas nos polígonos das figuras para cada quadrante.

% do total = Nas tabelas de leitura indicam a porcentagem de células pertencentes a cada quadrante, em relação ao número total de células de toda a figura.

Eventos = Nas tabelas de leitura indicam com precisão o número de células pertencentes a cada quadrante das figuras de leitura, daí o cálculo de % do total e de % Gated é direto, pois o número total de células para toda a figura é de 10^4 .

X-Mean = Quantidade de pontos em abscissa inscritos nos polígonos das figuras de leitura. Nas tabelas X-mean é apresentado para cada quadrante específico que integra a figura de leitura.

Y-Mean = Quantidade de pontos em ordenada inscritos nos polígonos das figuras de leitura. Nas tabelas Y-mean é apresentado para cada quadrante específico que integra a figura de leitura.

1 – Introdução

Apoptose é uma modalidade de morte celular que é acompanhada por alterações específicas na membrana plasmática que promovem o reconhecimento e a imersão destas células pelos fagócitos. O processo de apoptose pode ser dividido em duas fases: A primeira é a ativação celular, na qual ocorre toda a sinalização para sua autodestruição, e a segunda fase, denominada execução, a qual ocorre quando a autodestruição é total ⁽¹⁾. A morte celular por apoptose é um processo caracterizado pelo encolhimento generalizado do volume celular e do seu núcleo, perda da adesão das células vizinhas, formação de bolhas na superfície celular, fragmentação da cromatina em pequenos pedaços e rápido englobamento das células apoptóticas pelos fagócitos ⁽¹⁾. As células apoptóticas são reconhecidas pelos fagócitos, pois são portadoras de sinalização que indica aos fagócitos que elas não são células saudáveis ⁽¹⁾. O sinal mais bem estudado é a presença de moléculas de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática de células em fases iniciais de apoptose, em células normais as moléculas de fosfatidilserina são restritas ao folheto interno da membrana plasmática ⁽¹⁾. Em indivíduos adultos a apoptose conduz à morte células que não são mais necessárias, ou células que possuem danos genéticos irreparáveis, e que possuem potencial para progredir em células cancerosas ⁽¹⁾. O processo de morte celular por apoptose é uma das maiores armas do organismo contra o desenvolvimento do câncer, e células que perdem a capacidade de entrar em apoptose possuem maiores probabilidades de se tornar cancerosas ⁽¹⁾. A morte celular por apoptose pode ocorrer em processos fisiológicos, como o envelhecimento, metamorfose, e em algumas fases embrionárias, ou também como resposta a estímulos patológicos brandos, como

por exemplo, hipóxia, agentes oxidantes, metais pesados, drogas indutoras de apoptose, álcoois, infecções víricas, jejum, choque térmico, e também em resposta a irradiação de células com radiações com baixo coeficiente de transferência linear de energia (LET), como por exemplo, fótons de raios-X e de raios- γ ⁽²⁾. Exerce papel fundamental na cessação do crescimento celular, e impede a proliferação de células defeituosas devido à interrupção de seu ciclo celular, pois a célula defeituosa morre antes que possa se dividir, ou seja, a célula defeituosa perde a capacidade reprodutiva. Com base no conhecimento das alterações que ocorrem na membrana plasmática durante a morte celular por apoptose, como a redistribuição da fosfatidilserina do interior para o exterior da membrana, esta molécula é um dos marcadores amplamente usados para o reconhecimento de células apoptóticas em mamíferos ⁽³⁾. A utilização da fosfatidilserina como gatilho para o reconhecimento de células apoptóticas é um método amplamente usado para avaliar a sensibilidade e a probabilidade específica da morte celular por apoptose, através do uso da fosfatidilserina na forma de fosfatidilserina – anexina V ligante ⁽³⁾. No experimento foi utilizado anexina V ligante para a detecção das células nas fases iniciais de apoptose e o marcador iodeto de propídeo para a detecção das células em fases tardias de apoptose. Os ensaios com a anexina V ligante estabelecem uma maneira muito específica rápida e fidedigna de detecção de células apoptóticas por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência ⁽³⁾. Esta técnica elimina as dificuldades encontradas ao acesso a identificação de células em apoptose baseadas em critérios morfológicos ⁽³⁾. Neste experimento utilizou-se a citometria de fluxo, e os dados das leituras foram analisados e interpretados através do Software WinMDI. O software WinMDI é um programa gráfico estatístico muito utilizado em

análises de leituras de contagem de células por citometria de fluxo. No experimento foi utilizado o WinMDI versão 2.9 – Windows 3.95/DOS 5.0.

2 – Objetivo

O objetivo fundamental do experimento foi o de comparar e verificar os índices de apoptose, no grupo celular que foi irradiado, e no que não foi irradiado, utilizando a citometria de fluxo como técnica de detecção de apoptose.

3 – Material e método

3.1 – Delineamento Experimental

O experimento utilizou as seguintes linhagens de células mamárias humanas tumorais:

1 – MCF7;

2 – T47;

3 – MDAMB231;

Cada grupo de célula tumoral foi cultivado num meio de cultura específico contendo soro fetal bovino e fator de crescimento, e para cada tipo celular foram preparadas duas amostras para o uso no experimento, uma foi irradiada, e outra que não foi irradiada.

3.2 – Procedimento de Irradiação

Cada linhagem de célula teve uma amostra irradiada, e outra que foi o controle negativo da irradiação. O procedimento consistiu na substituição do meio de cultura pelo PBS antes da irradiação, tanto nas três linhagens de células que foram irradiadas quanto nas três linhagens de células que foram o controle negativo da

irradiação. A irradiação foi feita na máquina de raios-X do *LCR IBRAG UERJ*, com uma dose de 5 Gy em 15 segundos, e os dados específicos da irradiação foram:

Energia	30KV
Corrente no tubo	50mA
Filtro	0.1mm de alumínio
Dose	10Gy
Tempo	30segundos

Tabela 1: Dados da irradiação.



Figura 1: Fotografia da máquina de raios-X do *LCR IBRAG UERJ*, onde as células foram irradiadas.

O controle negativo da irradiação acompanhou todo o processo feito antes da irradiação, só não foi irradiado. Após a irradiação o PBS foi descartado, e as células, tanto as que foram irradiadas quanto as que foram os controles negativos da irradiação,

foram imersas e diluídas em um novo meio de cultura, e encaminhadas para a estufa, para serem incubadas, com as condições de incubação que seguem na tabela:

Temperatura	37 graus Celsius
Porcentagem de dióxido de carbono	5%
Tempo	4 horas

Tabela 2: Condições de incubação das células.

O intervalo de tempo de 4 horas é o tempo necessário para que ocorra a apoptose nas células.

3.3 – Preparação das Células para a Leitura

Após a incubação, as células foram imersas na capela de fluxo, ambiente esterilizado por luz ultravioleta, onde o meio de cultura foi retirado e armazenado em tubos falcon, e na ausência de meio de cultura, as células foram tripsinizadas com um volume de 1 ml de tripsina para soltar as células do fundo da garrafa, por um período de tempo de 15 minutos. Depois que as células soltaram do fundo da garrafa, passou pelo processo de ressuspensão, nova diluição das células, no meio de cultura, para serem centrifugadas. Os dados da primeira centrifugação:

Rotações por Minuto	1100
Tempo	10 minutos

Tabela 3: Dados da primeira centrifugação.

O objetivo do processo de centrifugação é o de separar as células do meio em que elas estão diluídas.

Após a primeira centrifugação o meio de cultura foi retirado e descartado, e somente as células foram mantidas para serem ressuspendidas, diluídas, em uma solução de 400µl de PBS e íons cálcio. Essa nova solução, células+PBS+íons cálcio passaram por um novo processo de centrifugação. Dados da segunda centrifugação:

Rotações por minuto	2550
tempo	5 minutos

Tabela 4: Dados da segunda centrifugação.

Depois da segunda centrifugação, ocorrerá a separação da solução célula +PBS+íons cálcio, e o solvente serão descartados, e as células receberão uma nova diluição, desta vez com o tampão de ligação, para possibilitar a leitura pela citometria de fluxo. O tampão específico de ligação tem por finalidade auxiliar a ligação da anexina V com a fosfatidilserina e do iodeto de propídeo com o material do núcleo celular, portanto o tampão funciona como catalisador das reações entre os marcadores específicos de apoptose.

A anexina V, também conhecida como A5, faz parte da família das anexinas, que são proteínas que se ligam com muita afinidade a fosfolípidos carregados negativamente ^(3,4). A A5 liga-se com muita afinidade à fosfatidilserina, ou PS, que é um macro – molécula existente no interior da membrana plasmática, que é rapidamente excluída da célula pela membrana plasmática em resposta ao acréscimo da concentração intracelular de íons de cálcio bivalentes, e também em resposta à injúria celular, ou estímulos indutores de apoptose ⁽³⁾, e por sua vez a exclusão da

fosfatidilserina, ou PS, é um evento que ocorre no início do processo de apoptose, e ocorre antes que ocorra qualquer comprometimento à integridade da membrana plasmática ⁽³⁾. A PS serve como um gatilho para o reconhecimento de células apoptóticas pelos macrófagos e lipossomos que contém este fosfolípido e inibe o englobamento das células apoptóticas pelos fagócitos ⁽³⁾, então a exclusão da PS é um evento que evidencia as células em apoptose, contudo impedindo a ruptura da membrana, e a soltura do conteúdo citoplasmático, além do dano celular ⁽³⁾.

O uso da A5 ligante neste tipo de experimento providencia uma maneira rápida e muito eficaz de detectar células no início do processo de apoptose, tanto por citometria de fluxo quanto por microscopia de fluorescência ⁽³⁾. No experimento a A5 foi trabalhada junta com o isotiocianato de fluoresceína, FITC, com a finalidade do aproveitamento de sua fluorescência.

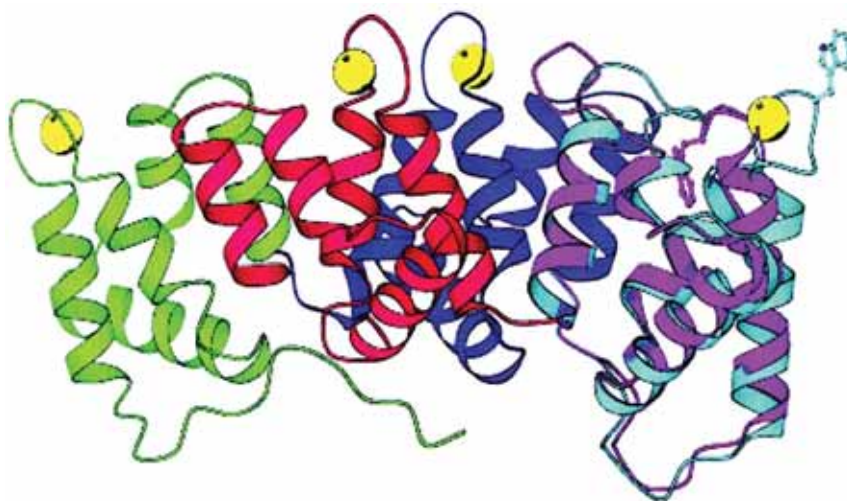


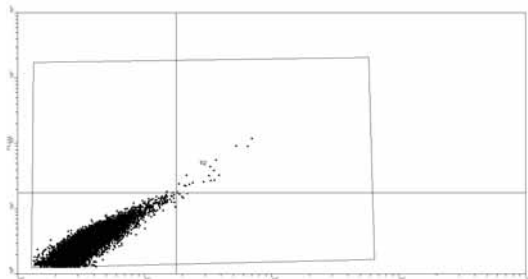
Figura 2: Estrutura tridimensional da molécula de A5 humana ⁽⁴⁾.

Para a detecção de células em fases posteriores de apoptose, o marcador utilizado foi o iodeto de propídeo.

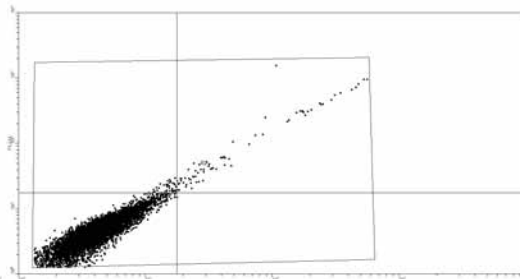
4 – Resultados

As células que estão em fase inicial do processo de apoptose estão localizadas no quadrante inferior direito das figuras de leitura, como uma indicação de único positivo para as células marcadas com a anexina V ligante ⁽³⁾, desde que neste estágio a membrana celular ainda esteja intacta e o iodeto de propídeo não possa penetrar na célula ⁽³⁾. Para as células em fases posteriores de apoptose, o iodeto de propídeo entra na célula, o que resulta numa população de duplo positivo ⁽³⁾. As células em necrose também serão duplo positivo, tanto para anexina V quanto para o iodeto de propídeo ⁽³⁾, de maneira sucinta, o quadrante inferior esquerdo, *low left*, ou LL na sigla do software WinMDI, e inferior direito, *low right*, ou LR na sigla do WinMDI, indicam respectivamente negativo e positivo para o marcador anexina V ligante, enquanto que o quadrante inferior esquerdo e superior esquerdo, *low left*, e *up left*, ou LL e UL na sigla do WinMDI, indicam respectivamente negativo e positivo para o marcador iodeto de propídeo, e o quadrante superior direito, *up right*, ou UR na sigla do software WinMDI, é o que indica duplo positivo. Os dados das leituras foram os seguintes:

4.1 - Grupo celular MDAMB231

A

5

B

6

Quadrante	X-Mean	Y-Mean	Eventos	% do total	%Gated	Quadrante	X-Mean	Y-Mean	Eventos	% do total	%Gated
1 UL	15.8	18.1	4	0.04	0.05	1 UL	15.8	18.1	4	0.04	0.05
2 UR	30.1	34.8	19	0.19	0.24	2 UR	30.1	34.8	19	0.19	0.24
3 LL	3.7	3.2	7976	79.76	99.66	3 LL	3.7	3.2	7976	79.76	99.66
4 LR	20.0	16.3	4	0.04	0.05	4 LR	20.0	16.3	4	0.04	0.05

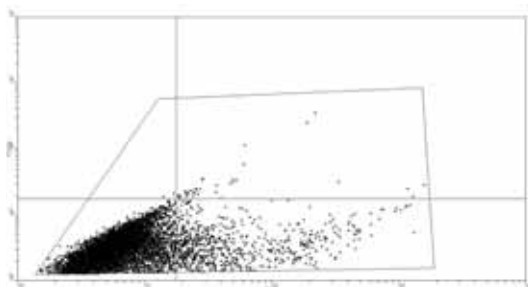
Figura de Leitura A: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MDAMB231 não irradiadas e sem marcação.

Figura de Leitura B: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MDAMB231 irradiadas e sem marcação.

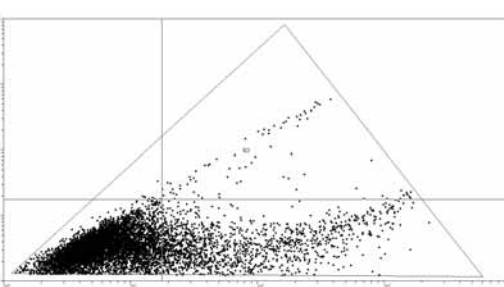
Tabela 5: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura A.

Tabela 6: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura B.

C



D



7

Quadrante	X-mean	Y-mean	Eventos	% do total	%Gated
1 UL	15.4	20.4	2	0.02	0.03
2 UR	47.6	29.7	32	0.32	0.41
3 LL	6.0	3.2	7107	71.07	90.50
4 LR	47.6	3.5	712	7.12	9.07

8

Quadrante	X-Mean	Y-Mean	Eventos	% do total	%Gated
1 UL	14.5	20.4	8	0.08	0.10
2 UR	132.2	65.6	82	0.82	1.02
3 LL	5.9	3.2	6497	64.97	80.59
4 LR	66.9	3.6	1475	14.75	18.30

Figura de Leitura C: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MDAMB231 não irradiadas e marcadas com A5 ligante.

Figura de Leitura D: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MDAMB231 irradiadas e marcadas com A5 ligante.

Tabela 7: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura C.

Tabela 8: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura D.

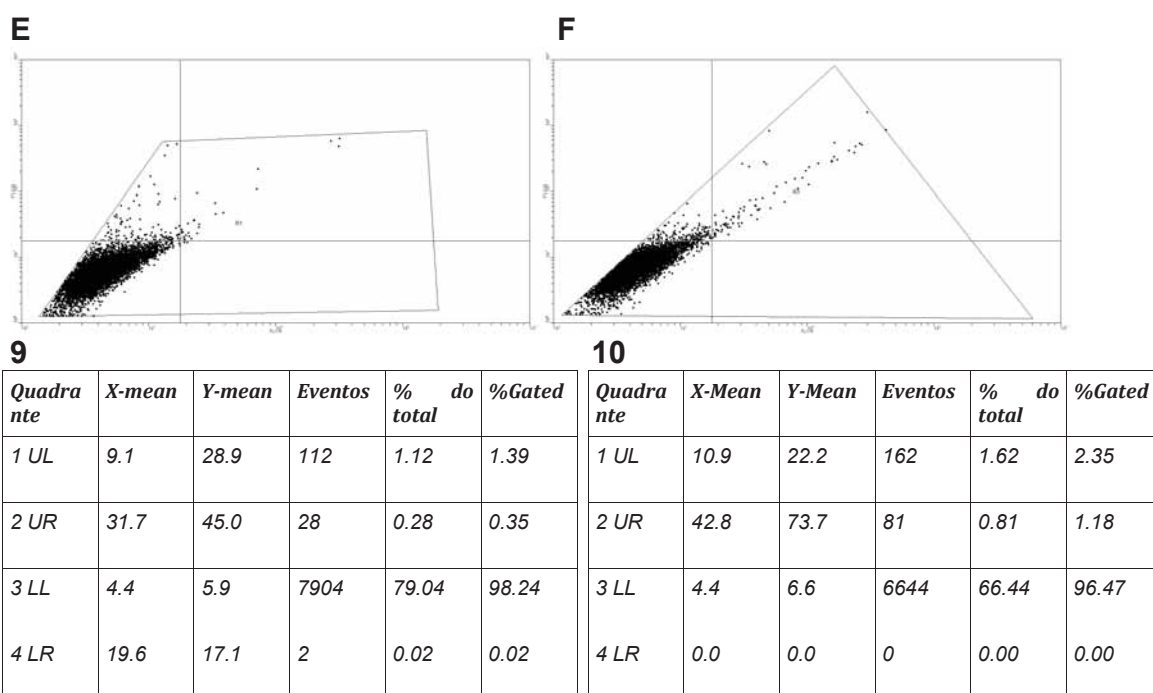
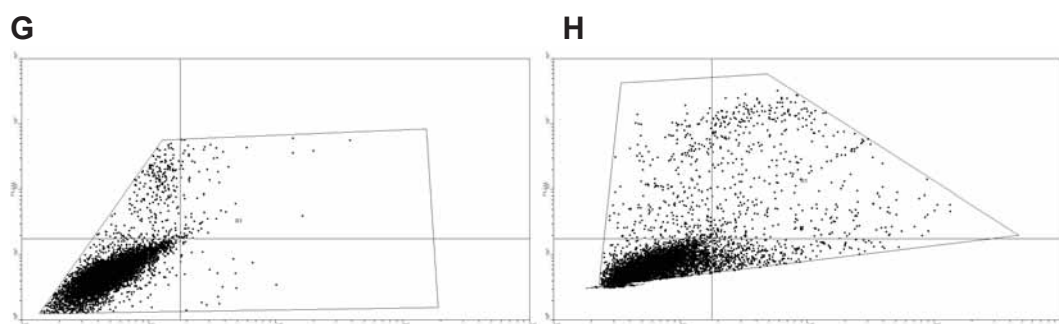


Figura de Leitura E: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MDAMB231 não irradiadas e marcadas com iodeto de propídeo.

Figura de Leitura F: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MDAMB231 irradiadas e marcadas com iodeto de propídeo.

Tabela 9: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura E.

Tabela 10: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura F.



11

Quadra nte	X-Mean	Y-Mean	Eventos	% do total	%Gated
1 UL	11.0	76.9	265	2.65	3.09
2 UR	27.4	86.2	76	0.76	0.89
3 LL	4.9	5.0	8211	82.11	95.77
4 LR	29.7	5.4	22	0.22	0.26

12

Quadra nte	X-Mean	Y-Mean	Eventos	% do total	%Gated
1 UL	9.2	87.3	298	2.98	4.42
2 UR	61.1	208.2	451	4.51	6.69
3 LL	6.0	6.8	5595	55.95	82.97
4 LR	35.5	9.8	399	3.99	5.92

Figura de Leitura G: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MDAMB231 não irradiadas e com dupla marcação, A5 ligante + iodeto de propídeo.

Figura de Leitura H: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MDAMB231 irradiadas e com dupla marcação, A5 ligante + iodeto de propídeo.

Tabela 11: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura G.

Tabela 12: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura H.

4.2 - Grupo Celular T47:

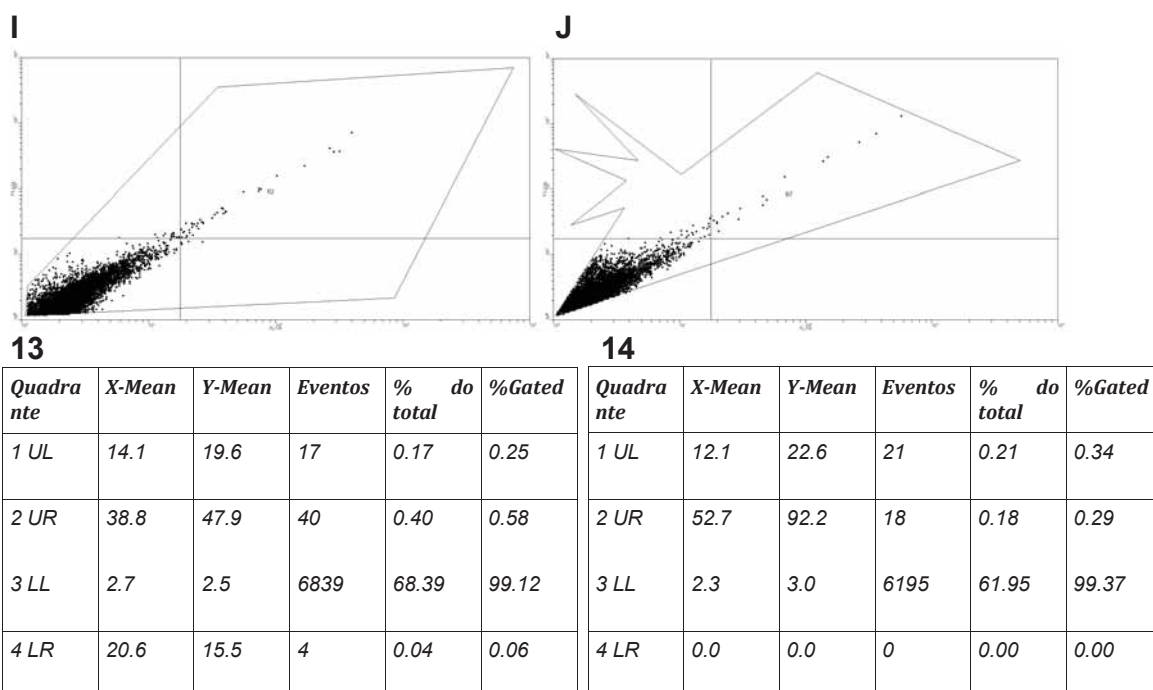
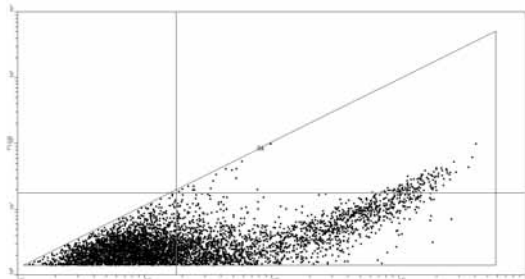
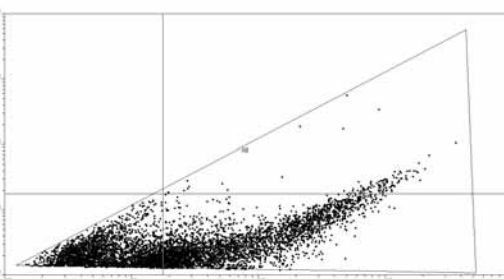


Figura de Leitura I: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células T47 não irradiadas e sem marcação.

Figura de Leitura J: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células T47 irradiadas e sem marcação.

Tabela 13: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura I.

Tabela 14: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura J.

K**L****15**

Quadrante	X-Mean	Y-Mean	Eventos	% do total	%Gated
1 UL	0.0	0.0	0	0.00	0.00
2 UR	954.9	25.6	141	1.41	2.56
3 LL	7.2	2.5	3311	33.11	60.01
4 LR	84.5	3.6	2065	20.65	37.43

16

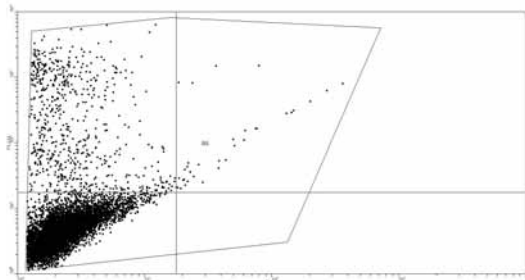
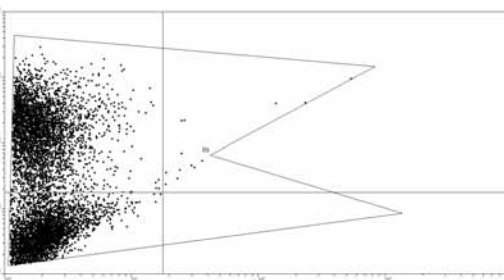
Quadrante	X-Mean	Y-Mean	Eventos	% do total	%Gated
1 UL	0.0	0.0	0	0.00	0.00
2 UR	735.9	27.3	117	1.17	1.82
3 LL	6.8	2.2	2881	28.81	44.81
4 LR	68.3	3.1	3432	34.32	53.37

Figura de Leitura K: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células T47 não irradiadas e marcadas com A5 ligante.

Figura de Leitura L: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células T47 irradiadas e marcadas com A5 ligante.

Tabela 15: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura K.

Tabela 16: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura L.

M**N**

17

Quadra nte	X-Mean	Y-Mean	Eventos	% do total	%Gated
1 UL	2.8	183.9	653	6.53	8.43
2 UR	43.6	104.8	33	0.33	0.43
3 LL	2.4	4.7	7058	70.58	91.14
4 LR	0.0	0.0	0	0.00	0.00

18

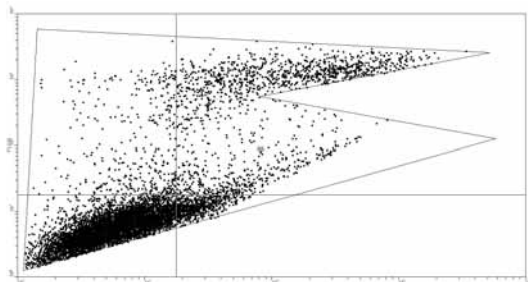
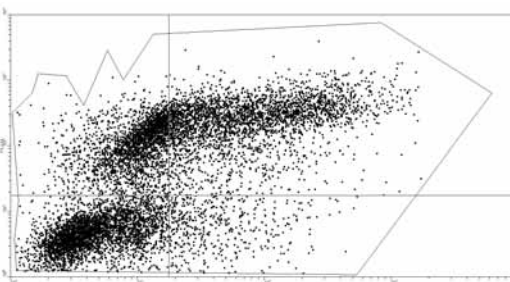
Quadra nte	X-Mean	Y-Mean	Eventos	% do total	%Gated
1 UL	2.0	152.5	3438	34.38	50.85
2 UR	43.3	96.1	13	0.13	0.19
3 LL	2.1	4.5	3310	33.10	48.96
4 LR	0.0	0.0	0	0.00	0.00

Figura de Leitura M: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células T47 não irradiadas e marcadas com iodeto de propídeo.

Figura de Leitura N: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células T47 irradiadas e marcadas com iodeto de propídeo.

Tabela 17: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura M.

Tabela 18: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura N.

O**P**

19

Quadra nte	X-Mean	Y-Mean	Eventos	% do total	%Gated
1 UL	8.6	97.7	400	4.00	4.67
2 UR	103.0	407.4	1489	14.89	17.38
3 LL	5.3	5.5	6001	60.01	70.05
4 LR	26.0	11.5	677	6.77	7.90

20

Quadra nte	X-Mean	Y-Mean	Eventos	% do total	%Gated
1 UL	9.3	103.4	2318	23.18	24.95
2 UR	77.7	240.7	2997	29.97	32.26
3 LL	4.5	4.7	3443	34.43	37.55
4 LR	43.9	5.8	446	4.46	4.80

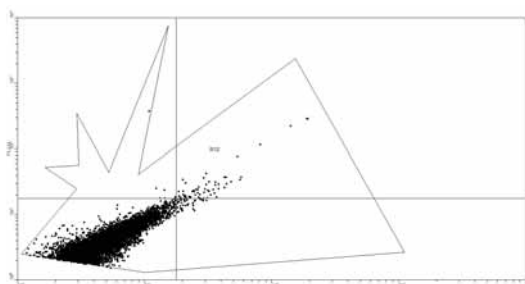
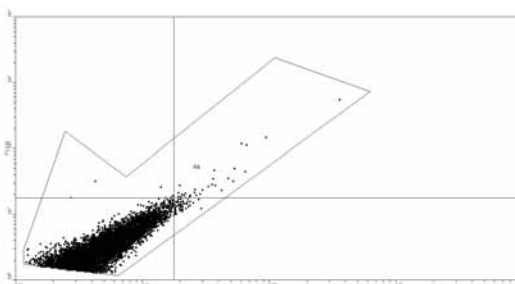
Figura de Leitura O: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células T47 não irradiadas e com dupla marcação, A5 ligante + iodeto de propídeo.

Figura de Leitura P: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células T47 irradiadas e marcadas com dupla marcação, A5 ligante + iodeto de propídeo.

Tabela 19: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura O.

Tabela 20: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura P.

4.3 - Grupo Celular MCF7:

Q**R**

21

Quadrante	X-Mean	Y-Mean	Eventos	% do total	%Gated
1 UL	14.1	30.6	7	0.07	0.12
2 UR	31.6	28.3	59	0.59	0.98
3 LL	5.0	4.1	5927	59.27	98.21
4 LR	21.4	14.6	42	0.42	0.70

22

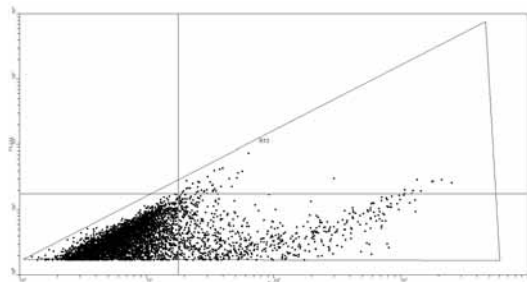
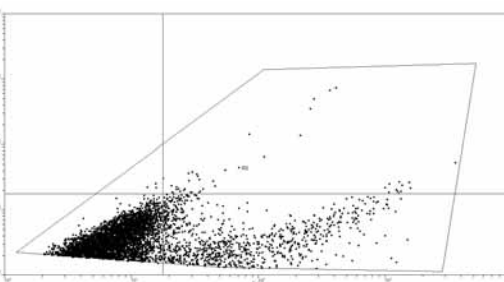
Quadrante	X-Mean	Y-Mean	Eventos	% do total	%Gated
1 UL	11.0	20.7	8	0.08	0.12
2 UR	34.6	32.7	30	0.30	0.46
3 LL	5.0	3.3	6459	64.59	98.52
4 LR	20.0	13.6	59	0.59	0.90

Figura de Leitura Q: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MCF7 não irradiadas e sem marcação.

Figura de Leitura R: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MCF7 irradiadas e sem marcação.

Tabela 21: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura Q.

Tabela 22: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura R.

S**T****23**

Quadrante	X-Mean	Y-Mean	Eventos	% do total	%Gated
1 UR	16.7	17.8	1	0.01	0.02
2 UR	72.8	24.8	48	0.48	0.95
3 LL	6.3	3.4	4303	43.03	85.21
4 LR	60.0	4.3	698	6.98	13.82

24

Quadrante	X-Mean	Y-Mean	Eventos	% do total	%Gated
1 UL	14.8	23.3	3	0.03	0.06
2 UR	116.9	36.1	44	0.44	0.89
3 LL	7.5	3.6	3995	39.95	80.53
4 LR	64.0	3.7	919	9.19	18.52

Figura de Leitura S: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MCF7 não irradiadas e marcadas com A5 ligante.

Figura de Leitura T: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MCF7 irradiadas e marcadas com A5 ligante.

Tabela 23: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura S.

Tabela 24: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura T.

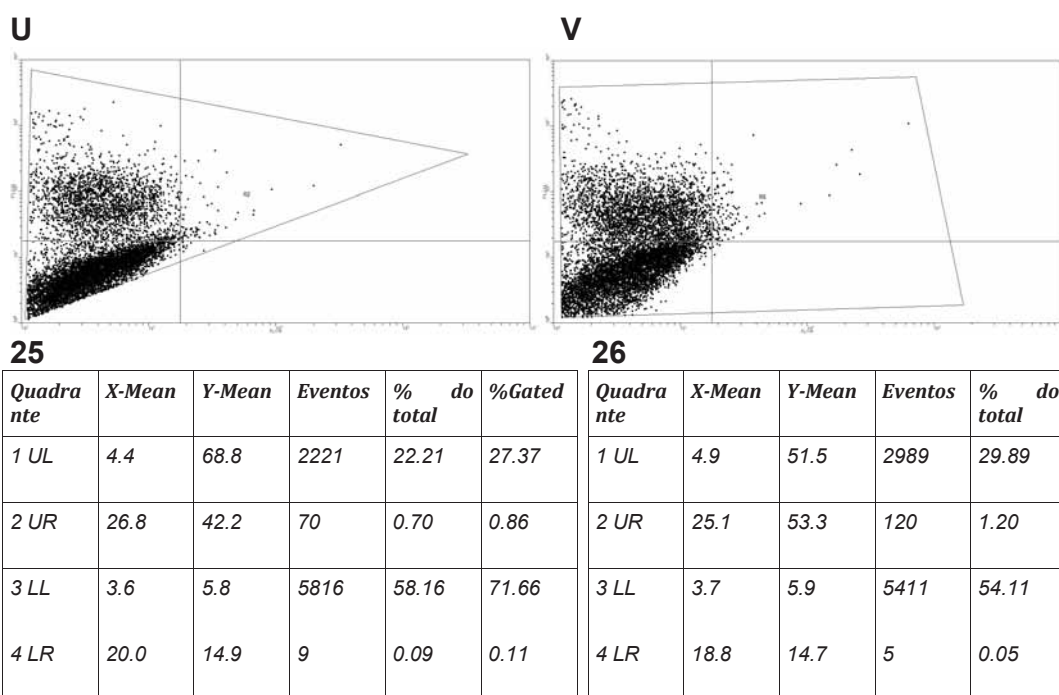


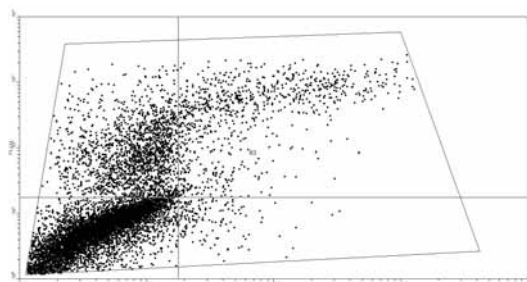
Figura de Leitura U: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MCF7 não irradiadas e marcadas com iodeto de propídeo.

Figura de Leitura V: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MCF7 irradiadas e marcadas com iodeto de propídeo.

Tabela 25: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura U.

Tabela 26: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura V.

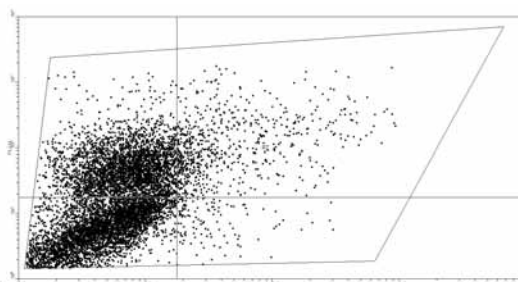
X



27

Quadra nte	X-Mean	Y-Mean	Eventos	% do total	%Gated
1 UL	7.9	80.0	1800	18.00	19.59
2 UR	65.4	329.8	850	8.50	9.25
3 LL	4.3	5.4	6386	63.86	69.51
4 LR	31.2	8.3	151	1.51	1.64

Y



28

Quadra nte	X-Mean	Y-Mean	Eventos	% do total	%Gated
1 UL	6.9	51.5	3368	33.68	38.88
2 UR	44.2	104.9	717	7.17	8.28
3 LL	4.5	5.8	4452	44.52	51.39
4 LR	32.9	7.8	126	1.26	1.45

Figura de Leitura X: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MCF7 não irradiadas e com dupla marcação, A5 + iodeto de propídeo.

Figura de Leitura Y: Gerada pelo software WinMDI, referente à leitura por citometria de fluxo de células MCF7 irradiadas e com dupla marcação, A5 + iodeto de propídeo.

Tabela 27: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura X.

Tabela 28: Dados estatísticos gerados pelo software WinMDI, correspondente a figura de leitura Y.

5 – Discussão

Um dos resultados esperados da irradiação de células com radiações de baixo LET, como os raios-X, é justamente a morte celular por apoptose ⁽⁵⁾, o resultado geral do experimento ratifica o resultado esperado. Os dados fornecidos pelas leituras indicam claramente que a irradiação das células mamárias humanas com raios-X está relacionada com a indução de apoptose. Através da comparação entre os dados estatísticos das células que foram irradiadas e que não foram irradiadas, e entre as que foram marcadas com anexina V somente, com iodeto de propídeo somente, as que tiveram dupla marcação (anexina V e iodeto de propídeo), e as que não tiveram nenhuma marcação evidenciam uma diferença clara nos dados estatísticos referentes às indicações de positivo e negativo para os marcadores específicos de apoptose (anexina V e iodeto de propídeo) usados no experimento. A indução de apoptose está relacionada com o gene p53 ⁽⁶⁾. O gene p53, localizado no cromossomo 17p13, é o gene supressor de tumor, que previne a degeneração de células sadias e a proliferação de células malignas, através da regulação do ciclo celular, indução de apoptose, e reparo no DNA ⁽⁶⁾. Uma anormalidade no gene p53 introduz instabilidade genética, e surge a probabilidade de carcinogênese e teratogênese ⁽⁶⁾. A condição do gene p53 afeta a radio sensibilidade de células tumorais humanas à irradiação com raios-X ⁽⁶⁾. As moléculas de p53 são fosforiladas pelos raios-X, o que a torna ativada, e na sua forma ativa a p53 atua diretamente na indução da expressão gênica. Quando o gene p53 está normal, a indução de apoptose mediante irradiação de células humanas com raios-X verifica-se com muita eficiência. Mutações no gene p53 são recentemente encontradas em diversos tumores humanos, e possuem alto impacto no julgamento clínico desses

tumores ⁽⁶⁾. No artigo publicado no *journal of radiation research* ⁽⁶⁾, foi verificado a indução de genes relacionados a apoptose após irradiação com raios-X em células de carcinoma epidermóide de língua humano, em células que continham o gene p53 livre (wtp53), e em células que continham o gene p53 mutado (mp53). A confirmação da dependência do estado do gene p53 na indução da morte celular por apoptose decorrente da irradiação com raios-X foi testada neste trabalho citado, através do uso de duas linhas de células derivadas de células de carcinoma epidermóide humano (SAS), linhagens com idênticas respostas genéticas, exceto para o gene p53, e as células utilizadas foram SAS/mp53, células que contém o gene p53 mutado, ou mp53, e SAS/neo, células que contém o gene p53 livre, ou wtp53.

Verificou-se que a radio sensibilidade, a atividade da caspase-3, e a freqüência de apoptose nas células SAS/neo, foi nitidamente superior em comparação com a linhagem de células SAS/mp53 ⁽⁶⁾. Na seqüencia foi feito a expressão dos genes relacionados a apoptose após a irradiação, mediante a análise de dados de cDNA, ou DNA complementar. A expressão de genes promotores de apoptose, como por exemplo, DFF40, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, e Caspase-10 aumentaram após a irradiação com raios-X nas células que continham wtp53, porém não nas células que continham mp53. Nas células com mp53, dificilmente a irradiação com raios-X afetou a expressão de genes relacionados com a morte celular por apoptose ⁽⁶⁾. O resultado geral dos experimentos publicados neste artigo de referência sugere que a irradiação com raios-X induz a ativação de genes pró-apoptóticos em células com o gene p53 livre, ou wtp53, porém não nas células com o gene p53 mutante, mp53 ⁽⁶⁾. Ainda segundo os mesmos autores, uma falha no mecanismo regulador de genes indutores de apoptose em células de SAS com o gene p53 mutado pode ajudar na compreensão

de sua relativa radio resistência, e a investigação sobre as condições do gene p53 em células tumorais de pacientes com câncer pode introduzir um fator preditivo indicativo da efetividade na seleção da terapia de combate ao câncer ⁽⁶⁾.

Segundo trabalho publicado por Bob Scott ⁽⁷⁾ há uma evidência indireta que sugere que breves exposições à radiação ionizante de baixo LET, em baixas doses, aproximadamente da ordem de 0.001 Gy, pode fazer com que decresça o risco de alterações neoplásicas abaixo do nível espontâneo, em muitas ordens de magnitude. Essa redução no risco de proliferação de células neoplásicas ocorre devido à indução do processo de proteção mediado por apoptose, PAM, decorrente ao estímulo causado pela incidência de radiação de baixo LET ⁽⁷⁾. O PAM é um processo que elimina seletivamente as células que contém instabilidade genômica, como por exemplo, células mutantes, ou células neoplásicas. O processo do PAM parece exigir uma dependência de um limiar estocástico de taxa de dose para sua ativação ⁽⁷⁾. Esse limiar pode ser tão baixo como aproximadamente 0.01×10^{-3} Gy para radiações de baixo LET, como os raios-X e os raios- γ ⁽⁷⁾. Após a irradiação de células com baixas doses de radiação de baixo LET, com uma dose acima do limiar estocástico, (D_{PAM}), o processo de proteção mediado por apoptose, PAM, pode ser ativado ⁽⁷⁾. O PAM é um efeito padrão de proteção, e também uma resposta adaptativa ⁽⁷⁾, atua na remoção seletiva de células alteradas, mutantes ou neoplásicas ⁽⁷⁾. Para fontes de fótons de baixo LET, como raios-X e raios- γ , a dose limiar mínima para a ativação do PAM pode ser baixa como por volta de 0.01×10^{-3} Gy, contudo com a incidência de uma dose muito maior que a dose limiar de inativação do PAM, (D_{off}), que é da ordem de 150×10^{-3} Gy a 250×10^{-3} Gy, para radiações de baixo LET, desde que aplicada em altas taxas de dose, o PAM pode não ser ativado ⁽⁷⁾. Ambos os limiares, de ativação e de inativação, são

esperados que sejam muito distintos para diferentes grupos de células, tecidos, órgãos, e indivíduos, e também se espera que difiram entre diferentes culturas de células ⁽⁷⁾. A dose limiar de inativação do PAM parece decrescer com o aumento do LET característico da radiação incidente, até tornar-se aproximadamente zero para partículas alfa ⁽⁷⁾. Para radiações de baixo LET doses acima do limiar de inativação, 250×10^{-3} Gy, entregues em altas taxas de doses, não se espera que seja ativado o PAM ⁽⁷⁾.

Em artigo publicado por Chen ⁽⁸⁾, cujo título “Efeitos da Exposição Crônica à Radiação Como Medida Profilática Contra o Câncer”, o autor conduziu um estudo de ocorrência de casos de câncer entre aproximadamente 10000 pessoas residentes em 180 apartamentos construídos com aço contaminado com cobalto 60. O cobalto 60 é uma das principais fontes conhecidas de raios- γ , que assim como os raios-X são radiações de baixo LET. Os moradores deste prédio habitaram-no por um tempo de aproximadamente entre 9 e 20 anos, e durante todo este tempo estes moradores receberam inconscientemente doses de radiação média de aproximadamente 400×10^{-3} Gy no corpo todo. A incidência de câncer nesta população foi reduzida de acordo com o referido autor em 95% abaixo do nível esperado para a população normal que não foi exposta a radiação. Então o autor sugere que uma exposição protegida à radiação em baixas taxas de dose parece ter expandido a zona de efeitos de proteção, mediados pelo PAM, como uma resposta adaptativa das células do organismo a este fator ambiental ^(7,8). Segundo Chen ⁽⁸⁾, com base neste trabalho, os pesquisadores concluíram que a experiência destas 10000 pessoas sugere que uma exposição em longo prazo a radiações de baixo LET, em baixas taxas de dose, da ordem de

aproximadamente 50 mSv por ano, reduz muito a incidência e conseqüentemente a mortalidade por câncer ^(7,8).

6 – Conclusão

Segundo os dos dados estatísticos referentes às leituras, fica clara a diferença quanto à comparação destes dados entre as células que foram irradiadas e as que foram o controle negativo da irradiação, as que foram irradiadas e marcadas com anexina V somente, com iodeto de propídeo somente, e as que foram duplamente marcadas para as leituras, entre cada um desses grupos de células nota-se diferenças evidentes em relação às indicações de positivo e negativo para os respectivos marcadores e também para a indicação de duplo positivo, o que significa que realmente há uma relação entre a incidência de radiação ionizante de baixo LET e a morte celular por apoptose dessas células tumorais em questão.

Fica como perspectiva para trabalhos futuros nesta área a comprovação da hipótese de que a incidência de radiação ionizante de baixo coeficiente de transferência linear de energia, baixo LET, a baixas doses e em baixas taxas de dose pode desencadear uma resposta adaptativa das células, mediante o processo de proteção mediado por apoptose, PAM, e o conseqüente desenvolvimento de uma futura prevenção ao câncer e outras degenerações neoplásicas com a utilização de feixes de radiações ionizantes de baixo LET, não como uma terapia, mais como uma medida profilática, tanto em indivíduos saudáveis e não freqüentemente expostos a agentes mutagênicos ou carcinogênicos, como em indivíduos mais expostos a agentes tóxicos carcinogênicos, como por exemplo, fumantes, ou portadores de propensão genética ao desenvolvimento de neoplasias. Atualmente o ramo da radiobiologia em maior

evidência é o da pesquisa dos efeitos biológicos de baixas doses de radiações de baixo LET, que se destaca nos dias atuais como a linha de pesquisa mais promissora desta disciplina, e com possíveis resultados surpreendentes, e também com conseqüências inovadoras tanto no campo do conhecimento teórico acadêmico puro, quanto em âmbito de possíveis novas terapias e medidas profiláticas a neoplasias, com o emprego de radiações de baixo LET, num futuro próximo.

7 – Referências Bibliográficas

- 1 – “Biologia Celular e Molecular; Conceitos e Experimentos”, Gerald Karp, Capítulo 15, página 662.**
- 2 – “A célula 2001”. Hernandez F. Carvalho, Shirley M. Recco Pimentel, Capítulo 23, página 275.**
- 3 – “Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells”. Gabriela Brumatti, Clare Sheridan, Seamus J.Martin, Novembro de 2007, (44(2008) 235-240).**
- 4- “Annexins: From the Structure to Functions”, Volker Gerke and Stephen E.Moss, Physiological Reviews volume 82, número 2, Abril de 2002 (82:331-371, 2002).**
- 5 – “Radiation Oncology Physics: A Handbook for a Teachers and Students”, E.B.Podgorsak, capítulo 14, página 489.**
- 6 – “Analysis of Apoptosis-related Gene Expression after X-ray Irradiation in Human Tongue Squamous Cell Carcinoma Cells Harboring Wild-type or Mutated p53 Gene”. Journal of Radiation Research (44, 41- 45(2003)), Junichi Yasumoto, Yushiro Imai, Akihisa Takahashi, Ken Ohnishi, Tadaaki Kirita, Takeo Ohnishi.**
- 7 – “Low-dose radiation risk extrapolation fallacy associated with the linear-no-threshold model”. Bobby R Scott, Human & Experimental Toxicology ((2008) 27: 163-168).**
- 8 – “Is a chronic radiation an effective prophylaxis against cancer?” Chen WL, Luan YC, Shieh Mc, Chen ST, Kung HT, Soong KL, Yeh Yc, Chou TS, Mong SH, Wu**

**JT, Sun CP, Deng WP, Wu MF, Shen ML. American Journal of Physics Surgery
2004; 9(1): 6-10.**