

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA



**Ciências**  
**ULisboa**

## **Simulações da Eficácia da Radiossensibilização de Nanopartículas em Terapia com Protões**

Joana Isabel do Carmo Antunes

**Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica e Biofísica**  
Perfil em Radiações em Diagnóstico e Terapia

Dissertação orientada por:  
Prof. Dr. Luís Peralta  
Prof. Dr. Jorge Sampaio



## AGRADECIMENTOS

Segundo o filósofo Epicuro, “as pessoas felizes lembram o passado com gratidão, alegram-se com o presente e encaram o futuro sem medo”.

Neste momento, ao entregar a minha tese de mestrado não posso deixar de expressar, a todos os que me acompanharam a minha gratidão.

Pelo empenhamento e confiança que em mim depositaram agradeço aos professores Luís Peralta e Jorge Sampaio por terem assumido acompanhar-me nesta fase do meu percurso. A eles, devo a orientação e a definição das várias fases deste estudo e, graças à sua disponibilidade e amabilidade, estiveram sempre a meu lado e permitiram a concretização deste meu objetivo. O meu muito obrigada, pelo incentivo e dedicação que demonstram para comigo.

Ao grupo de Radiofármacos e Radiobiologia do C2TN, fico grata pela disponibilidade de me receberem e por esclarecerem qualquer dúvida relativa aos feixes de Cobalto-60 e de raios-X.

À universidade e a todos os professores do meu curso, pelas qualidades técnicas e humanas que revelaram ter para com os seus alunos.

Tendo consciência de que sozinha nada disto seria possível, dirijo-me, em especial, aos meus pais, irmãos, prima e avós, que, por serem para mim, modelos de coragem, agradeço o apoio, conselhos, sugestões e ânimo permanente à valorização do trabalho desenvolvido, aspetos que foram determinantes para o resultado final alcançado.

Por último, a todos os meus amigos que me apoiaram ao longo, não só deste trabalho, mas também nos últimos cinco anos, queria agradecer por todos os desafios que enfrentámos e momentos agradáveis que vivemos.



## ABSTRACT

Several studies show that the combination of nanoparticles and radiotherapy allows to increase the effect of radiation in a tumoral cells without increase the patient dose. However, is not known what mechanism, physical, chemical, or biological is more relevant for the that increase.

The objective of this work is study and compare the effect of radiotherapy combined with gold nanoparticles (AuNPs) when is used photons and protons. To do that we will use the TOPAS software more specifically the extension TOPAS-nBio to simulate photons and protons irradiations to a spherical cell with different concentration of nanoparticles. The results presented will be for various conditions of clinical treatments and various radiobiology studies with nanoparticles (NPs).

With this work we want to obtain the dose enhancement factor (DEF) and the and temporal distribution of the reactive oxygen species (ROS) that result of water radiolysis, more specifically the *G-values*, to characterize the biological effects of NPs. In the first group of results, DEF, was possible conclude that higher the number of NPs in the cytoplasm, higher is the DEF. When comparing DEF, in the cell, for X-rays with 50 kVp and for 150 kVp, for the same concentration of NPs, was observed that it increases 15.0%. Also, an increase of 19.3% in DEF is observed when is compared the result obtained when the irradiation occurs with an X-ray with 50 kVp and when occurs with a cobalt-60 beam. When protons are used to do the cell irradiation, the DEF is about 1 for all concentration of NPs and do not was verified a significant difference when different energies are used. In the other group of results, *G-values*, is possible conclude that for radiation with a high Linear Energy Transfer (LET), the production of molecular species ( $H_2O_2$  and  $H_2$ ) is bigger than a verified when low LET radiation is used. Regarding the production of radicals ( $H_3O^+$ ,  $OH^-$  and  $e_{aq}^-$ ), the opposite occurs, because for radiation with low LET these species interact and form molecular species more easily.

The Local Effect Model (LEM) was applied to obtain the lethal lesion enhancement factor when the cell was irradiated with an 18 and 150 MeV proton beam and with an X-ray with 50 kVp. For low doses, this factor is identical to the DEF, but for higher doses, in the case of photons, it was found an increase of  $\sim 1\%$  between  $10^4$  and  $10^6$  particles in the beam. After this value, the lethal lesion enhancement factor is constant. For protons, for every number of particles in the beam, the biological effect verified is despicable.

In conclusion, with this work is possible study how the radiosensitizer effect change with a lot of factors and the developed model can serve as a base for more complex studies, in the future.

**Key words:** Gold nanoparticles, photons, protons, DEF, *G-values*, Monte Carlo, TOPAS, *Local Effect Model*.



## RESUMO

O cancro foi, segundo os dados apresentados em 2018, pela Organização Mundial de Saúde, um dos grandes flagelos da humanidade e constituiu a segunda causa de morte. Para o combater, várias pesquisas e inúmeros tratamentos, têm sido usados, contudo, estes são muito agressivos para o paciente e podem danificar os tecidos saudáveis em volta do tumor, ocasionando o desenvolvimento de cancros secundários muito prejudiciais ao sucesso da terapia. Para tentar debelar os efeitos negativos, julga-se que a radiosensibilização de nanopartículas (NPs) em terapia com protões, pode constituir uma solução.

Ao enriquecer o tumor com nanopartículas faz-se aumentar o efeito da radiação secundária, pois os efeitos diretos e indiretos da radiação são amplificados. Desta forma, a adição de nanopartículas às células tumorais torna possível o aumento efetivo da eficácia biológica relativa do feixe primário, no volume do tumor, e mantém o mesmo efeito biológico nos tecidos saudáveis.

Por outras palavras, esta técnica permite entregar uma maior dose ao tumor sem que seja necessário aumentar a dose nos tecidos em volta deste. O objetivo geral deste trabalho foi estudar e comparar o efeito da radioterapia combinada com NPs quando se utilizam fotões e quando se utilizam partículas carregadas. Para o efeito, foram realizadas simulações no software TOPAS, mais concretamente na extensão TOPAS-nBio, baseada no Geant4-DNA, de modo a estudar o efeito da radiação a nível celular. Nas simulações pretendeu-se obter, não só, o fator de aumento de dose (DEF) para diferentes distribuições e concentrações das NPs, mas também, a distribuição temporal das espécies reativas de oxigénio (ROS) que resultam da radiólise das moléculas de água.

Para tal, realizaram-se vários grupos de simulações. No primeiro, procedeu-se à irradiação de uma célula esférica com NPs, em várias concentrações, com um feixe de raios-X, com diferentes energias, nomeadamente com raios-X de 50 kVp, de 150 kVp e com um feixe de Co-60. No segundo grupo, pretendeu-se verificar a eficácia da radiosensibilização quando se utilizam protões com diferentes energias, mais concretamente com um feixe de protões cuja intensidade variou de 80 keV para 18 MeV e para 150 MeV. Para os casos referidos foram obtidos dois grupos de resultados: o DEF e os *G-values*.

Além disso, pretendeu-se estudar como é que a distribuição das NPs no citoplasma influencia o efeito da radiação. Assim, foi ainda realizado um outro grupo de simulações, onde, uma célula que, no seu citoplasma tinha NPs agrupadas em clusters e não dispersas no citoplasma, foi irradiada com os raios-X de 50 kVp.

No primeiro grupo de resultados, o DEF, quando se fez variar o número de NPs no citoplasma, verificou-se que quanto maior este é, maior é o DEF obtido. Por sua vez, quando se comparou o valor de DEF obtido, para as diferentes fontes de fotões simuladas, observou-se que o maior aumento do efeito da radiação, ou seja, maior DEF, foi obtido quando se utilizou a radiação menos energética, isto é, os raios-X de 50 kVp, sendo que se obteve um aumento de 15.0% e de 19.3% quando se comparou com a fonte de 150 kVp, e com a fonte de Co-60, respetivamente.

No caso dos protões verificou-se que enriquecer o tumor com nanopartículas, para aumentar o efeito radiológico, não é significativo para a concentração de nanopartículas simuladas, pois para todos os seus valores, o DEF deu, aproximadamente, um. Além disso, a diferença observada, no DEF, quando se fez alterar a energia do feixe de protões é mínima.

Os resultados obtidos demonstram ainda que é mais eficiente agrupar as nanopartículas em clusters do que as ter dispersas no citoplasma, sendo que se observou um aumento de 8.1%, 7.3% e 20.1%, quando se compara o DEF no caso, em que, existem 10 nanopartículas num cluster com o caso em que em cada cluster existiam 200 nanopartículas, para um total de 25000, 60000 e 100000 nanopartículas no citoplasma.

Por sua vez, no segundo grupo de resultados, *G-values*, comparou-se como varia a produção de espécies moleculares ( $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{H}_2$ ) e de radicais ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ,  $\text{OH}^-$  e  $e_{aq}^-$ ) com o tipo de radiação usada na irradiação da célula. Fez-se a comparação entre os resultados obtidos para as três fontes de fótons, para as três fontes de prótons e para os fótons de 50 kVp e prótons de 80 keV. Em todos os casos, verificou-se que quando se utiliza radiação com elevada transferência linear de energia (*Linear Energy Transfer* - LET), a produção de espécies moleculares é superior à verificada quando se utiliza radiação com baixo LET. O inverso verifica-se quando se observa a produção de radicais, pois estes, quando a célula é irradiada com radiação de maior LET, têm uma maior facilidade em interagir e formar novas espécies.

Aplicou-se o modelo do efeito local (*Local Effect Model* - LEM) para determinar os fatores de aumento do número de lesões letais quando a célula foi irradiada com prótons de 18 e 150 MeV e com o espectro de raios-X de 50 kVp. Verificou-se que para doses baixas, este fator é idêntico ao DEF e que para doses mais elevadas, no caso dos prótons qualquer que seja o número de partículas do feixe, o efeito biológico das nanopartículas de ouro é desprezável. Já no caso dos fótons, observou-se uma redução de  $\sim 1\%$  no efeito biológico entre  $10^4$  e  $10^6$  partículas no feixe incidente e que a partir deste valor mantém-se constante.

Em conclusão, através deste estudo foi possível verificar como é que as nanopartículas influenciam o efeito da radiação, sendo que é importante, para complementar este estudo, serem simulados outros cenários, onde, por exemplo, se fez variar o tamanho das nanopartículas e se colocam, em vez de apenas dentro de uma célula, num tecido. De um modo geral, pode-se considerar que este estudo é muito promissor, pois é sobre um aspeto que pode mudar a forma como o cancro é tratado.

**PALAVRAS CHAVE:** Nanopartículas de ouro, fótons, prótons, DEF, G-value, Monte Carlo, TOPAS, Modelo do Efeito Local.

# CONTEÚDO

<b>Agradecimentos</b>	<b>i</b>
<b>Abstract</b>	<b>ii</b>
<b>Resumo</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de Abreviações</b>	<b>viii</b>
<b>1 Motivação</b>	<b>1</b>
<b>2 Estado da Arte</b>	<b>2</b>
<b>3 Enquadramento teórico e Conceitos</b>	<b>5</b>
3.1 Efeitos Biológicos da Radiação . . . . .	5
3.2 Cancro . . . . .	6
3.3 Radioterapia . . . . .	7
3.4 Radioterapia combinada com nanopartículas . . . . .	8
3.4.1 Explicação física e química . . . . .	9
3.4.2 Caracterização das nanopartículas . . . . .	11
<b>4 Métodos</b>	<b>13</b>
4.1 Simulações Monte Carlo . . . . .	13
4.1.1 Geometria . . . . .	14
4.1.2 Irradiações . . . . .	15
4.1.3 Processos Físicos . . . . .	18
4.1.4 Processo Químico . . . . .	18
4.2 Fator de aumento da dose e rendimentos radiolíticos . . . . .	21
4.3 Modelo de Efeito Local . . . . .	21
<b>5 Resultados e Discussão</b>	<b>24</b>
5.1 Validação . . . . .	24
5.2 <i>Dose Enhancement Factor</i> . . . . .	24
5.3 <i>G-values</i> . . . . .	31
5.4 <i>Local Effect Model</i> . . . . .	36
<b>6 Sumário e conclusões</b>	<b>38</b>
<b>Referências</b>	<b>39</b>



## LISTA DE FIGURAS

3.1	Efeitos diretos e indiretos da radiação [25]. . . . .	6
3.2	Passos necessários para a formação de um cancro metastizado. . . . .	6
3.3	Perfil de dose em profundidade para raios-X (preto) e protões (vermelho) [29]. . . . .	7
3.4	Dose antes e depois do tumor em radioterapia convencional (a), em terapia de protões (b) e em terapia de protões combinada com NPs (c); retirada de [31] . . . . .	8
3.5	Mecanismo que provoca um aumento do efeito da radiação. . . . .	9
3.6	Importância relativa dos diversos processos de interação dos fotões com a matéria, em função da energia ( $E$ ) do fotão e do número atómico ( $Z$ ) do meio material [34]. . . . .	10
3.7	Interações da radiação com NPs, adaptada de [32] . . . . .	11
3.8	Estrutura de AuNP combinadas com BBN e marcadas gálio-67 [36]. . . . .	12
4.1	Modo de funcionamento do TOPAS, modificado de [40] . . . . .	14
4.2	Bloco de parâmetros <i>TsCell</i> utilizados para gerar o modelo da célula representado no painel à direita. . . . .	14
4.3	Espetros de raios-X simulados com o Spekcalc. . . . .	16
4.4	Esquema de irradiação da célula indicando os parâmetros de simulação principais. . . . .	17
4.5	Esquema das reações que ocorrem nas três fases da radiólise da água [45]. . . . .	18
5.1	Comparação dos resultados obtidos com os resultados publicados por Rudek <i>et al.</i> [22] . . . . .	24
5.2	Representação gráfica do DEF obtido para diferentes concentrações de NPs no citoplasma, quando a célula é irradiada com diferentes qualidades de feixes de fotões. . . . .	25
5.3	Representação gráfica do DEF obtido para diferentes concentrações de NPs, no citoplasma e para os feixes de protões de 18 MeV e 150 MeV. . . . .	27
5.4	Distribuição espacial da energia depositada para um espectro de raios-X de 50 kVp. . . . .	29
5.5	Distribuição espacial da energia depositada para um feixe de protões de 18 MeV. . . . .	30
5.6	Representação gráfica do DEF obtido, quando as NPs estão agrupadas em clusters para um espectro de raios-X de 50 kVp. . . . .	31
5.7	Representação gráfica dos <i>G-values</i> obtidos, quando se irradia uma célula com um espectro de raios-X de 50 kVp e quando existem, no citoplasma, 60000 AuNPs. . . . .	31
5.8	Comparação dos <i>G-values</i> para os diferentes fontes de fotões simuladas, quando a célula tem 60000 NPs no citoplasma. . . . .	33
5.9	Comparação dos <i>G-values</i> para os diferentes feixes de protões simulados, quando a célula tem 60000 NPs no citoplasma. . . . .	34
5.10	Comparação dos <i>G-values</i> obtidos, quando se irradia a célula com raios-X de 50 kVp e com protões de 80 keV. . . . .	35
5.11	Representação gráfica do DEF e da razão entre lesões letais para as linhas celulares U87 e T98G, quando na célula estão 60000 AuNPs. . . . .	37



**LISTA DE TABELAS**

3.1	Valores médios de LET para diferentes tipos de radiação. . . . .	5
4.1	Concentrações de NPs simuladas. . . . .	15
4.2	Parâmetros utilizados para simular os espectros de raios-X no SpekCalc. . . . .	16
4.3	Parâmetros da irradiação com fótons. . . . .	17
4.4	Parâmetros utilizados quando se irradia a célula com prótons. . . . .	17
4.5	Moléculas químicas e respetivos coeficiente de difusão. . . . .	19
4.6	Reações e respetivas taxas de reação usadas no módulo <code>TsEmDNAChemistryExtended</code> . . . . .	20
4.7	Parâmetros utilizados para definir o transporte de espécies químicas. . . . .	20
4.8	Parâmetros utilizados para definir quando ocorre o corte de espécies químicas. . . . .	21
4.9	Parâmetros $\alpha$ e $\beta$ das linhagens U87 e T98G usados neste trabalho [48] . . . . .	23
5.1	Valor de DEF obtido para as diferentes fontes de fótons, quando no citoplasma da célula estão colocadas 60000 AuNPs. . . . .	26
5.2	Valor de DEF obtido para os diferentes feixes de prótons, quando na célula estão colocadas 60000 AuNPs. . . . .	28



**LISTA DE ABREVIACOES**

<b>DGS</b>	Direção Geral da Saúde
<b>Z</b>	Número Atmico
<b>NPs</b>	Nanoprculas
<b>MC</b>	Monte Carlo
<b>AuNPs</b>	Nanoprculas de Ouro
<b>TOF-PET</b>	<i>In-beam Time-of-Flight Positron Emission Tomography</i>
<b>C2TN</b>	Campus Tecnológico e Nuclear
<b>ICNAS</b>	Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas  Saúde
<b>RM</b>	Ressonância Magnética
<b>DEF</b>	<i>Dose Enhancement Factor</i>
<b>PIXE</b>	<i>Proton Induced X-ray Emission</i>
<b>PIGE</b>	<i>Proton Induced Gamma-Ray Emission</i>
<b>REF</b>	<i>Radiolysis Enhancement Factor</i>
<b>LET</b>	Transferncia Linear de Energia
<b>ICRU</b>	<i>International Commission on Radiation Units &amp; Measurements</i>
<b>RBE</b>	Eficácia Biolgica Relativa
<b>OMS</b>	Organizao Mundial de Sade
<b>IMRT</b>	<i>Intensity Modulated Radiation Therapy</i>
<b>IMPT</b>	<i>Intensity Modulated Proton Therapy</i>
<b>ROS</b>	Espécies Reativas de Oxignio
<b>BBN</b>	Pptido Bombesina
<b>SPECT</b>	Cintigrafia de Foto nico
<b>PET</b>	Tomografia por Emissão de Positrões
<b>TOPAS</b>	<i>TOol for PArticle Simulation</i>
<b>LIP</b>	Laboratório de Instrumentao e Física Experimental de Partículas
<b>LEM</b>	<i>Local Effect Model</i>
<b>LQ</b>	Modelo Linear Quadrático



# 1 MOTIVAÇÃO

De acordo com o relatório da Direção Geral da Saúde (DGS) [1], a taxa bruta de incidência de tumores malignos em Portugal, reportada a 2010, é de 444,5 casos por 100 000 habitantes, sendo que o número projetado para 2020 é da ordem dos milhares de novos casos, concretamente 55 000. Os principais meios de tratamento desta doença são a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia externa com fotões, ou uma combinação destas. No entanto, existem, planos para a instalação, em Portugal, nos próximos anos, de um ou mais centros de terapia com partículas carregadas pesadas, nomeadamente com feixe de protões (Resolução do Conselho de Ministros n.º 28/2018).

Todas as técnicas referidas devem ser aplicadas de acordo com o benefício para o paciente, devendo ser otimizado o uso da radiação, de modo a minimizar a dose nos órgãos e tecidos em risco. Isto, levou ao estudo de métodos alternativos de tratamento, nomeadamente, a utilização combinada de feixes externos e nanopartículas (NPs) de número atómico ( $Z$ ) elevado, colocadas dentro das células tumorais. Desta forma, o estudo do aumento do efeito radiológico, devido à presença de NPs, tem sido, na investigação recente, bastante importante, pois poderá tornar possível, no futuro, administrar uma dose mais baixa a um paciente, sem comprometer a dose que o tumor deve receber, ou seja, sem comprometer o tratamento prescrito.

O objetivo desta dissertação é estudar e comparar o efeito da radioterapia combinada com NPs quando se utilizam fotões e quando se utilizam partículas carregadas, como protões, com energias de interesse clínico, usando simulações Monte Carlo (MC). Assim, pretendeu-se implementar as simulações que reproduzam as condições das experiências de radiobiologia com feixes de raios-X e de protões combinados com NPs de ouro (AuNPs), com o propósito de obter, para as diferentes distribuições e concentrações, as distribuições espaciais da dose e o número de espécies químicas produzidas no interior da célula ( $G$ -Values), à escala nanométrica. Algumas destes experiências estão programadas para serem realizadas em Portugal no âmbito do projeto *In-beam Time-of-Flight (TOF) Positron Emission Tomography (PET) for proton radiation therapy* (TOF-PET) recorrendo aos feixes de raios-X e de cobalto-60 existentes no C2TN e ao feixe de protões produzido no ciclotrão do ICNAS.

Com base nas simulações vamos ainda aplicar um modelo para inferir o número de lesões letais em células, o que poderá ajudar a analisar e interpretar os resultados futuros das experiências de radiobiologia.

## 2 ESTADO DA ARTE

Ao longo do tempo, vários estudos *in vivo* foram realizados com o objetivo de verificar como as NPs com elevado número atômico influenciam o efeito da radiação. Uma das NPs mais utilizadas são as de ouro, pois não só apresentam uma boa biodistribuição, mas também não são tóxicas.

Hainfeld *et al.* [2] foram os primeiros a estudar estas NPs, utilizando para tal uma fonte de raios-X de 250 kVp como fonte primária de radiação e verificaram que ao injetar, intravenosamente AuNPs de 1.9 nm de diâmetro em ratos portadores de carcinoma mamário EMT-6 subcutâneo, a taxa de sobrevivência destes, ao fim de um ano, melhora substancialmente, pois passou de 86%, contra os 20% obtidos ao usar o tratamento com raios-X e 0% ao usar simplesmente ouro.

Em estudos posteriores Hainfeld *et al.* [3] estudaram o efeito de AuNPs de 11 nm de diâmetro injetadas intravenosamente em ratos portadores de tumores cerebrais com elevada malignidade, quando irradiados com 30 Gy de raios-X de 100 kVp, tendo concluído que as AuNPs apresentam uma maior fixação no tecido tumoral, sendo o rácio de tumor para tecido normal de 19:1. Esta elevada concentração de AuNPs no tumor não só contribuiu para o aumento do efeito da radiação em cerca de 300%, mas também provocou um aumento no contraste, o que torna possível a aquisição de imagens de micro CT de alta resolução do tumor cerebral.

Como referido, revestir as NPs pode ser importante para que se consiga uma melhor captura por parte das células. Para tal, os trabalhos de Al Zaki *et al.* [4] e de Zhang *et al.* [5] contribuíram de forma notória, demonstrando que ao encapsular as AuNPs com micelas poliméricas e glutathiona, respetivamente, conduz a um aumento do efeito da radiação. No entanto, no estudo apresentado por Al Zaki *et al.* [4] ainda se concluiu que a adição de micelas poliméricas provoca um aumento do contraste entre o tumor e o tecido normal, o que possibilita uma melhor delimitação do tumor nas imagens, levando a um tratamento guiado por CT mais eficiente. Por sua vez, Zhang *et al.* [5] confirmaram que quando combinadas com estes compostos biológicos, as AuNPs são facilmente eliminadas do corpo através dos rins, impedindo uma acumulação excessiva destas no organismo do paciente.

Até então, AuNPs foram estudadas como partículas que contribuem para o aumento do efeito da dose e como agentes de contraste. Contudo, as quantidades de ouro necessárias para os dois efeitos são de diferentes ordem de grandeza, o que limita o seu poder ter-agnóstico (*theragnostic effect*). Assim, McQuande *et al.* [6] desenvolveram uma micela carregada com NPs de ouro e ferro superparamagnético designada por GSM (*gold and superparamagnetic iron oxide NP (SPION) loaded micelle (GSM)*) que ao ser injetada, de forma intravenosa, em ratinhos, permite não só adquirir imagens das margens do tumor, através de RM, mas também um aumento do efeito da radiação. Esta realidade foi confirmada, quando ao fim de um ano, se combinou GSM, com um feixe de raios-X com alguns kVp e se observou que a taxa de sobrevivência é de 71%, o que é significativamente melhor quando comparada com a taxa de 25% devido apenas à irradiação. O aumento do contraste nas imagens de RM permite ainda prever a resposta do tumor de uma forma muito eficiente, o que é vantajoso no tratamento.

Os estudos apresentados apenas relatam pesquisas em que se usam raios-X de algumas centenas de kV para irradiar o tumor, no entanto, posteriormente, outros foram desenvolvidos para demonstrar como as NPs podem aumentar o efeito da radiação mesmo quando são irradiadas por feixes de raios-X com alguns MV.

Wolfe *et al.* [7], ao estudarem ratinhos com tumor da próstata, conjugaram a aplicação de goseralina (agente *tumor-targeting*) com *nanorods* de ouro (AuNRs), com um feixe de raios-X e com tensões utilizadas no meio clínico (6 MV). Estes autores, concluíram que não é necessária uma concentração muito elevada de AuNRs para o tratamento ser suficiente, já que todas estas partículas vão para o tumor

devido à goseralina. Ao nível do tumor, verificou-se uma redução do seu crescimento quando foi usado um feixe de alguns MV e AuNRs combinadas com goseralina, comparativamente aos tratamentos usando raios-X de alguns MV e partículas de ouro não conjugadas ou apenas radioterapia. Esta conclusão foi corroborada por Dou *et al.* [8] que, para além de terem chegado à mesma conclusão, verificaram que, devido a uma maior libertação de eletrões para o meio e a formação de aglomerados mais densos, as AuNPs de pequenas dimensões apresentam melhores resultados que AuNPs maiores e que se aplicarmos o tratamento algumas horas após a injeção das AuNPs este será mais eficiente.

No que diz respeito ao estudo do aumento do efeito da radiação, quando o feixe são partículas carregadas, poucos se fez, na atualidade, *in vivo*. Kim *et al.* [9] foram os primeiros cientistas a abordar a questão e demonstraram que também existe um aumento do efeito da radiação, mas que para ser alcançado a concentração de AuNPs tem de ser elevada. Em estudos seguintes Kim *et al.* [10] verificaram que existe um aumento das espécies de oxigénio reativo (ROS) e que este é devido à emissão de eletrões secundários pelas NPs e à radiólise da água, tendo concluído que este fator está relacionado com a amplificação da regressão do tumor verificada no estudo.

Paralelamente e tomando como base os estudos experimentais, foram simulados vários modelos com o objetivo de compreender como as NPs influenciam o efeito da radiação nos sistemas biológicos. Para o efeito, utilizou-se, na maioria dos casos, simulações MC, considerando, não só os efeitos das NPs quando irradiadas com um feixe de fótons, mas também quando são irradiadas com um feixe de partículas carregadas, como prótons.

Uns dos primeiros estudos sobre o efeito de AuNPs, em radioterapia, deve-se a Cho [11]. Foram feitas simulações MC, para várias concentrações de NPs e para diferentes fontes de radiação: um feixe de raios-X de 140 kVp, dois feixes de fótons de 4 e 6 MV e um feixe de raios- $\gamma$  proveniente dos  $^{192}\text{Ir}$  (da ordem das centenas de keV). Este autor demonstrou que, no fantoma utilizado, se verificou um aumento significativo do efeito da dose ao usar os feixes de raios-X de baixa energia e o feixe de raios- $\gamma$ .

No que diz respeito ao estudo das características das NPs, Lechtman *et al.* [12] estudaram como, o tamanho, concentração e localização das NPs influenciam o aumento do efeito radiológico. Assim, tendo em conta a energia da fonte, sugeriu duas abordagens: na primeira, onde a fonte tinha uma energia inferior à da camada  $K$ , as AuNPs deveriam ser de pequenas dimensões e estarem conjugadas com biomoléculas *tumor-targeting*. Na segunda modalidade, em que a energia da fonte é superior à energia da camada  $K$ , o tamanho e a localização celular das AuNPs não é importante, mas a sua concentração, tem que ser elevada.

Carter *et al.* [13] estudaram os mecanismos nanoscópicos envolvidos na deposição de eletrões secundários de baixa energia, libertados pelas NPs quando estas são irradiadas com raios-X de alguns kV, sendo este estudo realizado com o objetivo de verificar qual a posição das NPs que mais contribui para o aumento do efeito radiológico. Ao realizarem esta simulação concluíram que as AuNPs devem estar localizadas perto do ADN para que a morte celular das células tumorais, resultante da produção de radicais livres devido aos eletrões de baixa energia, seja maximizada. Com o mesmo objetivo, Douglass *et al.* [14] desenvolveram um modelo tridimensional da célula para o GEANT4. Na simulação utilizou aglomerados de AuNPs localizadas aleatoriamente dentro da célula que foi irradiada com feixes de raios-X de 80 kVp e 6 MV. As conclusões retiradas deste estudo estão em consonância com as obtidas por Carter *et al.* [13], pois verificou que as AuNPs localizadas perto do núcleo da célula contribuem mais para o efeito da radiação, comparativamente com aquele que se obtém para AuNPs localizadas no citosol ou na membrana.

Para estudar a abordagem clínica, Brivio *et al.* [15] simularam um cenário de tratamento, através de simulações MC, e estudaram o efeito das AuNPs no tratamento de degeneração macular neovascular,

relacionada com a idade. Concluíram que ao usar NPs de ouro com 20 nm de diâmetro e com uma concentração de 32 g/kg, a dose no tumor é o dobro da obtida quando não se utilizam NPs, o que permite reduzir a dose nos órgãos vizinhos em cerca de 49%, quando comparado com o tratamento sem as AuNPs.

Por sua vez, quando se utilizam partículas carregadas e não fotões, como feixe primário de radiação, também se observa um aumento dos efeitos da radiação quando estão presentes NPs, contudo, o mecanismo que explica este aumento é diferente do dos fotões e foi estudado por Wälzlein *et al.* [16] através de simulações MC, nomeadamente através da utilização do código TRAX. Nesta simulação, os autores fizeram incidir um feixe de protões com energias de interesse terapêutico em NPs de ouro, ferro, prata, platina e gadolínio, tendo verificado, que existe um aumento na dose local em volta das NPs e que este se deve, principalmente, a eletrões de Auger em cascatas consecutivas. Além disto, verificaram que o efeito das NPs de ouro e de platina é maior quando comparado com as outras NPs.

Apesar dos resultados apresentados serem promissores, o aumento simulado não é suficiente para justificar os efeitos macroscópicos observados. Por conseguinte, existe a necessidade de introduzir um novo mecanismo que explique este aumento no caso das partículas carregadas. A primeira hipótese que surgiu foi tentar adaptar o modelo químico já proposto para o feixe de raios-X. Este modelo baseia-se num maior dano celular resultante de modificações químicas que levam a uma maior produção de radicais livres. Tal facto, conduz a um aumento da morte celular que, conseqüentemente, altera o efeito da radiação, tornando-a mais eficaz [17].

Lin *et al.* [18] tentaram estabelecer relações entre os resultados obtidos para os protões e para diferentes energias de feixes de fotões, através de simulações de MC. Os resultados obtidos mostram que, para obter o mesmo fator de aumento das dose, designado por DEF (*Dose Enhancement Factor*), é necessária uma quantidade muito superior de NPs para irradiações com protões quando comparado com irradiações com fotões. Lin *et al.* [18] demonstraram que este aumento produzido pelas AuNPs, no caso dos protões é independente da sua energia, sendo que o mesmo não acontece com os fotões, pois é altamente dependente da energia da radiação. Assim, as AuNPs têm capacidade de aumentar o efeito da radiação, sendo a eficácia destas dependente da qualidade do feixe de radiação primária.

Cho *et al.* [19] realizaram mais estudos de MC considerando apenas que o aumento da dose se deve ao processo físico. Assim estudaram as contribuições de PIXE (*Proton-Induced X-ray Emission*), PIGE (*Proton-Induced Gamma-Ray Emission*), eletrões secundários e de Auger no aumento do efeito da radiação. Chegaram à conclusão de que os eletrões de Auger e os eletrões secundários são os que apresentam um maior contributo no efeito radiológico, pois estes têm um alcance muito curto. Contudo, Martínez-Rovira *et al.* [20] mostraram que, considerar apenas a produção de eletrões, não era suficiente para descrever o efeito macroscópico observado em várias experiências, porque os mecanismos químicos e biológicos não foram incluídos no estudo de Cho *et al.* [19]. Desta forma, Tran *et al.* [21] incluíram no seu estudo mecanismos físico-químicos, utilizando para tal o código GEANT4 e GEANT4-DNA. Com este estudo, foi possível definir uma variável que permite quantificar a variação na produção de eletrões secundários, através da radiólise, com a adição de NPs de ouro ao tecido biológico. Esta variável é designada por *radiolysis enhancement factor* (REF) [21].

Mais recentemente, Rudek *et al.* [22] desenvolveram um modelo para estudar o aumento do efeito da radiação com NPs de ouro e como ele responde as várias concentrações, tamanhos e formas de NPs. Além de estudar este efeito para fotões e protões, estudaram ainda para iões de carbono. Estes cientistas foram ainda pioneiros no que diz respeito à inclusão de um modelo para a radiólise da água e concluíram que para todos os tipos de feixe primário, o efeito da radiação aumenta de forma linear com a concentração de AuNPs e diminui com o tamanho e grau de aglomeração das AuNPs.

### 3 ENQUADRAMENTO TEÓRICO E CONCEITOS

#### 3.1 EFEITOS BIOLÓGICOS DA RADIAÇÃO

Dependendo da capacidade de a radiação ionizar ou não a matéria, esta pode ser classificada em radiação ionizante e não ionizante. Assim, a radiação ionizante corresponde à radiação que tem energia suficiente para ionizar átomos e moléculas e pode ser classificada em radiação diretamente ionizante e radiação indiretamente ionizante. O primeiro caso é constituído essencialmente por carregadas (eletrões, prótons e iões pesados), onde a energia é depositada no meio maioritariamente por interações de Coulomb, entre estas partículas e os eletrões presentes no meio, enquanto o segundo caso é constituído por partículas neutras (fotões e neutrões), onde a ionização do átomo ocorre devido a partículas carregadas secundárias que têm origem na interação das partículas primárias com a matéria.

No âmbito do estudo da interação da radiação ionizante com a matéria, a Transferência Linear de Energia (LET) é uma variável que, pela sua importância, é necessário definir. Segundo a *International Commission on Radiation Units* (ICRU), a LET representa o quociente  $dE/dl$ , em que  $dE$  é a energia média localmente depositada no meio, por uma partícula carregada de energia específica ao longo de uma distância  $dl$ . Desta forma, a LET foca-se em definir a taxa linear de energia absorvida, pelo meio, à medida que a partícula carregada o atravessa. No caso das partículas neutras, como os fotões, não faz sentido falar de LET em sentido estrito, no entanto, muitos autores referem-se à LET de fotões, referindo-se à energia perdida por unidade de comprimento pelas partículas secundárias resultantes da interação dos fotões num meio material. Na tabela 3.1 estão representados valores médios para esta variável em água e para diferentes tipos de radiação.

Tabela 3.1: Valores médios de LET para diferentes tipos de radiação.

Radiação	LET (keV/ $\mu\text{m}$ )	Referência
Raios- $\gamma$ Co-60	0.2	[23]
Raios-X 250 kVp	2.0	
Protões 150 MeV	0.5	
Protões 10 MeV	8.3	[24]
Protões 1 MeV	43.0	

Ao expor as células à radiação ionizante ocorrem, em primeiro lugar, efeitos físicos entre a radiação e os átomos da célula e só depois ocorrem os danos biológicos, ao nível do ADN. Estes, de acordo com as características da radiação, isto é, de acordo com a LET, podem ser de dois tipos: indiretos ou diretos, como ilustrado na figura 3.1.

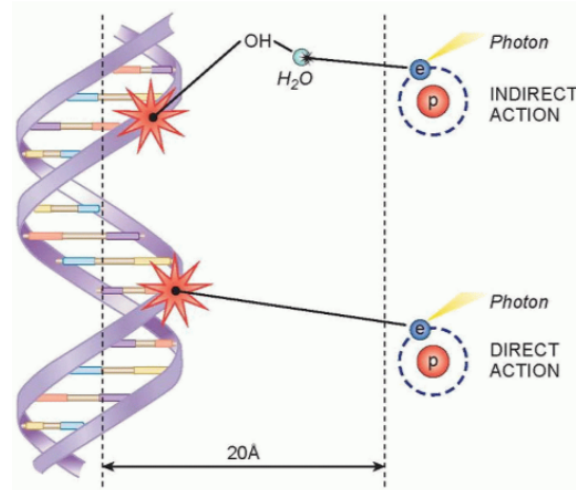


Figura 3.1: Efeitos diretos e indiretos da radiação [25].

No efeito indireto, a radiação produz a radiólise da água, produzindo radicais livres ( $\text{OH}^-$  e  $\text{H}^+$ ). Estes radicais recombina-se formando peróxidos ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que têm uma vida suficientemente longa para se difundirem pelos tecidos, produzindo reações químicas com o ADN e outros constituintes das células, levando a danos biológicos. No caso do efeito direto, a radiação incidente, através de interações de Coulomb, ioniza moléculas como proteínas e ADN ou destrói, por completo, membranas celulares e cromossomas, originando-se, primeiro, uma cadeia de efeitos físicos e químicos que podem culminar num dano biológico. Este tipo de efeito é o que predomina em interações de radiação com elevado LET.

Para uma dose física igual, nem todos os tipos de radiação causam a mesma quantidade de dano biológico e nem todos os tecidos reagem da mesma maneira a uma determinada dose física, pois o efeito da radiação ionizante depende de vários fatores, nomeadamente da dose, da taxa de dose e da qualidade da radiação. Para explicar as diferenças no dano biológico, é utilizado um fator de escala conhecido por eficácia biológica relativa (RBE). Esta, representa a razão entre a dose de uma radiação de referência e a dose da radiação que queremos analisar que resulta no mesmo efeito. A radiação de referência, normalmente utilizada são raios-X gerados a 250 kV ou radiação-gama de uma fonte de cobalto-60. O valor que expressa o RBE depende da aglomeração de ionizações ao longo do caminho das partículas carregadas nos tecidos, isto é, depende fortemente do LET, apresentando um RBE máximo na região dos  $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ .

### 3.2 CANCRO

O cancro é numa doença onde as células do organismo, por terem sofrido mutações no seu ADN, se dividem descontroladamente, invadem tecidos e não morrem pelos processos normais de morte celular, sendo necessários vários passos para que isso aconteça (figura 3.2).

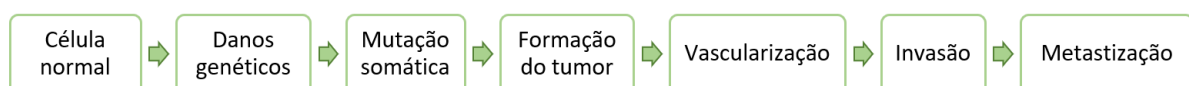


Figura 3.2: Passos necessários para a formação de um cancro metastizado.

Esta doença é muito prejudicial para o organismo, pois não só invade os órgãos fundamentais mas também, utiliza oxigénio e nutrientes de que eles necessitam. Além destes aspetos nefastos, ainda existe a

libertação de toxinas que danificam os tecidos saudáveis [26].

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) o cancro foi a segunda causa de morte mais comum em 2018, sendo responsável por cerca de 9.6 milhões de mortes em todo o mundo, o que indica que uma em cada seis mortes está diretamente relacionada com esta doença [27].

Existem vários processos para tratar cancro, sendo que, atualmente, os mais convencionais são a quimioterapia, a cirurgia e a radioterapia e, normalmente, são utilizados em conjunto. Outras técnicas, como a imunoterapia, a terapia hormonal e a *targeted therapy* têm vindo a ganhar grande importância no tratamento de cancro. De entre as técnicas mencionadas, irá ser abordada a radioterapia, pois pretende-se que a eficácia deste tratamento, aumente com o enriquecimento do tumor com NPs.

### 3.3 RADIOTERAPIA

A radioterapia tem a capacidade de aumentar a probabilidade de cura em 3.5 milhões de pessoas e, por outro lado, possibilita a assistência paliativa de igual número. É, por isso, considerada como um elemento essencial para um tratamento eficaz [28].

Esta técnica consiste em destruir macromoléculas, como as cadeias de dupla hélice de ADN, recorrendo a radiação ionizante. Os dois principais tipos de radioterapia são a radioterapia com fótons e a radioterapia com partículas carregadas. A resposta dada por estas partículas apresenta um comportamento distinto ao atravessar um tecido, ou seja, a forma como acontece a deposição de energia, ao longo de um trajeto, difere quando se utilizam fótons ou prótons. A diferença observada está ilustrada na figura 3.3.

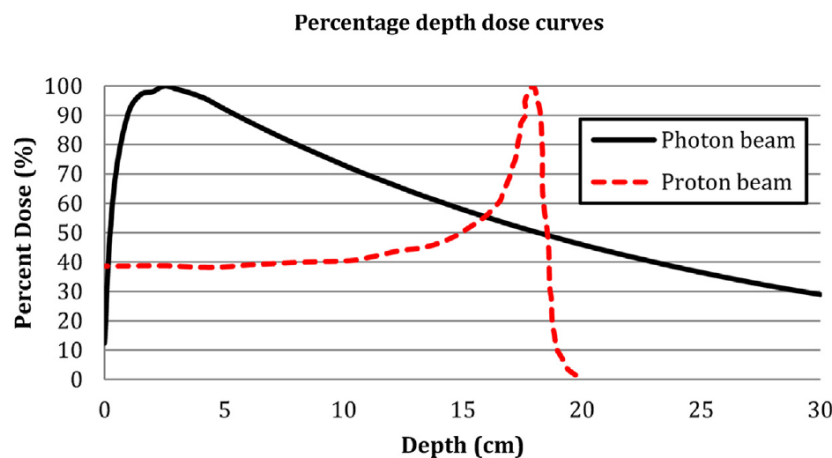


Figura 3.3: Perfil de dose em profundidade para raios-X (preto) e prótons (vermelho) [29].

A radioterapia convencional utiliza raios-X de alta energia para parar a divisão celular. Estes, ao longo do tratamento, depositam energia na área a ser tratada, danificando o material genético das células e assim impossibilitam a divisão das mesmas. Além de se utilizarem raios-X, os raios- $\gamma$  também podem ser utilizados em tratamentos de radioterapia. Estes são produzidos de uma forma espontânea através do decaimento de vários elementos radioativos, como o cobalto-60. Ambos apresentam o mesmo efeito nas células cancerígenas.

A radioterapia convencional é utilizada para tratar tumores situados em profundidade, pois os fótons têm a capacidade de percorrer grandes distâncias, podendo tratar tumores em profundidade. Contudo produzem uma região de *build-up* à entrada dos tecidos como se pode observar na figura 3.3. Além disso, como têm uma grande capacidade de penetração, também produzem uma dose elevada à saída do tumor.

A combinação destes dois efeitos pode danificar tecidos saudáveis em volta do tumor e ocasionar, para além de cancro secundários, de fibroses e de doenças cardíacas, um declínio da capacidade cognitiva [30]. Os sistemas modernos de radioterapia com raios-X permitem minimizar estes efeitos indesejáveis fazendo incidências no mesmo volume a tratar com direções diferentes e variando a intensidade do feixe de modo a irradiar o tumor com a dose desejada em cada porção do seu volume. Esta técnica é conhecida por *Intensity Modulated Radiation Therapy* (IMRT).

Como alternativa à radioterapia convencional existe a radioterapia com prótons, usada para tratar tumores radiorresistentes e localizados perto de órgãos sensíveis e, em particular, em doentes pediátricos. A vantagem de se usar esta modalidade está relacionada com a capacidade dos prótons penetrarem nos tecidos ao longo de alguns centímetros e, no fim do seu percurso depositarem o máximo de energia, numa região denominada de pico de Bragg, representada na figura 3.3. Variando a energia do feixe incidente podemos localizar a posição da dose máxima em diferentes regiões em profundidade do tumor. De referir, no entanto, que antes de atingir o tumor, os prótons depositam ainda energia nos tecidos sãos que percorrem, fornecendo-lhes uma dose significativa. Para minimizar este efeito pode-se aplicar uma técnica equivalente à dos raios-X, designada por *Intensity Modulated Proton Therapy* (IMPT). A grande vantagem da utilização dos prótons em relação aos raios-X é que a dose decai rapidamente após o pico de Bragg.

Para resolver as limitações relacionadas com a deposição de energia em tecidos saudáveis, quando se utilizam fótons ou prótons, uma das ideias promissoras passa por enriquecer o tumor com radiosensibilizadores, nomeadamente, com NPs de átomos com um elevado número atómico. Na figura 3.4 está representada a vantagem, em termos de dose total para paciente, num tratamento de radioterapia convencional (a), terapia com prótons (b) e a combinação de prótons com NPs (c).

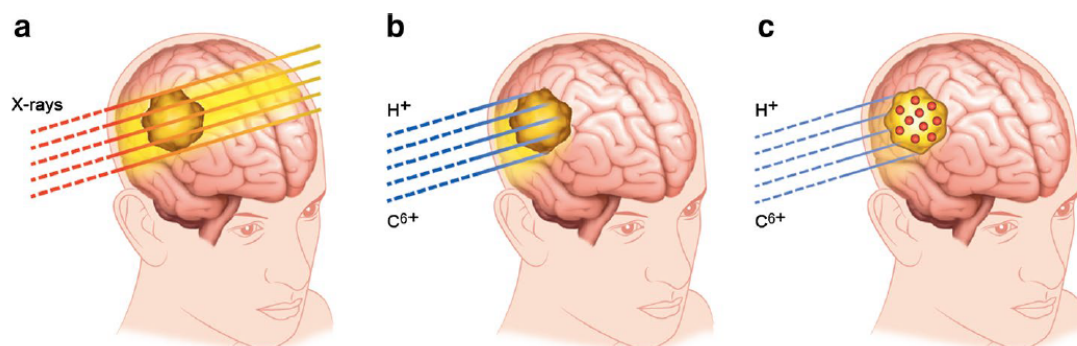


Figura 3.4: Dose antes e depois do tumor em radioterapia convencional (a), em terapia de prótons (b) e em terapia de prótons combinada com NPs (c); retirada de [31]

### 3.4 RADIOTERAPIA COMBINADA COM NANOPARTÍCULAS

O tumor absorve facilmente as NPs, já que estas são conjugadas com moléculas *tumor-targeting*, o que faz aumentar o efeito da radiação secundária, amplificando tanto os efeitos diretos como indiretos da radiação. Isto é, a adição de NPs às células tumorais possibilita o aumento efetivo do RBE do feixe primário, no volume do tumor, mantendo o mesmo efeito biológico nos tecidos sãos. Assim para uma dose biológica prescrita para o tumor, permite diminuir a dose física nos tecidos saudáveis.

### 3.4.1 EXPLICAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA

Apesar das diferenças entre feixes primários de fótons e prótons, o mecanismo físico, que resulta num aumento do efeito da radiação, tem uma base comum, ilustrada na figura 3.5. Inicialmente, ocorre a ionização do sistema que resulta da interação do feixe primário e das partículas secundárias com as NPs e com a matéria celular. Após esta ionização, os átomos deixam de estar excitados através da redistribuição dos estados eletrónicos, o que resulta na emissão de fótons de fluorescência e eletrões de Auger que vão ionizar as biomoléculas e as NPs vizinhas, formando-se, assim, uma cascata de reações que vai levar a um aumento do efeito da radiação [32].

Tanto no caso em que se utilizam fótons, como no caso em que se utilizam prótons, a presença de NPs com elevado número atómico faz aumentar a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS). Deste modo, as NPs, não só são responsáveis por aumentar cataliticamente a produção de hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) e superóxido  $\text{O}_2^-$ , mas também, de inibirem a regulação das reações de oxidação-redução. O aumento da produção de hidroxilo é um processo complexo e depende de vários fatores, tais como a concentração de NPs e a dose de radiação fornecida às células que têm as NPs. O aumento destas espécies reativas de oxigénio faz aumentar a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o que leva a um aumento dos danos indiretos provocados pela radiação.

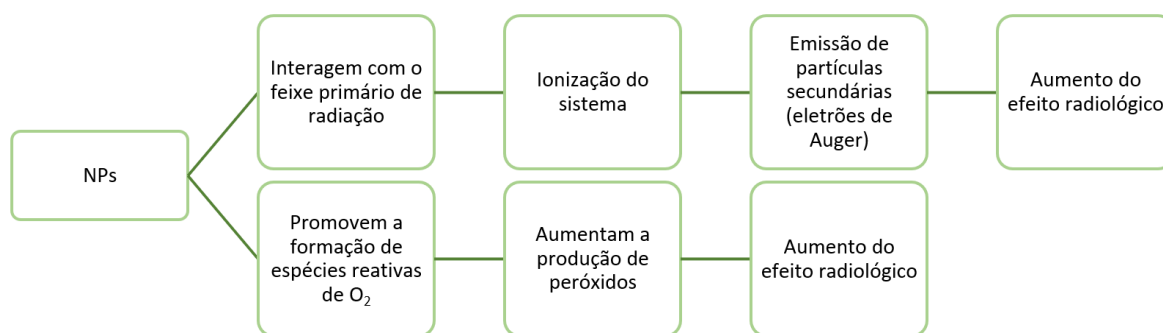


Figura 3.5: Mecanismo que provoca um aumento do efeito da radiação.

Desta forma, a presença de NPs aumenta a produção de eletrões secundários, que depositam a sua energia nas células tumorais, e contribui para o aumento da produção de ROS, o que, consequentemente promove um aumento local do efeito da radiação.

Relativamente ao mecanismo físico, o que difere, quando são utilizado fótons ou prótons, é o modo como a ionização do sistema ocorre. Os fótons podem sofrer vários tipos de interação com as NPs, entre as quais o efeito fotoelétrico e a dispersão de Compton. No efeito fotoelétrico, o fóton interage com o átomo, sendo totalmente absorvido por este. Desta interação resulta a emissão de um eletrão, de uma camada mais interna, criando-se, uma lacuna que vai ser preenchida por um eletrão de uma orbital mais externa. Desta interação ocorre a libertação de fotoeletrões e eletrões de Auger. Na dispersão de Compton, o fóton numa colisão inelástica com um eletrão orbital fracamente ligado transfere-lhe parte da sua energia, levando, não só, à ejeção deste, mas também, na de um fóton secundário com menor energia que o inicial. Desta interação ocorre a libertação de partículas secundárias, tais como os fotoeletrões e os eletrões de Auger.

Os fotoeletrões têm um alcance que é determinado pela diferença entre a energia da partícula incidente e a energia da camada, sendo o efeito produzido a uma escala nanoscópica, o que possibilita a ionização de NPs vizinhas. Por sua vez, os eletrões de Auger resultam de um processo que ocorre quando um eletrão de uma camada interna dos átomos das NP é libertado e é responsável pela libertação de um ou

mais elétrons de Auger. Estes, são caracterizados por terem uma energia inferior a 5 keV, e, por isso, um alcance muito curto ( 1-10 nm), mas podem causar danos diretamente no ADN devido ao seu LET elevado (2-30 keV/ $\mu\text{m}$ ). O número de elétrons de Auger emitidos, devido ao efeito fotoelétrico, aumenta com  $Z$  e diminui com a energia. Portanto, se o fóton incidente interagir com NPs com elevado  $Z$ , o número de elétrons de Auger emitidos é maior, do que no caso de interagir com elementos leves presentes no tecido biológico [33].

Todas as partículas secundárias podem interagir com outras NPs, originando mais elétrons de Auger, ou podem ser absorvidas pelo meio causando ionização e formação de radicais. Além disso, as NPs carregadas positivamente, após libertarem um fotoelétrão ou um elétron de Auger, podem causar instabilidade nas moléculas de água em volta da NP, provocando a sua radiólise, o que faz aumentar a produção de radicais [32].

O efeito da radiação com a matéria, que predomina, depende do número atómico do meio e da energia dos fótons, como está ilustrados na figura 3.6.

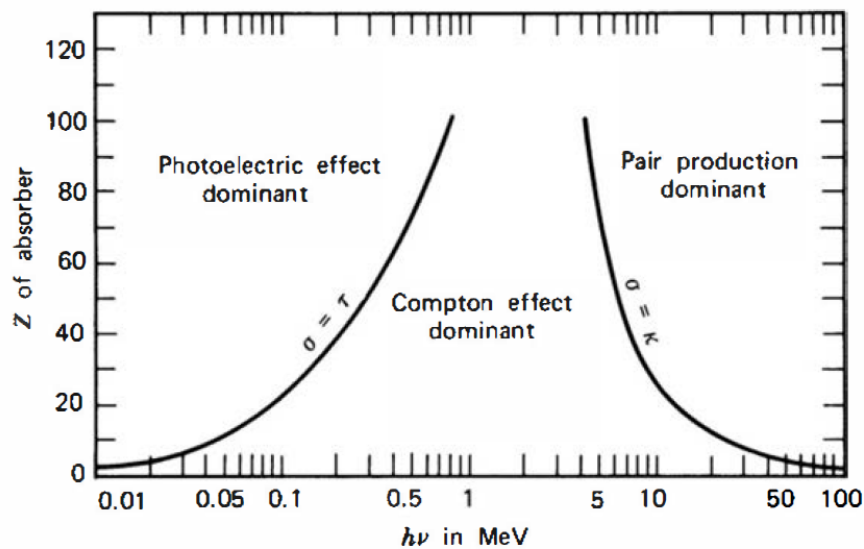


Figura 3.6: Importância relativa dos diversos processos de interação dos fótons com a matéria, em função da energia ( $E$ ) do fóton e do número atómico ( $Z$ ) do meio material [34].

Assim, a interação dos fótons de baixa energia (keV) com NPs de elevado número atómico é dominada pelo efeito fotoelétrico que resulta, na produção de raios-X de fluorescência e de elétrons de Auger como radiação secundária (Fig. 3.7a). Para energias clínicas (MeV), os processos dominantes na interação dos fótons com elementos de elevado valor de  $Z$ , são a dispersão de Compton e a produção de pares (Fig. 3.7b). Neste caso, o aumento do efeito da radiação é relativamente menor, mas continua a verificar-se, em virtude da interação das NPs com as radiações secundárias produzidas pela ionização das moléculas de água e não da interação direta das NPs com a radiação primária.

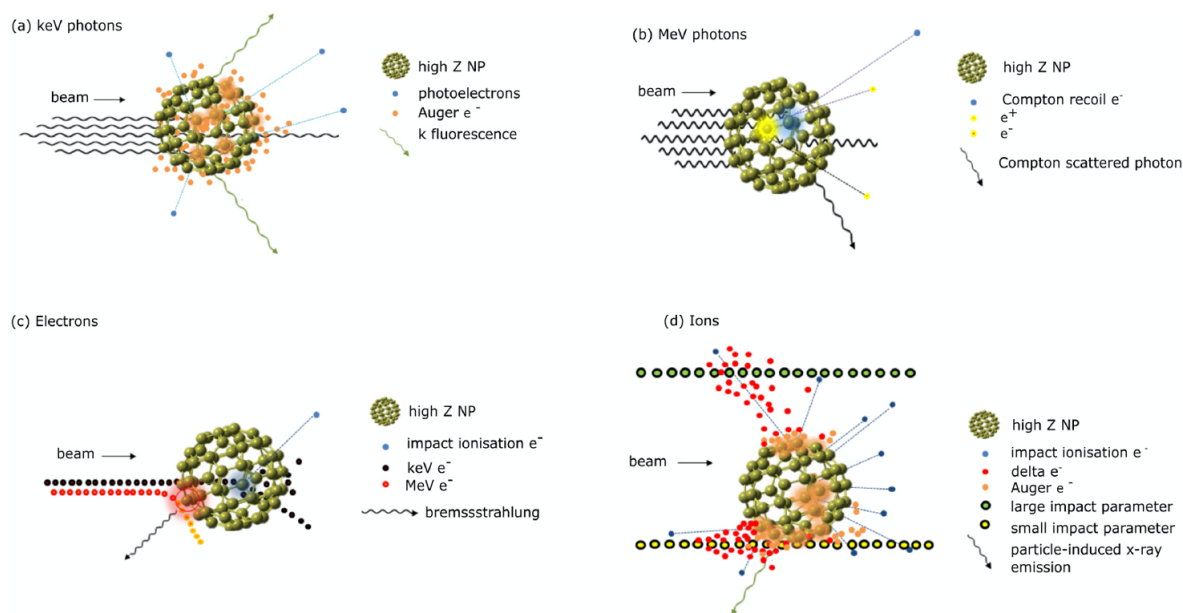


Figura 3.7: Interações da radiação com NPs, adaptada de [32]

No caso dos prótons, estes podem interagir com a matéria por três vias, designadamente interações de Coulomb com eletrões atómicos, interações de Coulomb com o núcleo atómico e reações nucleares, sendo, as primeiras aquelas que representam, no contexto clínico, maior interesse. Neste caso, ocorre a ionização dos átomos das NPs com elevado número atómico e consequente retorno ao estado fundamental com emissão de eletrões, como se ilustra na figura 3.7d. Estes eletrões vão depositar a sua energia no meio, contribuindo, assim, para o aumento do efeito da radiação.

Uma questão importante nos estudos atuais com NPs é saber qual é a qualidade do feixe ótima para potenciar o efeito das NPs: fótons de baixa energia, fótons de energia clínica ou prótons a energia clínica?

### 3.4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As NPs, utilizadas para enriquecer o tumor, têm de ter características muito específicas no que diz respeito ao tamanho, à forma, ao revestimento e aos constituintes, pois todos estes fatores vão influenciar a captura das NPs pelas células tumorais e a sua resposta biológica [33].

O tamanho afeta não só, o impacto das NPs no sistema biológico, mas também, a forma como as NPs interagem com a radiação. A biodistribuição e a rota de eliminação das NPs do corpo depende fortemente do tamanho destas e, é um processo bastante importante para evitar a acumulação de NPs nos diversos órgãos, de modo a evitar efeitos a longo prazo. O diâmetro das NPs é importante porque os eletrões de Auger têm um alcance muito curto e é necessário garantir que estes conseguem escapar das NPs e interagir, com o meio envolvente ou com NPs vizinhas. Além dos requisitos referidos anteriormente, é importante ter em consideração a concentração das NPs, desempenhando, inclusive, um papel mais importante no aumento do efeito da radiação, do que propriamente o tamanho da NP.

Outro fator importante é o revestimento das NPs, uma vez que ajuda a controlar o modo como as NPs interagem. Desta forma, ao combinar as NPs com moléculas específicas consegue-se garantir que existem em concentração suficiente, dentro das células tumorais. No entanto, o revestimento pode atenuar alguns eletrões de Auger que foram libertados pelas NPs e ainda diminuir o número de radicais livres produzidos.

Ao longo dos anos, vários trabalhos foram realizados para estudar quais os elementos químicos

que favorecem a produção de NPs e quais os fatores, de entre os referidos, que proporcionam um maior aumento do efeito da radiação (ver, por exemplo, os estudos de Wälzlein *et al.* [16] e de Rudek *et al.* [22]). Apesar de terem sido estudadas NPs constituídas por átomos de ferro, platina, gadolínio e ouro, as mais utilizadas são as de ouro, uma vez que apresentam uma boa biocompatibilidade, métodos de síntese bem estabelecidos para uma grande variedade de tamanhos. Além disso, é fácil revestir este tipo de NPs com moléculas que possibilitam que elas atinjam as células tumorais com uma concentração desejada.

Por exemplo, no âmbito do projeto TOP-PET referido atrás uma das tarefas lideradas pela equipa de radiofarmácia do C2TN pretend-se estudar diferentes AuNPs multifuncionais. No processo desenvolvido por este grupo, as NPs são combinadas, com o péptido bombesina (BBN), cujo recetor está presente em várias linhagens de células tumorais, como aquelas que se apresentam, por exemplo, no cancro da próstata, e com radiometais importantes em medicina, como o gálio-67 e/ou gadolínio. O grupo que integra esta equipa de investigação já realizou vários estudos onde têm evidenciado a vantagem das NPs. No momento atual, considera como objetivo principal o estudo do efeito do uso de AuNPs em terapias anti-cancro e em sistema de *drug delivery* guiado por imagem. Para isso, pretendem utilizar AuNPs marcadas com gadolínio para contraste em ressonância magnética (RM), com gálio-67 para cintigrafia de fóton único (SPECT) ou com cobre-64 para tomografia por emissão de positrões (PET).

Na figura 3.8 está representada um exemplo de uma estrutura de AuNPs, desenvolvida pela equipa supracitada [35].

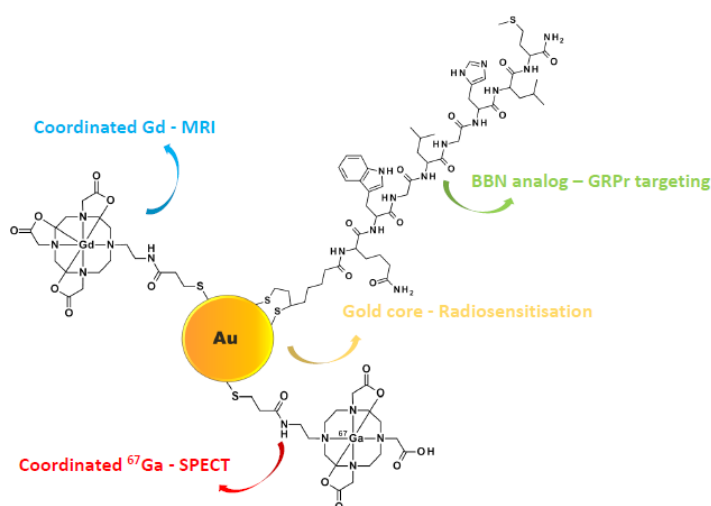


Figura 3.8: Estrutura de AuNP combinadas com BBN e marcadas gálio-67 [36].

## 4 MÉTODOS

### 4.1 SIMULAÇÕES MONTE CARLO

As simulações Monte Carlo (MC) têm sido muito úteis ao longo das últimas décadas para modelar os efeitos físicos e químicos da radiação. Os métodos MC utilizam modelos matemáticos com base na geração de números aleatórios e cálculos estatísticos para resolver problemas em muitas áreas da ciência, quer estes se situem no domínio científico e tecnológico na investigação fundamental, quer estejam relacionados com estudos prospetivos dos mercados financeiros [37].

No caso da física das partículas e da física das radiações, as simulações MC são aplicadas à simulação do transporte e interação de partículas em materiais, incluindo órgãos e tecidos biológicos. Uma característica das simulações MC importante para este trabalho é elas possibilitarem a modelação do carácter estocástico das interações das partículas nesses materiais [38], permitindo o registo de variáveis físicas (energia, posição, momento linear, etc) ponto-a-ponto para obter os valores médios e a variância dessas quantidades [39].

Existem vários programas de simulação Monte Carlo da interação da radiação com a matéria, sendo uns mais gerais em termos do tipo de partículas e energias simuláveis do que outros. São exemplos destes programas o FLUKA, o PENELOPE, o Geant4, entre outros. Neste trabalho vai ser utilizado o *TOol for PArticle Simulation* (TOPAS) [40] que foi desenvolvido com enfoque nas aplicações médicas. Mais concretamente vamos utilizar a extensão *TOPAS-nBio* [41], que permite simular as estrutura de traços das interações a nível celular e subcelular, incluindo os processos físicos e químicos. É, por isso, uma ferramenta muito adequada para o estudo do impacto das NPs no efeito da radiação ao nível subcelular.

O TOPAS é um programa construído com base no Geant4 [42], que foi desenvolvido para a área médica com o objetivo de tornar a implementação das simulações mais fácil e intuitiva. Para isso a simulação é controlada através de ficheiros de parâmetros sem necessidade de um grande conhecimento de programação em C++, mas com a mesma precisão do Geant4. Como este trabalho tem como principal objetivo o estudar do efeito da radiação a nível celular, utilizou-se a extensão TOPAS-nBio, que estende o TOPAS a experiências de radiobiologia. O TOPAS-nbio permite simular todos os pontos de interações de partículas de baixa energia (isto é, não aplica histórias condensadas comumente usadas para otimizar o tempo de simulação) e permite simular a produção e propagação dos produtos resultantes da radiólise.

Assim, ao usar um modelo com uma fonte de radiação e um alvo com NPs, é possível verificar a formação de eletrões secundários e ainda verificar qual a energia produzida por estes, de acordo com vários parâmetros, como o tamanho, a forma, a distribuição, a concentração das NPs, a energia do feixe e a distância entre a fonte (as NPs) e o alvo (núcleo celular).

O esquema de funcionamento do TOPAS está representado na figura 4.1. O ficheiro de parâmetros é construído por blocos de linhas constituídas pelo tipo de variável (caracteres, booleano, inteiro, real de precisão dupla, etc) e pelo nome do parâmetro (materiais, geometria, fonte de partículas, modelo físico e químico, quantidades a registar, etc). Um grande número de parâmetros é definido utilizando extensões disponibilizadas pelos TOPAS, sendo também possível o utilizador desenvolver as suas próprias extensões.

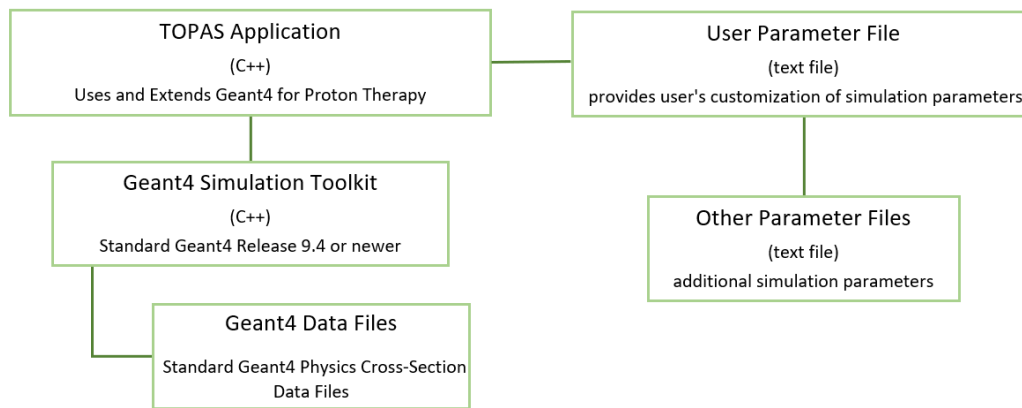


Figura 4.1: Modo de funcionamento do TOPAS, modificado de [40]

As simulações foram corridas na FARM do LIP, sendo o tempo aproximado de simulação de 74, 72 e 53 horas para a fonte de raios- $X$  de 50 kVp, para a de 150 kVp e para o feixe de Co-60, respetivamente. Para os prótons de 80 keV, 18 MeV e 150 MeV, o tempo aproximado de simulação foi de 87, 165 e 192 horas, respetivamente.

#### 4.1.1 GEOMETRIA

Um dos passos fundamentais para a construção da simulação é a definição da geometria. Desta forma, foi desenvolvida uma extensão, `TsCell`, que permite definir uma célula esférica com um núcleo esférico. O utilizador pode definir o raio da célula e o raio e posição do núcleo dentro da desta. Pode ainda definir o número, o material, e o raio das NPs, sendo estas colocadas de uma forma aleatória e sem estarem sobrepostas no citoplasma.

Assim, o modelo simulado consiste numa célula com  $9\ \mu\text{m}$  de diâmetro, centrada num cubo com  $12\ \mu\text{m}$  de aresta, cheio de água, cujo núcleo, com  $5.4\ \mu\text{m}$  de diâmetro, se encontra no centro. Na figura 4.2 está ilustrado o modelo simulado, em que as NPs são representadas por esferas amarelas e o núcleo a vermelho.

```

s:Ge/MyCell/Type = "TsCell"
d:Ge/MyCell/Material = "G4_WATER"
d:Ge/MyCell/CellRadius = 4.5 um

d:Ge/MyCell/Nucleus/NucleusRadius = 2.7 um
s:Ge/MyCell/Nucleus/Material = "G4_WATER"

i:Ge/MyCell/Nanoparticles/NumberOfNPs = 3773
d:Ge/MyCell/Nanoparticles/NPsRadius = 5 nm
d:Ge/MyCell/Nanoparticles/Material
="G4_Au_MODIFIED"
  
```

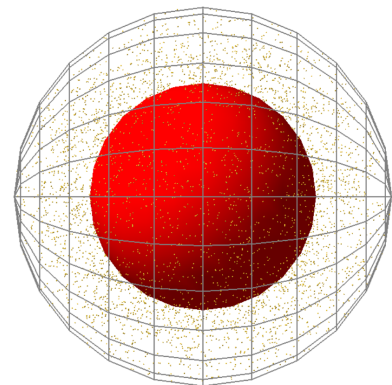


Figura 4.2: Bloco de parâmetros `TsCell` utilizados para gerar o modelo da célula representado no painel à direita.

Foram realizados dois grupos de simulações, no primeiro grupo foram dispersas NPs com um diâmetro de 10 nm no citoplasma da célula. A concentração foi obtida através do rácio entre a massa das NPs e a massa total da célula e variou entre 0.001% e 0.159%, como mostra a tabela 4.1.

Tabela 4.1: Concentrações de NPs simuladas.

Concentração (%)	Número de NPs
0.001	377
0.010	3773
0.013	5000
0.066	25000
0.106	40000
0.159	60000

No segundo grupo pretendemos estudar o efeito obtido quando as NPs não estão dispersas no citoplasma, mas aglomeradas em *clusters*. Para tal manteve-se a massa total de NPs e substituiu-se o elevado número de NPs pequenas por um número inferior de NPs maiores. A massa total de NPs no citoplasma é dada pela equação 4.1.

$$M = Nm, \quad (4.1)$$

onde  $m$  é a massa de cada NP e  $N$  o número de NPs no citoplasma. Considerando que no citoplasma existiam  $N_1$  NPs pequenas, com massa  $m_1$ , que pretende-se substituir por  $N_2$  NPs maiores, com uma massa  $m_2$ , temos

$$N_2 m_2 = N_1 m_1 \iff m_2 = \frac{N_1}{N_2} m_1 \quad (4.2)$$

Como  $\rho = \frac{m}{V} \iff m = \rho \frac{4}{3} \pi R^3$ , onde  $\rho$  é a densidade do material das NPs, obtém-se a relação entre os dois raios:

$$R_2 = R_1 \sqrt[3]{\frac{N_1}{N_2}} \quad (4.3)$$

Usando a relação entre os raios, podemos simplificar o modelo de aglomerados de NPs pequenas por uma distribuição de NPs maiores. Foram simulados três cenários onde o número de NPs num cluster foi de 10, 100 e de 200 e onde o número total de NPs simuladas no citoplasma foi de 25000, 60000 e 100000. Em todos os casos, a célula foi irradiada com o espectro de raios-X de 50 kVp.

#### 4.1.2 IRRADIAÇÕES

Após a definição da geometria procedeu-se à implementação das fontes de radiação na simulação, nomeadamente para três feixes de prótons, dois espectros de raios-X, um feixe de Cobalto-60 e um feixe de prótons.

Para gerar os espectros de raios-X usou-se o SpekCalc [43] que combina modelos analíticos da componente de bremsstrahlung com valores numéricos précalculados por MC da distribuição de eletrões a diversas profundidades do ânodo. Para se utilizar este programa é necessário fornecer o potencial do tubo em kV (tensão no pico ou  $kV_p$ ), o ângulo do ânodo (ângulo de saída), a filtração em três materiais (ar, janela de berílio e filtro de alumínio) e o tamanho dos intervalos de energia para gerar os espectros. Os parâmetros utilizados para os produzir estão representados na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Parâmetros utilizados para simular os espectros de raios-X no SpekCalc.

Parâmetros no SpekCalc	Valores
Tensão no pico (kV)	50 e 150
Intervalo de energia (keV)	0.10
Ângulo de saída (°)	30.00
Espessura de ar (mm)	0.00
Janela de berílio (mm)	0.00
Filtro de alumínio (mm)	4.65

Os valores das tensões escolhidos representam regimes comuns de operação em radiologia e, em particular os raios-X de 150 kV são os planeados para experiências de radiobiologia com NPs no C2TN. Os espectros de raios-X simulados para um tubo de raios-X com um alvo de tungsténio e para  $kV_p=50$  e  $kV_p=150$  estão ilustrados na figura 4.3a e 4.3b, respetivamente.

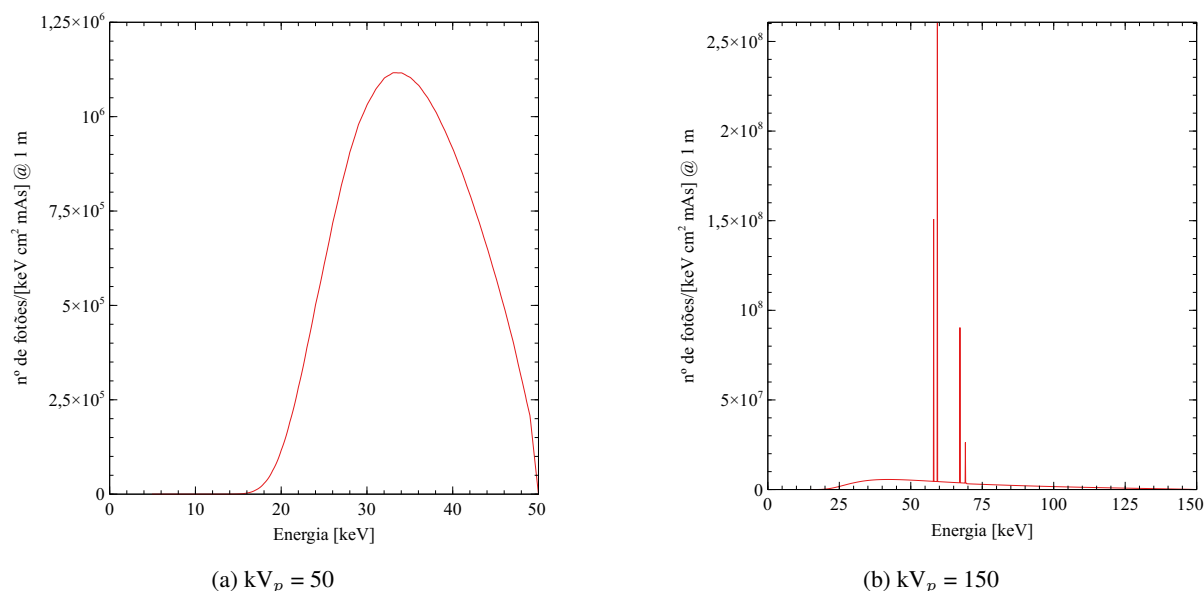


Figura 4.3: Espectros de raios-X simulados com o Spekcalc.

Para além dos raios-X também estão programadas irradiações com uma fonte de cobalto-60, que é uma das radiações de referência em experiências de radiobiologia. Nas simulações considerámos os dois fótons gama com energias de 1.17 e 1.33 MeV resultantes do decaimento beta do cobalto para o níquel excitado. O feixe foi caracterizado como um espectro descontínuo de duas energias com idêntica probabilidade de emissão.

Os parâmetros necessários para definir estes três espectros estão representados na tabela 4.3. No caso dos dois espectros contínuos é necessário a definição de um ficheiro de entrada, para ser lido pelo TOPAS e onde se vai definir as energias e os respetivos pesos do espectro.

Tabela 4.3: Parâmetros da irradiação com fótons.

Fonte de Fótons	Espetro 150 kVp	Espetro 50 kVp	Cobalto-60
<b>Parâmetros</b>			
BeamParticle	Gamma	Gamma	Gamma
BeamEnergySpectrum	Continuous	Continuous	Discrete
	InputFile from SpekCalc	InputFile from SpekCalc	BeamEnergySpectrumValues: 1.17 MeV e 1.33 MeV
			BeamEnergySpectrumWeight: 0.5 e 0.5
NumberOfHistoriesInRun	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>

Para o feixe de prótons simularam-se três energias: 150 MeV, 18 MeV e 80 keV, cujos parâmetros utilizados no TOPAS são apresentados na tabela 4.4. A energia de 150 MeV é representativa do valor típico de irradiação usada em terapia com prótons, não sendo a energia do feixe na região do tumor (pico de Bragg). Para isso considerámos a energia mais baixa de 18 MeV que também é representativa da energia nominal do ciclotrão do ICNAS, para onde também estão planeadas experiências de radiobiologia com NPs. Embora não seja realista a produção em aceleradores de prótons de 80 keV, esta energia corresponde à região do máximo LET destas partículas em água.

Tabela 4.4: Parâmetros utilizados quando se irradia a célula com prótons.

Fonte de Prótons	Prótons 80 keV	Prótons 18 MeV	Prótons 150 MeV
<b>Parâmetros</b>			
BeamParticle	Protons	Protons	Protons
BeamEnergy (MeV)	0.8	18.0	150.0
BeamEnergySpread	0.00111	0.00111	0.00111
NumberOfHistoriesInRun	1000	1000	1000

Em todos os casos, optou-se por colocar a fonte de radiação a 6  $\mu\text{m}$  do centro da célula. Este feixe, de forma circular, dispersa-se a partir da posição inicial, segundo uma distribuição angular gaussiana, com uma abertura máxima coincidente com a secção máxima da célula, como representado na figura 4.4.

```
d:Ge/BeamPosition/TransX = 0. m
d:Ge/BeamPosition/TransY = 0. m
d:Ge/BeamPosition/TransZ = 6 um
```

```
s:So/Fonte/BeamPositionDistribution="Flat"
s:So/Fonte/BeamPositionCutoffShape="Ellipse"
d:So/Fonte/BeamPositionCutoffX = 4.5 um
d:So/Fonte/BeamPositionCutoffY = 4.5 um
```

```
s:So/Fonte/BeamAngularDistribution="Gaussian"
d:So/Fonte/BeamAngularCutoffX = 90. deg
d:So/Fonte/BeamAngularCutoffY = 90. deg
d:So/Fonte/BeamAngularSpreadX=0.00001 rad
d:So/Fonte/BeamAngularSpreadY=0.00001 rad
```

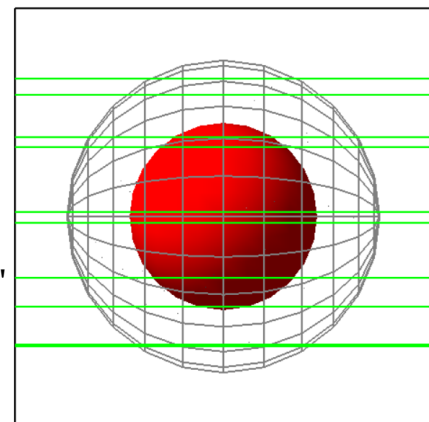


Figura 4.4: Esquema de irradiação da célula indicando os parâmetros de simulação principais.

### 4.1.3 PROCESSOS FÍSICOS

Para que as interações físicas sejam simuladas é necessário definir as listas que descrevem os processos e os modelos para determinadas energias e materiais. A lista mais detalhada para baixas energias e para a água líquida é o GEANT4-DNA [44], a qual segue as interações dos elétrons até a uma energia de termalização de 7.4 eV e que engloba transições eletrônicas e vibracionais nesse meio. Por conseguinte, esta utilizámos a lista *g4em-dna* quer no citoplasma quer no núcleo da célula.

Uma das limitações da versão atual do Geant4-DNA é que só simula interações em água líquida. Assim devido à inexistência de secções eficazes para o ouro na lista *g4em-dna*, estudou-se a definição de uma outra lista para as NPs. De entre as várias possíveis, utilizou-se a lista *g4em-livermore*, a qual tem um limite de produção de elétrons secundários de 10 eV, sendo possível, deste modo, incluir a produção de elétrons de Auger, a cascata de desexcitação de Auger, os elétrons de fluorescência e o processo de PIXE (*particle induced x-ray emission*).

O alcance dos elétrons e dos fótons foi definido para 1 nm, sendo estipulado, que sempre que estas partículas secundárias não percorressem uma distância superior a metade do raio das NPs, a sua energia seria registada e a simulação da sua história seria terminada.

Ambas as listas *g4em-dna* e *g4em-livermore* não incluem processos relacionados com reações nucleares. Estes processos não têm sido incluídos nas simulações de irradiações com NPs existente na literatura, uma vez que se considera que as secções eficazes são relativamente baixas em relação aos processos de colisões eletrônicas. Voltaremos a este assunto na secção 6 (Sumário e Conclusões).

### 4.1.4 PROCESSO QUÍMICO

Para simular a radiólise da água tem de se ter em consideração as suas três fases, isto é, a fase física, a fase pré-química ou físico-química e a fase química. Estas estão representadas no esquema da figura 4.5 e ocorrem em diferentes escalas temporais.

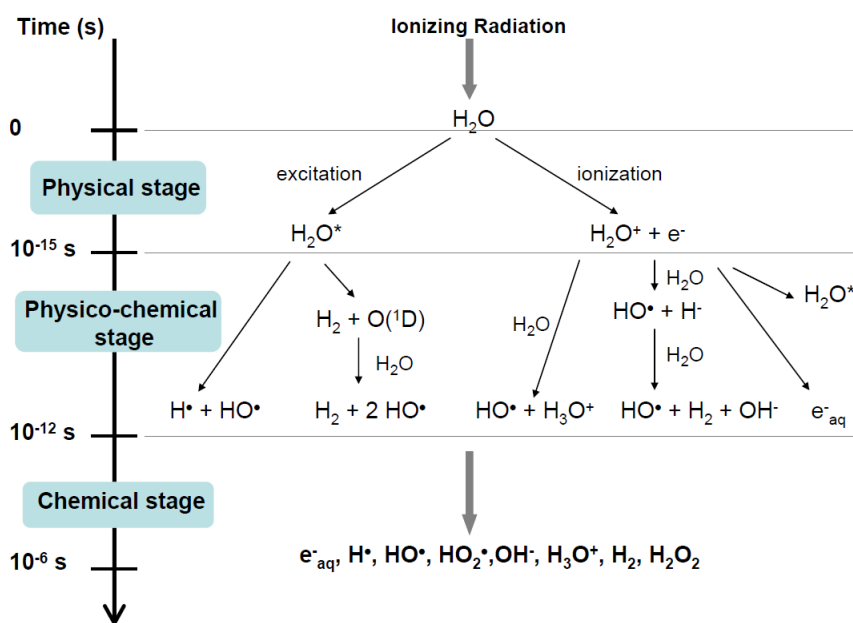


Figura 4.5: Esquema das reações que ocorrem nas três fases da radiólise da água [45].

Assim, a primeira ocorre 1 fs após a interação, do feixe primário e de partículas secundárias, com o sistema e consiste na simulação da ionização e excitação das moléculas de água, da qual resulta a formação de moléculas de água, não só ionizadas ( $\text{H}_2\text{O}^+$ ), mas também excitadas ( $\text{H}_2\text{O}^*$ ) e de eletrões ( $e^-$ ). Na segunda fase ( $10^{-15}$  a  $10^{-12}$  s), existe a produção de espécies químicas que resultam de reações entre iões e moléculas, de decaimentos radioativos e de uma auto-ionização das moléculas de água. As espécies obtidas na fase anterior, são, na terceira fase da radiólise, isto é, na fase química ( $10^{-12}$  a  $10^{-6}$  s), simuladas e vão difundir-se pelos tecidos, interagindo umas com as outras de forma a originarem novas espécies químicas.

Para simular o processo químico implementaram-se todos os parâmetros necessários, designadamente taxa de ramificação, esquemas de dissociação, taxas de reação, tipos de espécies químicas e coeficientes de difusão recorrendo ao módulo `TsEmDNAChemistryExtended`. Na tabela 4.5 estão representadas diferentes espécies químicas e os respetivos coeficientes de difusão.

Tabela 4.5: Moléculas químicas e respetivos coeficiente de difusão.

Molécula	Nome no TOPAS	D ( $10^{-9}$ m <sup>2</sup> /s) a 25 °C [46]
$e_{aq}^-$	Solvated electron	4.9
$\bullet\text{OH}$	Hydroxyl	2.2
$\text{H}\bullet$	Hydrogen	7.0
$\text{H}_3\text{O}^+$	Hydronium	9.46
$\text{H}_2$	Dyhydrogen	4.8
$\text{OH}^-$	Hydroxide	5.3
$\text{H}_2\text{O}_2$	Hydrogen peroxide	2.3
$\text{O}_2$	Oxygen	2.4
$\text{O}_2^-$	Superoxide anion	1.75
$\text{HO}_2$	HydroPeroxide	2.3
$\text{HO}_2^-$	Dioxidanide	1.4

Nesta fase da simulação, ocorrem inúmeras reações químicas, às quais correspondem, diferentes taxas de reação, conforme ilustrado na tabela 4.6.

Tabela 4.6: Reações e respetivas taxas de reação usadas no módulo `TsEmDNACHEMISTRYExtended`

Reação	Taxa de Reação ( $10^{-9}$ mole/s).
$e_{aq}^- + e_{aq}^- \rightarrow 2 OH^- + H_2$	0.647
$e_{aq}^- + \bullet OH \rightarrow OH^-$	2.953
$e_{aq}^- + H\bullet \rightarrow OH^- + H_2$	2.652
$e_{aq}^- + H_3O^+ \rightarrow H\bullet$	2.109
$e_{aq}^- + H_2O_2 \rightarrow \bullet OH + OH^-$	1.405
$\bullet OH + \bullet OH \rightarrow H_2O_2$	0.475
$\bullet OH + H\bullet \rightarrow$ Sem produto	1.438
$H\bullet + H\bullet \rightarrow H_2$	0.503
$H_3O^+ + OH^- \rightarrow$ Sem produto	11.031
$H_2 + \bullet OH \rightarrow H\bullet$	0.0045
$\bullet OH + H_2O_2 \rightarrow HO_2$	0.0023
$\bullet OH + HO_2 \rightarrow O_2$	1.0
$\bullet OH + O_2^- \rightarrow O_2 + OH^-$	0.9
$\bullet OH + HO_2^- \rightarrow HO_2 + OH^-$	0.9
$e_{aq}^- + HO_2 \rightarrow HO_2^-$	2.0
$e_{aq}^- + O_2 \rightarrow O_2^-$	1.9
$e_{aq}^- + O_2^- \rightarrow OH^- + HO_2^-$	1.3
$H\bullet + H_2O_2 \rightarrow \bullet OH$	0.01
$H\bullet + HO_2 \rightarrow H_2O_2$	2.0
$H + O_2 \rightarrow HO_2$	2.0
$H\bullet + OH^- \rightarrow e_{aq}^-$	0.002
$H\bullet + O_2^- \rightarrow HO_2^-$	2.0
$H_3O^+ + O_2^- \rightarrow HO_2$	3.0
$H_3O^+ + HO_2^- \rightarrow H_2O_2$	2.0
$HO_2 + HO_2 \rightarrow H_2O_2 + O_2$	0.000076
$HO_2 + O_2^- \rightarrow O_2 + HO_2^-$	0.0085

Para ativar o transporte paço-paço das espécies químicas, foi definido o momento de início e de fim da simulação das interações químicas e a respetiva resolução temporal nesse intervalo, sendo que a escolha destes valores está relacionada com as diferentes fases da simulação da radiólise da água. A simulação foi feita até ao instante 1000 ns em intervalos apresentados na tabela 4.7.

Tabela 4.7: Parâmetros utilizados para definir o transporte de espécies químicas.

Parâmetros	Valores
<code>ChemicalStageTransportActive</code>	True
<code>ChemicalStageTimeEnd (ns)</code>	1000.0
<code>ChemicalStageTimeStep (ns)</code>	6 0.1 1.0 3.0 10.0 100.0 1000.0

Quando utilizamos os módulos de química do Geant4-DNA, apenas se pode utilizar água como material, contudo, devido à presença de NPs de ouro é importante fazer o corte das espécies químicas, ou seja, eliminá-las da simulação quando estas interagem com o ouro. Para tal, começou-se por definir um novo material, designado por `G4_Au_MODIFIED` que vai ser utilizado como material das NPs e que apresenta a mesma densidade que o ouro. Posteriormente, através da opção `RemoveInMaterial` e `RemoveInMaterialTheseMolecules`, definiu-se que quando interagem com volumes materiais do tipo `G4_Au_MODIFIED`, as espécies químicas vão ser eliminadas. Os parâmetros que permitem este corte estão representados na tabela 4.8.

Tabela 4.8: Parâmetros utilizados para definir quando ocorre o corte de espécies químicas.

Parâmetros	Valores
s:Ch/TOPASChemistry_Extended/RemoveInMaterial	G4_Au_MODIFIED
sv:Ch/TOPASChemistry_Extended/RemoveInMaterialTheseMolecules	7 solvatedelectron hydroxyl hydrogen hydronium dyhydrogen hydrogenperoxide hydroxide
s:Ma/G4_Au_MODIFIED/CloneFromMaterial	"G4_Au"
d:Ma/G4_Au_MODIFIED/CloneWithDensity	19.32 g/cm <sup>3</sup>

## 4.2 FATOR DE AUMENTO DA DOSE E RENDIMENTOS RADIOLÍTICOS

O TOPAS apresenta diretamente os valores dos rendimentos radiolíticos, isto é, do tipo e número de espécies químicas produzidas pela deposição de 100 eV de energia, também designados por *G-values*. Estes valores são gerado na grelha temporal definida, permitindo obter a evolução da difusão destas espécies na célula.

Por outro lado, o TOPAS permite obter a energia depositada ponto-a-ponto, a partir das quais podemos calcular as doses num volume,

$$D = \frac{1}{\rho V} \sum_{i \in V} \epsilon(x_i, y_i, z_i) = \sum_{i \in V} d(x_i, y_i, z_i), \quad (4.4)$$

onde  $V$  é o volume considerado (célula, núcleo ou citoplasma),  $\rho=1 \text{ g/cm}^3$  é a densidade da água e  $\epsilon(x_i, y_i, z_i)$  é a deposição pontual de energia obtida da simulação.

A partir dos valores num volume podemos definir o fator de aumento da dose (*Dose Enhancement Fator* ou DEF,

$$DEF = \frac{D_{NP}}{D_W}, \quad (4.5)$$

onde  $D_{NP}$  é a dose na presença da NPs de Au e  $D_W$  é a dose na ausência das NP, nas mesmas condições de irradiação. Assim, para proceder a estes cálculos de forma automatizada criou-se um programa em Python para processar dos dados, de acordo com a energia depositada em cada ponto da célula, a interação que provocou essa deposição e em que sub-volume da célula ocorreu.

O DEF e os G-values foram obtidos para as diferentes concentrações NPs e para os diferentes tipos de radiação utilizados

## 4.3 MODELO DE EFEITO LOCAL

Para quantificar os efeitos biológicos provocados na célula devido à radiação vamos utilizar o modelo e efeito local ou LEM (*Local Effect Model*) [47] na sua versão mais simples. Este modelo foi desenvolvido no laboratório GSI, Darmstadt e tem sido implementado em sistemas de planeamento de tratamentos em radioterapia com prótons e iões de carbono, nomeadamente no centro HIT, Heidelberg e no CNAO, Pavia.

Este modelo assume que a inativação celular ocorre devido a eventos letais, portanto, torna-se necessário quantificá-los, não sendo importante saber a natureza bioquímica e a estrutura molecular dos mesmos. Além disso, o modelo considera desprezável a contribuição de eventos sub-letais a distâncias superiores a alguns micrómetros. A principal vantagem deste modelo é que o efeito biológico é determinado pela dose local, mas é independente do tipo de radiação primária que leva à deposição de energia na

célula. Assim, é possível aplicar este modelo tanto quando se utilizam fotões como quando se utilizam partículas carregadas como protões.

Um evento letal é caracterizado pelo número de alterações que ocorrem no ADN e o seu número médio,  $\bar{n}_X$ , quando a célula é irradiada com fotões. A distribuição do número de eventos letais é descrito por uma distribuição de Poisson e, de acordo com esta, a probabilidade de sobrevivência de uma célula  $S_X$  é dada por,

$$S_X = e^{-\bar{n}_X} \quad (4.6)$$

Na quantificação dos efeitos biológicos letais, estamos interessados na densidade de eventos no volume do núcleo,  $V_N$ , isto é,

$$\frac{\bar{n}_X}{V_N} = \frac{-\ln S_X}{V_N} \quad (4.7)$$

Assim, o número total de lesões letais produzidas pela irradiação com fotões é

$$\bar{N}_X = \int_{V_N} \frac{\bar{n}_X}{V_N} dV = \int_{V_N} \frac{-\ln S_X[d_X(x, y, z)]}{V_N} dV, \quad (4.8)$$

onde  $d_X(x, y, z) = \epsilon_X(x, y, z)/(\rho V_N)$  é a dose ponto-a-ponto produzida pelos fotões. A probabilidade de sobrevivência  $S_X$ , de um sistema celular quando irradiado com fotões é geralmente descrita através do modelo Linear Quadrático (LQ).

$$S_X(D) = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad (4.9)$$

A distribuição pontual é da dose relativamente homogénea no caso dos fotões. No caso dos protões ou iões pesados esta distribuição é altamente heterogénea. A principal suposição do LEM é que doses locais iguais devem levar a efeitos locais iguais, independentemente da qualidade da radiação. Assim para protões e iões, o número de lesões letais locais terá a mesma dependência funcional da equação 4.12. No entanto, é sabido que, para doses superiores a uma dose limiar ( $D_t$ ) de  $\sim 10$  Gy, o modelo LQ deixa de ser válido, sendo necessário introduzir um termo de correção. Desta forma, o número de lesões locais passa a ser descrita pela equação

$$\bar{n}_I(x, y, z) = -\ln S_X(d_I) = \begin{cases} \alpha d_I + \beta d_I^2, & d_I \leq D_t \\ \alpha d_I + \beta d_I^2 - S_{max}(d_I - D_t), & d_I > D_t \end{cases} \quad (4.10)$$

onde  $d_I = d_I(x, y, z)$  é a dose ponto a ponto provocada pelos protões e  $S_{max} = \alpha + 2\beta D_t$ .

Deste modo relacionamos o número total de lesões produzidas por iões com os parâmetros  $\alpha$  e  $\beta$  obtidos em estudos com fotões para diferentes tipos de células e tecidos,

$$\bar{N}_I = \int_{V_N} \frac{\bar{n}_I}{V_N} dV \quad (4.11)$$

Para conseguir calcular o número de lesões letais é necessário ter em consideração a energia depositada ponto a ponto, dentro do núcleo, que vai ser posteriormente convertida em dose locais. Deste modo, podemos calcular o número total de lesões letais,  $\bar{N}$ , através de

$$\bar{N} = \sum_{i \in V_N} \bar{n}_I(x_i, y_i, z_i) \quad (4.12)$$

Neste trabalho a análise incidu em células de glioblastomas humanos, nomeadamente as linhagens U87 e T98G que estão ser utilizadas em estudos radiobiológicos com NPs pelo grupo de radioquímica do C2TN. Para isso utilizámos os parâmetros da referência [48], que estão apresentados na tabela 4.9.

Tabela 4.9: Parâmetros  $\alpha$  e  $\beta$  das linhagens U87 e T98G usados neste trabalho [48]

<b>Linha Celular</b>	<b>Parâmetros</b>	$\alpha$ (Gy <sup>-1</sup> )	$\beta$ (Gy <sup>-2</sup> )
U87		0.017	0.019
T98G		0.050	0.018

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 VALIDAÇÃO

De forma a validar os resultados obtidos, estes foram comparados com os resultados publicados por Rudek *et al.* [22] sob condições de simulação semelhantes e também usando o programa TOPAS. A comparação dos resultados está ilustrada nos gráficos representados nas figuras 5.1a e 5.1b, onde os pontos correspondem aos resultados simulados neste trabalho e as linhas correspondem aos resultados obtidos por Rudek no caso da irradiação com fótons monoenergéticos de 50 keV, na ausência de *clustering*.

Da análise destes resultados é possível verificar que os valores de DEF têm um bom acordo e que as evoluções temporais das espécies químicas são muito semelhantes, embora os nossos resultados sejam algo inferiores no que diz respeito à produção de eletrões solvatados, hidrónio e do radical hidróxilo.

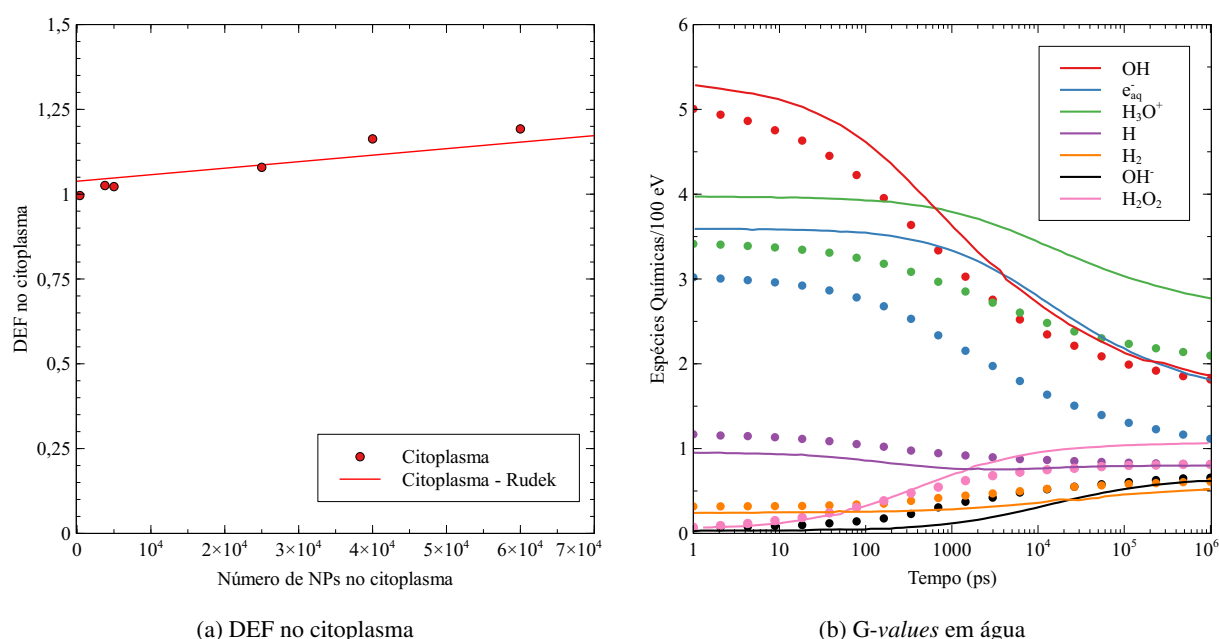


Figura 5.1: Comparação dos resultados obtidos com os resultados publicados por Rudek *et al.* [22]

### 5.2 Dose Enhancement Factor

O principal objetivo deste trabalho consiste em verificar como é que a presença de AuNPs influencia o efeito da radiação, portanto, efetuou-se o estudo do modo como o número de NPs, a sua distribuição no citoplasma e o tipo de radiação modificam o efeito radiológico da radiação. Em particular quisemos fazer estudos prospectivos para diferentes condições de irradiação (qualidades de feixe) que se pretendem utilizar em estudos de radiobiologia nos laboratórios do C2TN e do ICNAS.

Assim, numa primeira fase e, ao fazer incidir na célula, feixes de fótons com diferentes qualidades, verificou-se como é que o DEF é influenciado pelo número de NPs no sistema. Os resultados estão ilustrados nos gráficos da figura 5.2 e foram obtidos para o citoplasma (figura 5.2a), para o núcleo (figura 5.2b) e em toda a célula (figura 5.2c).

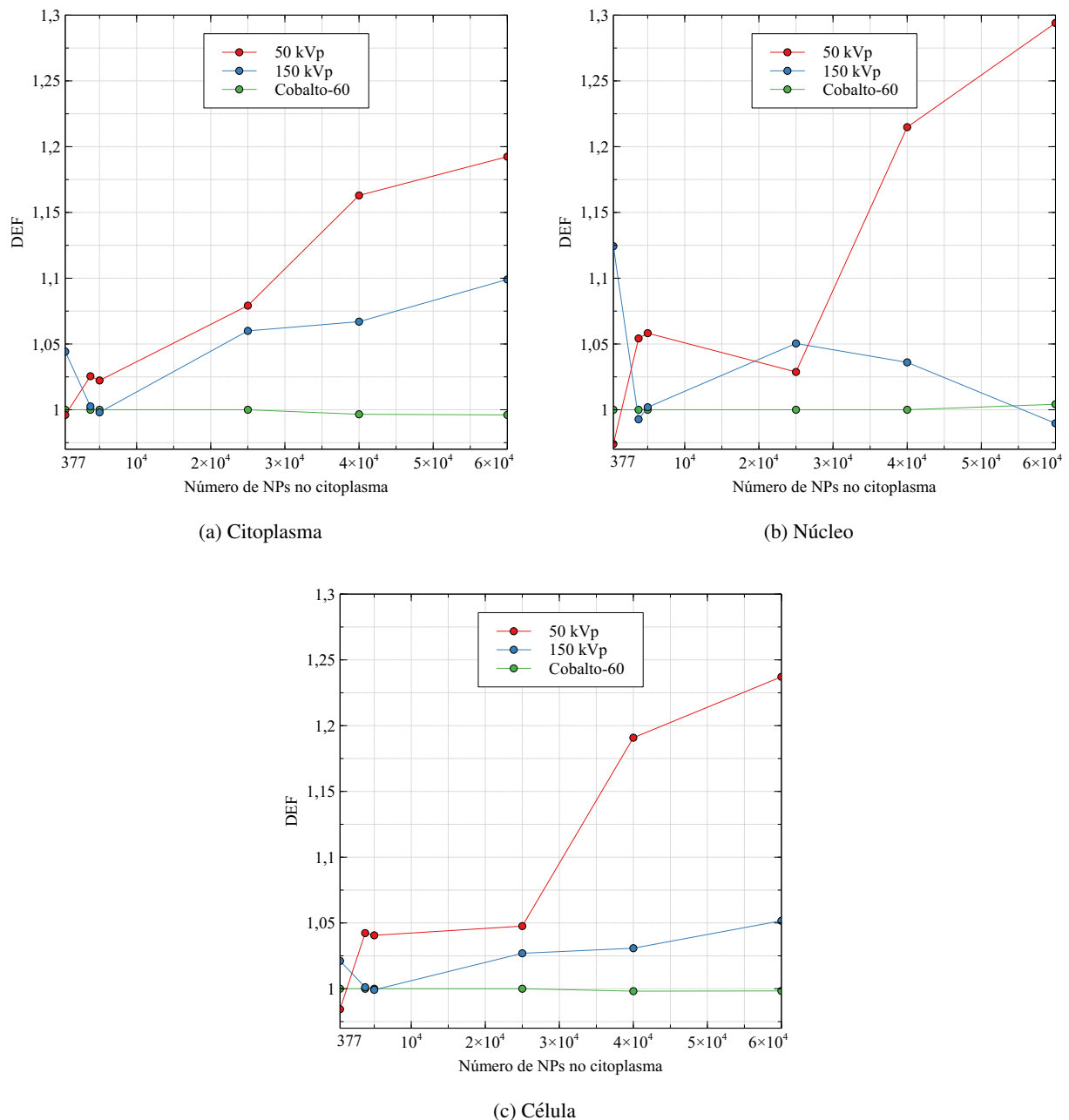


Figura 5.2: Representação gráfica do DEF obtido para diferentes concentrações de NPs no citoplasma, quando a célula é irradiada com diferentes qualidades de feixes de fótons.

Da análise dos gráficos apresentados na figura 5.2 é possível concluir que, em todos os casos, o enriquecimento do tumor com AuNPs é mais eficiente quando se utiliza radiação primária menos energética, ou seja, quando se irradia a célula com o espectro de raios-X com 50 kVp.

Na tabela 5.1 estão ilustrados os DEFs obtidos quando no citoplasma estão colocadas o número máximo de NPs simuladas, isto é, 60000 AuNPs. O valor de DEF observado no citoplasma e para a fonte de 50 kVp é de 1.19 o que representa um aumento de  $\sim 8\%$  em relação à fonte de 150 kVp e de  $\sim 17\%$  em relação à fonte de cobalto-60.

Tais resultados também são verificados quando se interpretam os valores da simulação no núcleo e na célula. No núcleo, observou-se um aumento de  $\sim 23\%$  e de  $\sim 22\%$ , quando se compara o DEF obtido com o espectro de 50 kVp, com o de 150 kVp e com a fonte de cobalto-60, respetivamente.

Por sua vez, em toda a célula, o incremento que se obtém nos valores do DEF, quando se compara o espectro de 50 kVp, com o de 150 kVp e com a fonte de cobalto-60, é de  $\sim 15\%$  e de  $\sim 19\%$ , respetivamente.

Tabela 5.1: Valor de DEF obtido para as diferentes fontes de fótons, quando no citoplasma da célula estão colocadas 60000 AuNPs.

Qualidades de feixe	DEF		
	Citoplasma	Núcleo	Célula
50 kVp	1.19	1.29	1.24
150 kVp	1.10	0.99	1.05
Cobalto-60	1.00	1.00	1.00

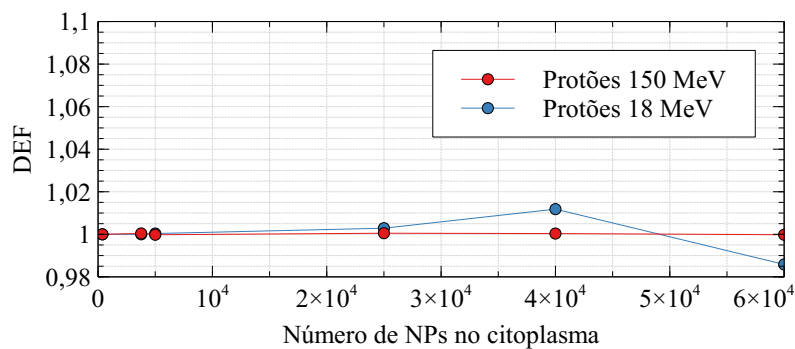
O aumento verificado deve-se ao facto de que, para energias mais baixas e para elementos com um  $Z$  elevado, como o ouro ( $Z = 78$ ), o efeito que predomina é o efeito fotoelétrico (ver figura 3.6), o que leva à produção de uma cascata de eletrões de Auger. Logo, para raios-X com 50 kVp incidentes numa célula enriquecida com AuNPs, o número de eletrões de Auger produzidos é mais significativo. Estes eletrões têm alcances muito curtos, da escala do nanómetro, pelo que a sua LET é relativamente elevado, provocando o aumento do efeito radiológico da radiação. No caso dos raios-X de 150 kVp, a interação predominante dos fótons mais energéticos da cauda do espectro com as AuNPs é o efeito de Compton, que não produz eletrões de Auger, mas dispersa eletrões com alcances maiores, da ordem dos micrómetros. Ainda assim, a componente de baixa energia desse espectro contribui para o aumento do DEF calculado, principalmente na região do citoplasma.

Já para energias mais altas, como é o caso de uma célula submetida à ação de um feixe de cobalto-60, o DEF é aproximadamente 1, para todas as concentrações de NPs no citoplasma, pois, neste caso, o efeito que predomina é o efeito de Compton e a emissão de eletrões de Auger, resultantes do efeito fotoelétrico, não é significativa. O efeito de Compton produz eletrões dispersos com alcances médios da ordem dos milímetros, isto é, maiores que as dimensões da célula, não depositando energia no seu interior.

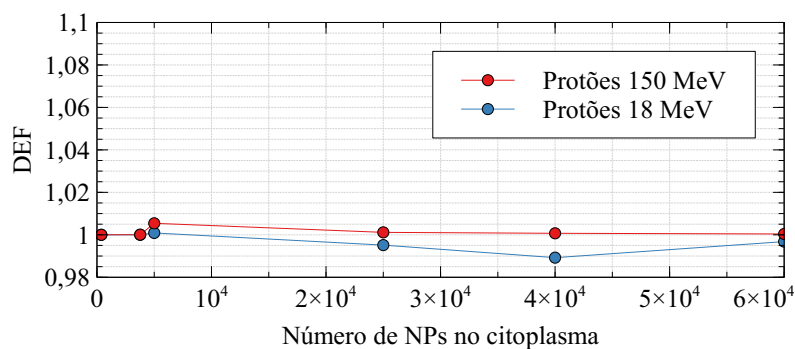
Por sua vez, quando se compara o DEF observado no citoplasma (figura 5.2a) e em toda a célula (figura 5.2c), é possível verificar que quanto maior a concentração de NPs no citoplasma, maior é o DEF, pois, a probabilidade de interação entre a radiação primária e as NPs é mais elevada e a consequente produção de partículas secundárias aumenta, com o aumento do número de NPs no citoplasma. Contudo, no caso do núcleo (figura 5.2b), quando a radiação primária é o espectro de raios-X com 50 kVp, verifica-se, que para 25000 NPs há, contrariamente ao que seria de esperar, um decréscimo no DEF. O mesmo acontece nos resultados relativos ao espectro de 150 kVp, onde, o DEF, no núcleo, volta a diminuir com o aumento do número de NPs no citoplasma. Em ambos os casos, tal pode dever-se a uma flutuação dos resultados resultante da incerteza estatística da simulação MC ou da geração aleatória da NPs no citoplasma. Note-se que no primeiro caso (50 kVp), volta a registar-se um aumento do DEF para os valores esperados e, no segundo caso (150 kVp), a diferença que se verifica é baixa e, para estas energias, o DEF está muito perto de 1.

Posteriormente, estudou-se a variação do DEF, quando a célula é irradiada por um feixe de prótons com diferentes energias, designadamente 18 MeV e 150 MeV. Os resultados estão ilustrados nos gráficos da figura 5.3 e foram obtidos, de igual modo, para o citoplasma (figura 5.3a), para o núcleo (figura 5.3b) e para toda a célula (figura 5.3c). No caso do feixe de 80 keV, os resultados não estão representados no gráfico, pois o DEF é igual 1 para todas as quantidades de nanopartículas simuladas, uma vez que a estas

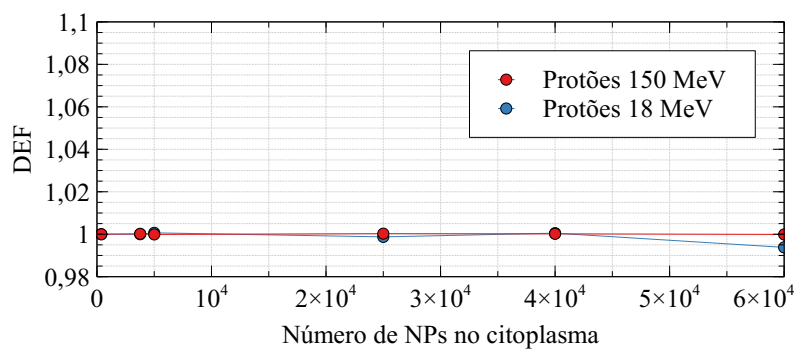
energias a interação dominante é a dispersão nuclear de Coulomb. O alcance dos prótons dispersos é de alguns nanómetros e toda a sua energia é depositada no interior de célula, mas não há produção de partículas secundárias que aumentem a dose localmente.



(a) Citoplasma



(b) Núcleo



(c) Célula

Figura 5.3: Representação gráfica do DEF obtido para diferentes concentrações de NPs, no citoplasma e para os feixes de prótons de 18 MeV e 150 MeV.

Da análise dos gráficos da figura 5.3, é possível concluir que o aumento do efeito da radiação, quando a irradiação é feita com prótons, é baixo para estas energias, pois, para todas as concentrações de NPs, o DEF é muito próximo de 1. Além disso, constata-se que ao utilizar prótons com 18 MeV ou com 150 MeV, produz praticamente o mesmo efeito, ou seja, a diferença que existe entre os valores de DEF obtidos para as duas energias é pequena. O mesmo pode ser verificado na tabela 5.2, que apresenta os valores de DEF obtidos quando o número de NPs no citoplasma é máximo.

Tabela 5.2: Valor de DEF obtido para os diferentes feixes de prótons, quando na célula estão colocadas 60000 AuNPs.

Níveis de Energia	DEF		
	Citoplasma	Núcleo	Célula
18 MeV	0.99	0.98	0.99
150 MeV	1.00	1.00	0.99

A estas energias dominam as colisões eletrónicas que produzem eletrões de elevada energia (raios- $\delta$ ) e a dispersão dos prótons com alcances superiores às dimensões de célula. Deste modo, não há a produção de partículas secundárias de alcance muito curto que depositem localmente a energia. Como dissemos as interações nucleares não estão incluídas na simulação, uma vez que as suas secções eficazes são significativamente menores do que as secções eficazes das interações eletrónicas (o poder de paragem nuclear no ouro é três ordens de grandeza inferior ao poder de paragem eletrónico a 80 keV e quatro ordens de grandeza inferior ao poder de paragem eletrónico para energias de 18 MeV e 150 MeV [49]). No entanto, poderá ser interessante investigar se algumas interações nucleares poderão contribuir para a dose depositada localmente, nomeadamente qual o efeito do recuo dos núcleos pesados. De facto, na dispersão nuclear, a energia média transferida para o núcleo é dada por,

$$\bar{E}_{tr} \approx \frac{2A}{(A+1)^2} E, \quad (5.1)$$

onde  $E$  é a energia da partícula incidente,  $\bar{E}_{tr}$  é a energia transferida para o meio e  $A \approx 197$  é a massa atómica do Au. Assim, cerca de 1% da energia inicial dos prótons poderá ser transferida para os núcleos de Au. O alcance de um núcleo de Au disperso em água é de algumas centenas de nm para energias de  $E_{tr} = 181$  keV ( $E = 18$  MeV) e  $E_{tr} = 1.5$  MeV ( $E = 150$  MeV), isto é, menor que as dimensões da célula.

Estes resultados podem ser inferidos pela análise dos gráficos que representam a deposição de energia por partícula primária apresentados nas figuras 5.4 e 5.5 para o caso dos raios-X de 50 kVp e prótons de 18 MeV, respetivamente. No caso dos raios-X a deposição de energia na célula sem NPs é mais dispersa do que no caso dos prótons. No entanto, quando adicionamos as NPs, a concentração dos pontos de deposição de energia quando irradiamos com raios-X é semelhante à irradiação com prótons, com ou sem NPs.

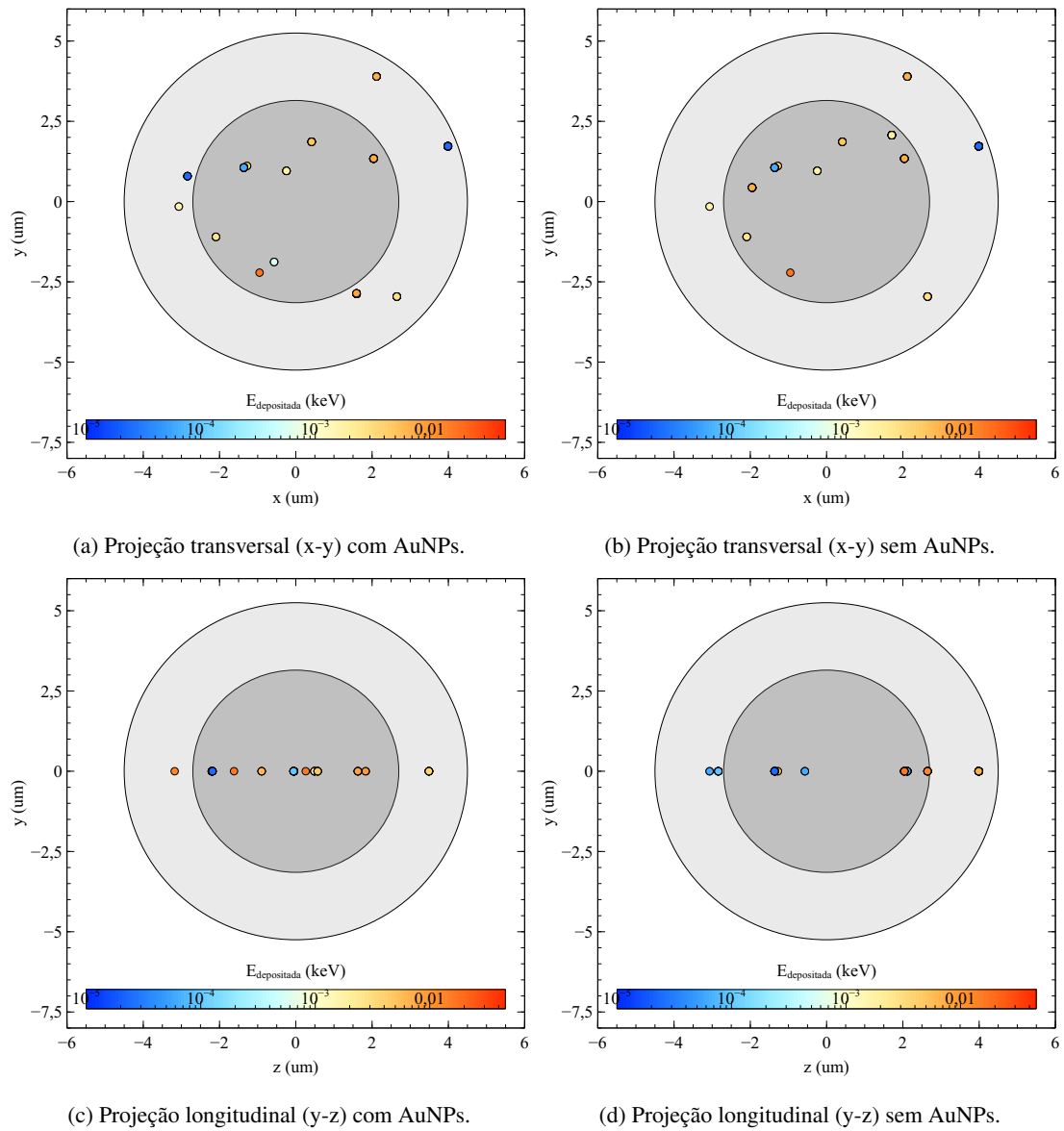


Figura 5.4: Distribuição espacial da energia depositada para um espectro de raios-X de 50 kVp.

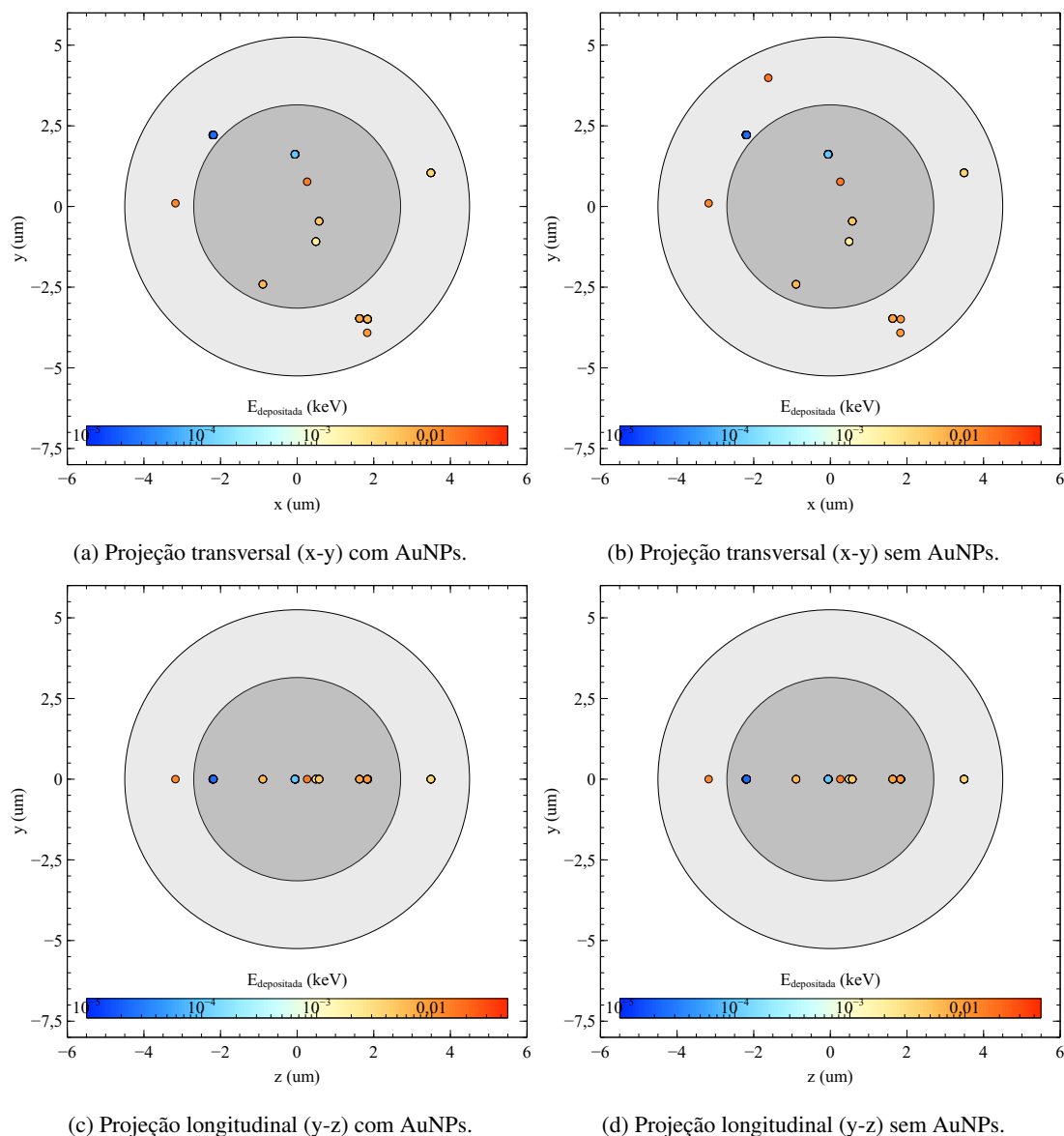


Figura 5.5: Distribuição espacial da energia depositada para um feixe de prótons de 18 MeV.

Ao procurar estudar o modo como a distribuição das NPs no citoplasma pode influenciar o efeito da radiação, foi obtido, por simulação, o DEF, para o citoplasma, considerando que as NPs estavam organizadas em clusters e não dispersas no citoplasma.

Os resultados obtidos estão representados no gráfico da figura 5.6 e verifica-se que quando se aumenta o número de NPs num cluster de 10 para 200, ocorre um aumento de 8.1%, 7.3% e 20.1% no valor de DEF, ao colocar no citoplasma diferentes números de NPs, respetivamente, 25000, 60000 e 100000. Desta forma, é possível concluir que quanto maior o número de NPs num cluster, maior é o aumento do efeito da radiação.

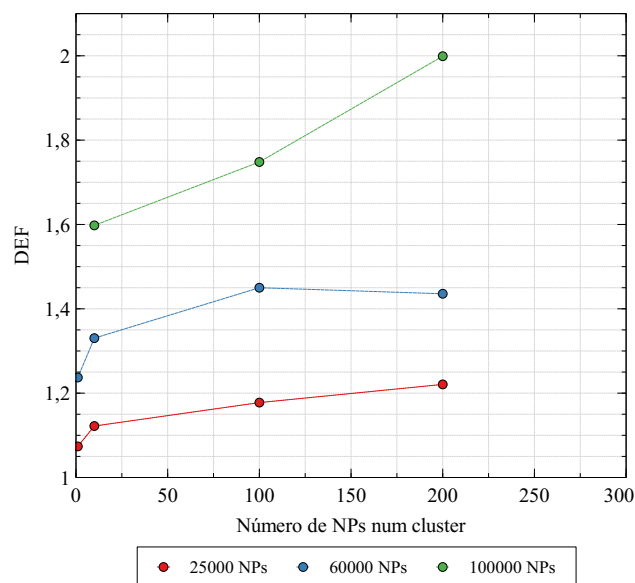


Figura 5.6: Representação gráfica do DEF obtido, quando as NPs estão agrupadas em clusters para um espectro de raios-X de 50 kVp.

### 5.3 G-values

Para estudar o efeito das NPs na radiólise da água, verificou-se como varia a produção de espécies químicas, quando dentro da célula estão presentes NPs, através da análise dos *G-values*. No gráfico da figura 5.7 estão representados os *G-values* quando uma célula, com 60000 AuNPs, é irradiada com um espectro de raios-X de 50 kVp.

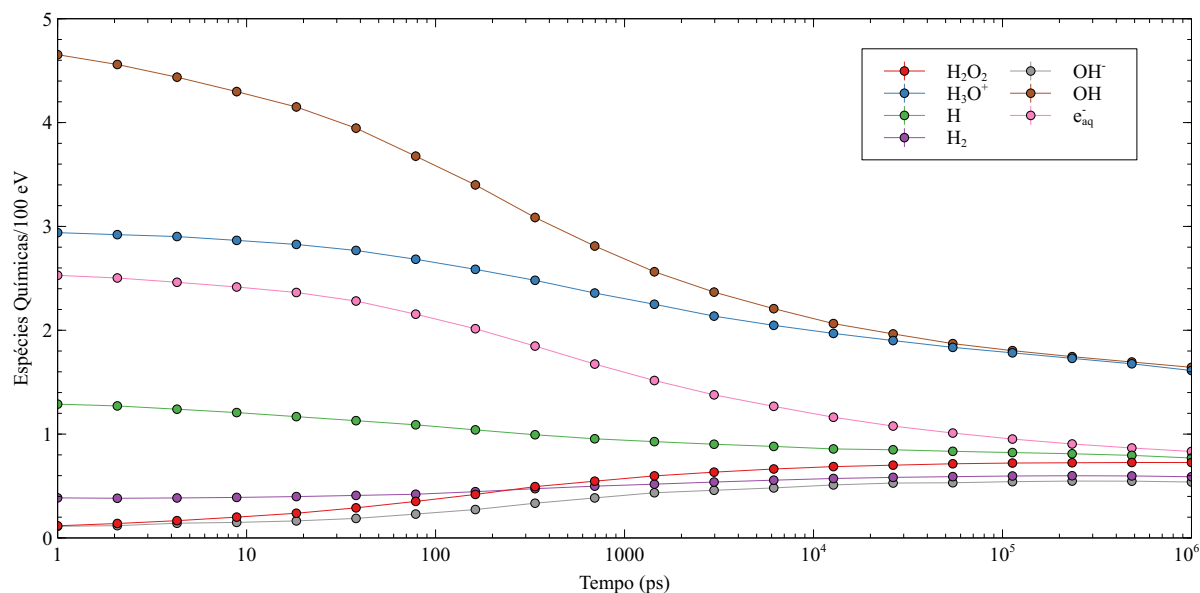


Figura 5.7: Representação gráfica dos *G-values* obtidos, quando se irradia uma célula com um espectro de raios-X de 50 kVp e quando existem, no citoplasma, 60000 AuNPs.

Da análise deste gráfico é possível verificar que as espécies OH, H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> e e<sub>aq</sub><sup>-</sup> são mais abundantes no início da fase pré-química da radiólise da água e que durante a fase química, os *G-values* destes elementos

decrecem. Por sua vez, para as restantes espécies, os *G-values* aumentam ao longo do tempo. Após os  $10^{-6}$  s, a produção de todas as espécies químicas permanece constante, porque as espécies originais já se difundiram, na célula, o suficiente para que reações químicas sejam improváveis.

O comportamento das curvas, verificado para as restantes fontes de radiação, é idêntico, contudo, a quantidade de espécies químicas produzidas depende deste parâmetro. Portanto, torna-se necessário comparar os *G-values* obtidos, quando se irradia a célula com os diferentes tipos de radiação. Para tal, apenas os resultados obtidos para as espécies  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_3\text{O}^+$ ,  $\text{OH}^-$  e  $e_{aq}^-$  vão ser comparados, pois, estas são as que maior influência têm no processo e aquelas em que, a produção está relacionada com o tipo de radiação utilizada na irradiação.

Assim, numa primeira fase, comparou-se a produção de espécies químicas quando se irradia a célula com fótons, nomeadamente com os espectros de raios-X de 50 kVp e de 150 kVp, e com o feixe de cobalto-60. Os resultados estão apresentados nos gráficos da figura 5.8 e correspondem ao caso, em que, a célula tem, no seu citoplasma, 60000 AuNPs.

As principais diferenças obtidas estão relacionadas com as espécies moleculares  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{H}_2$ , sendo que a produção destas espécies é maior quando se utiliza raios-X de 50 kVp e de 150 kVp, do que, quando se utiliza o feixe de Cobalto-60. Tal facto está relacionado com a LET da radiação. Esta variável, representa a quantidade de energia depositada localmente ao longo de um trajeto e aumenta com o decréscimo da energia das partículas. Deste modo, os raios-X de 50 kVp são os que apresentam uma LET maior, uma vez que são aqueles que tem o maior rendimento de produção de eletrões de Auger de curto alcance, seguido do espectro de raios-X com 150 kVp. O feixe de cobalto-60 apresenta uma LET muito baixo, de  $0.2 \text{ keV}/\mu\text{m}$  em água [23].

Assim, para uma radiação de maior LET, verificou-se que existe uma maior produção de espécies moleculares e uma idêntica produção de radicais. Estes resultados, aproximam-se dos que foram obtidos por Caër *et al.* [45] e permitem concluir que, quando a radiação tem uma elevada LET os radicais recombinaem-se e formam espécies moleculares com maior facilidade, comparativamente à radiação com um valor de LET menor.

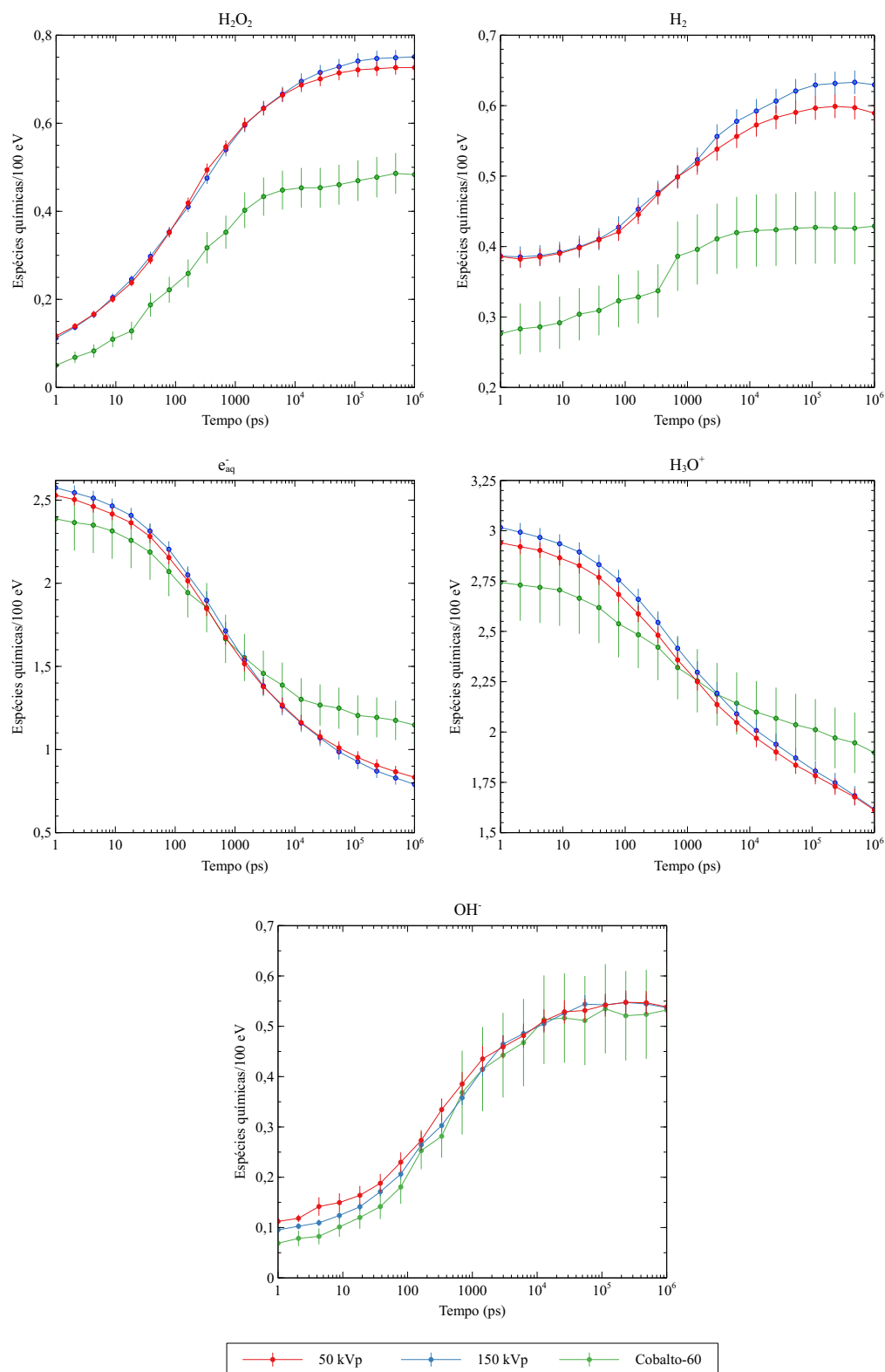


Figura 5.8: Comparação dos  $G$ -values para os diferentes fontes de fótons simuladas, quando a célula tem 60000 NPs no citoplasma.

Por sua vez, foram ainda comparados os  $G$ -values quando a célula é irradiada com os feixes de prótons de 80 keV, 18 MeV e 150 MeV. Os resultados estão representados no gráfico, presente na figura 5.9 e foram obtidos, quando na célula estão 60000 AuNPs.

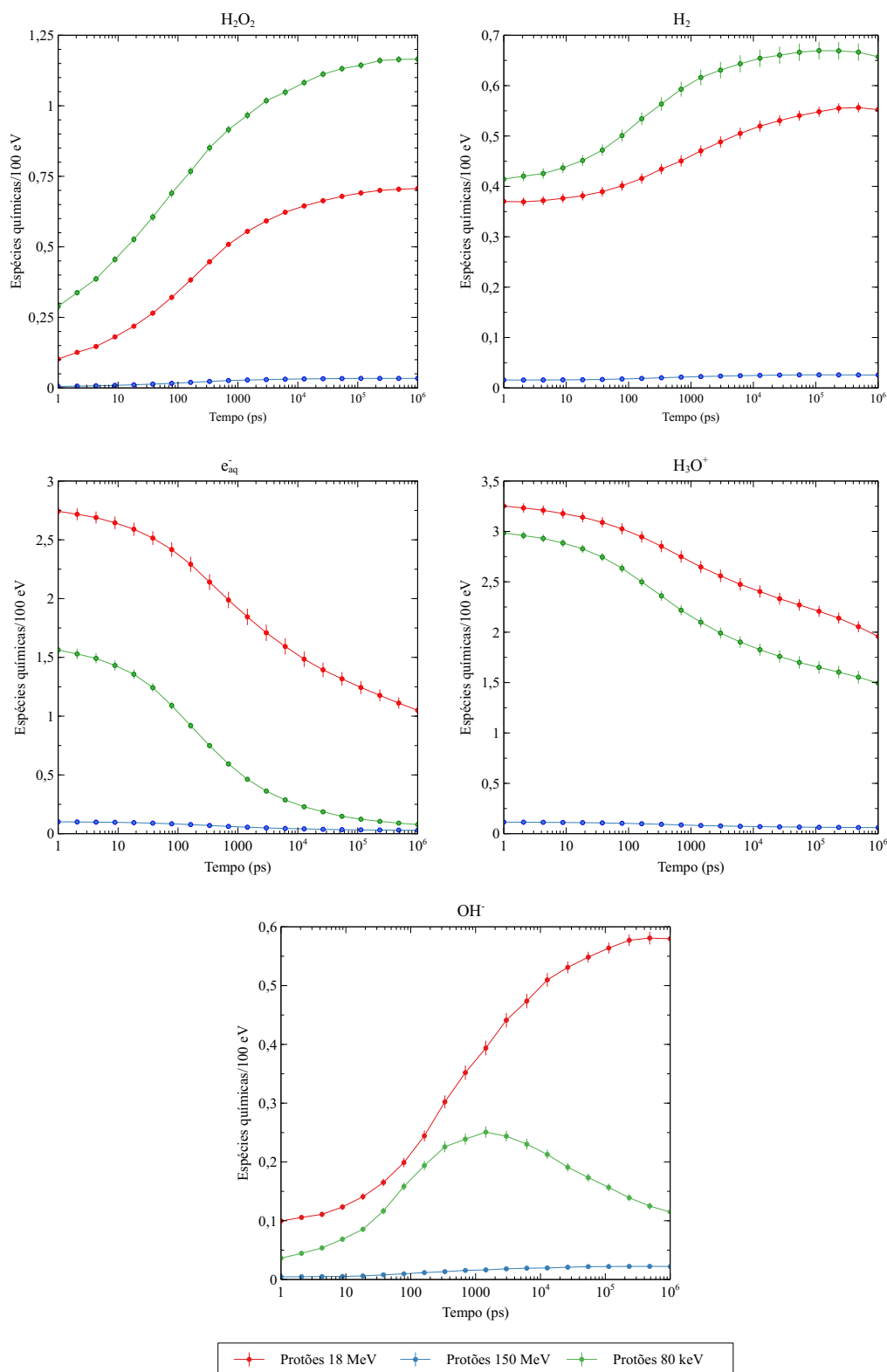
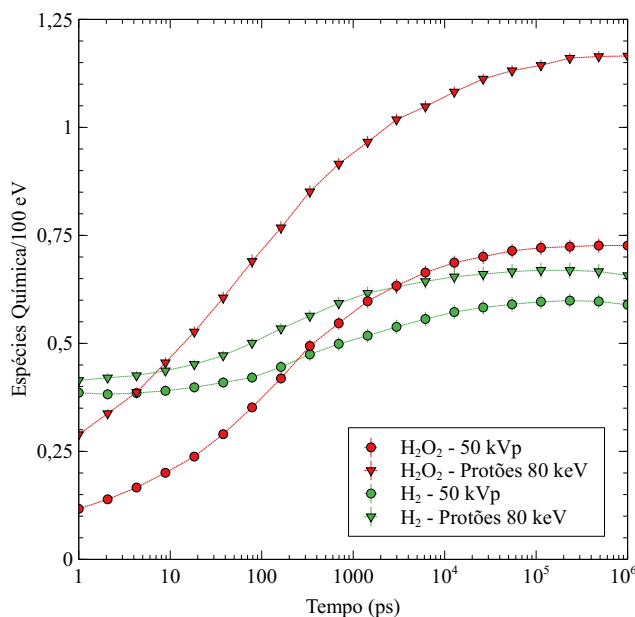


Figura 5.9: Comparação dos G-values para os diferentes feixes de prótons simulados, quando a célula tem 60000 NPs no citoplasma.

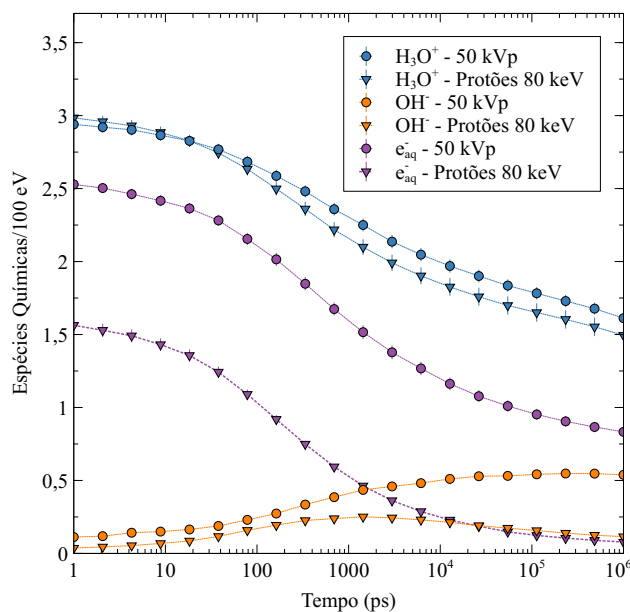
De acordo com o que foi referido anteriormente, quanto maior é a energia da radiação, menor é a sua LET. Deste modo, nas radiações, com prótons, o feixe de 80 keV é aquele que apresenta um maior valor de LET.

Da análise dos gráficos representados na figura 5.9 é possível confirmar os resultados obtidos para os fotões, ou seja, que, para radiações com uma LET elevada, a produção de espécies moleculares,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{H}_2$ , é maior do que a produção destas espécies, quando se utiliza radiação com uma LET menor.

Por fim, foram comparados os *G-values* obtidos quando se irradia a célula com o espectro de raios-X de 50 kVp e quando se irradia com protões de 80 keV. Os resultados estão ilustrados nos gráficos da figura 5.10, onde, os triângulos correspondem aos resultados obtidos quando a célula é irradiada com protões e os pontos, indicam o efeito causado pelos raios-X de 50 kVp. Optou-se por comparar estas duas fontes de radiação porque são, dentro do grupo dos fotões e dos protões, as que apresentam uma maior LET.



(a) Espécies Moleculares



(b) Radicais

Figura 5.10: Comparação dos *G-values* obtidos, quando se irradia a célula com raios-X de 50 kVp e com protões de 80 keV.

Os resultados vão ao encontro de outros já apresentados, pois a produção de espécies moleculares é maior quando se irradia a célula com o feixe de prótons de 80 keV do que com o espectro de raios-X com 50 kVp, pois o primeiro tipo de radiação apresenta uma maior LET.

#### 5.4 *Local Effect Model*

A partir da distribuição de doses locais é possível estimar o número de lesões letais utilizando modelos radiobiológicos. Neste caso aplicámos a versão simples do modelo LEM utilizando duas linhas celulares de glioblastomas multiformes, uma vez que são estas células que estão a ser estudadas no âmbito do projeto TOF-PET.

Na figura 5.11 estão representadas os fatores de aumento do número de lesões letais, isto é  $N_{NP}/N_W$ , onde  $N_{NP}$  e  $N_W$  corresponde ao número de lesões letais com e sem NPs no citoplasma, respetivamente, para prótons com energias de 18 e 150 MeV e raios-X de 50 kVp em função do número de partículas no feixe incidente. Ao contrário do DEF, esta razão não é independente da intensidade do feixe, devido à dependência em  $\beta D^2$  do modelo LQ. Para doses baixas, o termo dominante é  $\alpha D$ , pelo que para feixes com  $10^3$  partículas recuperamos o valor do DEF, que representa o valor máximo do efeito biológico das NPs.

No caso dos prótons, o efeito biológico das AuNP é desprezável qualquer que seja o número de partículas no feixe, pelas razões explicadas na secção anterior. No caso dos raios-X de 50 kVp, existe uma redução de cerca de 1 % no efeito biológico entre  $10^4$  e  $10^6$  partículas no feixe incidente. A partir deste valor, mantém-se essencialmente constante porque o modelo LQ muda de comportamento para  $D_t > 10$  Gy (ver equação 4.10).

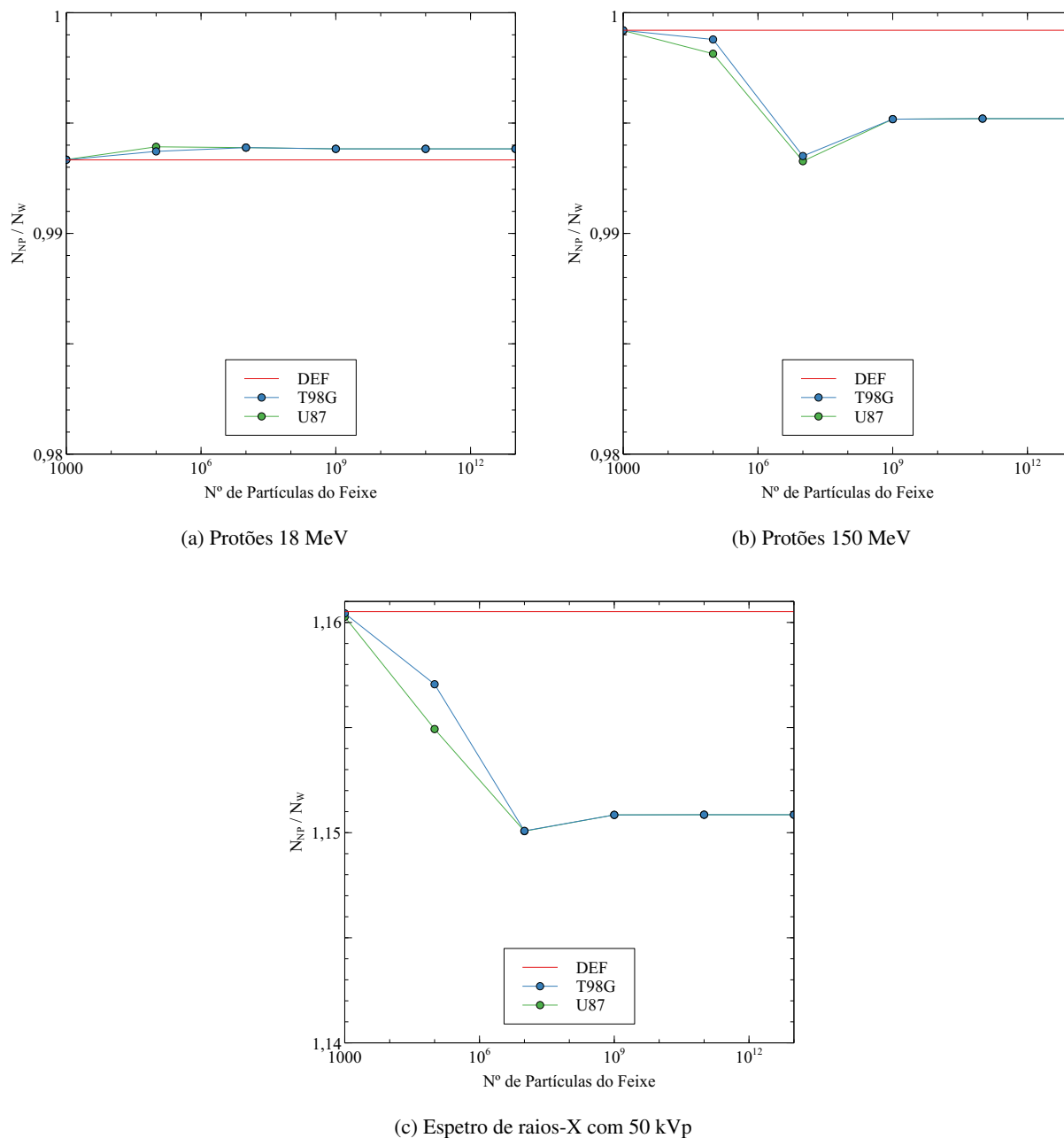


Figura 5.11: Representação gráfica do DEF e da razão entre lesões letais para as linhas celulares U87 e T98G, quando na célula estão 60000 AuNPs.

## 6 SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Neste trabalho desenvolveu-se um modelo computacional para simular os efeitos da radiação na estrutura de células, tendo-se aplicado o modelo ao estudo da radiosensibilização com AuNPs. Este estudo foi desenvolvido com simulações MC, utilizando o programa TOPAS, associadas a um modelo para estimar o número de lesões letais induzidas pela radiação. As simulações foram feitas para irradiações de um modelo simples de uma célula para diferentes qualidades de radiação, nomeadamente, raios-X, radiação gama e prótons. O número de lesões letais foi estimado através do modelo LEM que permite relacionar os efeitos biológicos entre radiações com LET diferentes e caracterizar esses efeitos para linhas celulares específicas.

Verificou-se que os efeitos biológicos são mais significativos no caso dos raios-X de 50 kVp, pois são estes que dão origem a elétrons de Auger de curto alcance que contribuem para o aumento da dose no núcleo da célula. Este efeito é tanto maior quanto maior for o número de NPs no citoplasma e aumenta significativamente quando as NPs estão aglomeradas. No caso da fonte de cobalto-60 e dos prótons de 18 e 150 MeV conclui-se que não existe um efeito significativo. No caso dos prótons poderia ainda ser interessante realizar uma simulação na região das energias de PIXE (1–4 MeV), uma vez que neste caso espera-se a produção de elétrons de Auger resultantes da desexcitação atômica.

As reações nucleares com a AuNPs não foram consideradas neste trabalho e, tanto quanto é do nosso conhecimento, também não o foram em trabalhos anteriores, nomeadamente no trabalho de do Rudek *et al.* [22]. Por exemplo, uma das reações possíveis é  $p+^{197}\text{Au} \rightarrow ^{197}\text{Hg}+n$ , que tem um limiar de produção de 1.4 MeV e uma secção eficaz máxima inferior a  $\sim 75$  mbarn entre 11-14 MeV, sendo inferior a 20 mb a 18 MeV [50]. O efeito da transferência local energia, resultante da dispersão e recuo nuclear, poderá ser ainda mais importante. Embora as secções eficazes dos processos nucleares são várias ordens de grandeza inferiores às das colisões eletrónicas, a suas contribuições para o DEF deverão ser averiguadas em simulações futuras.

É importante salientar que mesmo para fontes de energia mais elevada poderá existir um aumento da dose resultante da dispersão intercelular da radiação secundária. Como neste trabalho analisou-se apenas ao nível de uma célula, este efeito não foi considerado. Seria por isso relevante num trabalho futuro estender as simulações a geometrias representativas de colónias celulares bidimensionais e tridimensionais. Este modelo seria uma aproximação mais realista dos estudos experimentais de radiobiologia. No entanto, também se espera que o custo computacional deste tipo de simulações seja muito maior, pelo que será necessário aplicar algum tipo de estratégia de optimização dos cálculos.

Seria igualmente importante simular o caso em que as NPs estão combinadas com emissores  $\beta^-$ , como o Y-90 e o Lu-177, pois, não só se observa um aumento do efeito da radiação devido às NPs, como estes elementos vão emitir partículas secundárias, com curto alcance, contribuindo, assim, para um aumento do efeito da radiação. É essa uma das propostas no projeto TOF-PET. Além disso, ao combinar as NPs com estes elementos existe a possibilidade de guiar o tratamento através de imagem, isto, é desenvolver um procedimento teranóstico com NPs.

## REFERÊNCIAS

- [1] D. G. da Saúde, “Portugal - Doenças oncológicas em números”, *Programa Nacional para as Doenças Oncológicas*, 2015.
- [2] J. F. Hainfeld, D. N. Slatkin e H. M. Smilowitz, “The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice - IOPscience”, *Physics in Medicine Biology*, vol. 49, 2004.
- [3] J. F. Hainfeld, H. M. Smilowitz, M. J. O’Connor, F. A. Dilmanian e D. N. Slatkin, “Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice”, *Nanomedicine (Lond)*, vol. 8, n.º 10, pp. 1601–9, 2013, ISSN: 1743-5889.
- [4] A. Al Zaki, D. Joh, Z. Cheng, A. L. De Barros, G. Kao, J. Dorsey e A. Tsourkas, “Gold-loaded polymeric micelles for computed tomography-guided radiation therapy treatment and radiosensitization”, *ACS Nano*, vol. 8, n.º 1, pp. 104–12, 2014, ISSN: 1936-0851.
- [5] X.-D. Zhang, Z. Luo, J. Chen, S. Song, X. Yuan, X. Shen, H. Wang, Y. Sun, K. Gao, L. Zhang, S. Fan, D. T. Leong, M. Guo e J. Xie, “Ultrasmall Glutathione-Protected Gold Nanoclusters as Next Generation Radiotherapy Sensitizers with High Tumor Uptake and High Renal Clearance”, *Scientific Reports*, vol. 5, p. 8669, 2015, ISSN: 2045-23222045-2322.
- [6] C. McQuade, A. Al Zaki, Y. Desai, M. Vido, T. Sakhuja, Z. Cheng, R. J. Hickey, D. Joh, S. J. Park, G. Kao, J. F. Dorsey e A. Tsourkas, “A multifunctional nanoplatfor for imaging, radiotherapy, and the prediction of therapeutic response”, *Small*, vol. 11, n.º 7, pp. 834–43, 2015, ISSN: 1613-6810.
- [7] T. Wolfe, D. Chatterjee, J. Lee, J. D. Grant, S. Bhattarai, R. Taylor, G. Goodrich, P. Nicolucci e S. Krishnan, “Targeted gold nanoparticles enhance sensitization of prostate tumors to megavoltage radiation therapy in vivo”, *Nanomedicine*, vol. 11, n.º 5, pp. 1277–83, 2015, ISSN: 1549-9634.
- [8] Y. Dou, Y. Guo, X. Li, S. Wang, L. Wang, G. Lv, X. Zhang, H. Wang, X. Gong e J. Chang, “Size-Tuning Ionization To Optimize Gold Nanoparticles for Simultaneous Enhanced CT Imaging and Radiotherapy”, *ACS Nano*, vol. 10, n.º 2, pp. 2536–48, 2016, ISSN: 1936-0851.
- [9] J. K. Kim, S. J. Seo, K. H. Kim, T. J. Kim, M. H. Chung, K. R. Kim e T. K. Yang, “Therapeutic application of metallic nanoparticles combined with particle-induced x-ray emission effect”, *Nanotechnology*, vol. 21, n.º 42, p. 425 102, 2010, ISSN: 0957-4484.
- [10] J. K. Kim, S. J. Seo, H. T. Kim, K. H. Kim, M. H. Chung, K. R. Kim e S. J. Ye, “Enhanced proton treatment in mouse tumors through proton irradiated nanoradiator effects on metallic nanoparticles”, *Physics in Medicine Biology*, vol. 57, n.º 24, pp. 8309–23, 2012, ISSN: 0031-9155.
- [11] S. H. Cho, “Estimation of tumour dose enhancement due to gold nanoparticles during typical radiation treatments: a preliminary Monte Carlo study”, *Physics in Medicine and Biology*, vol. 50, n.º 15, N163–N173, 2005, ISSN: 0031-9155.
- [12] E. Lechtman, N. Chattopadhyay, Z. Cai, S. Mashouf, R. Reilly e J. P. Pignol, “Implications on clinical scenario of gold nanoparticle radiosensitization in regards to photon energy, nanoparticle size, concentration and location”, *Physics in Medicine and Biology*, vol. 56, n.º 15, pp. 4631–4647, 2011, ISSN: 0031-9155.
- [13] J. D. Carter, N. N. Cheng, Y. Q. Qu, G. D. Suarez e T. Guo, “Nanoscale energy deposition by x-ray absorbing nanostructures”, *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 111, n.º 40, pp. 11 622–11 625, 2007, ISSN: 1520-6106.

- [14] M. Douglass, E. Bezak e S. Penfold, “Monte Carlo investigation of the increased radiation deposition due to gold nanoparticles using kilovoltage and megavoltage photons in a 3D randomized cell model”, *Medical Physics*, vol. 40, n.º 7, p. 071 710, 2013, ISSN: 0094-2405.
- [15] D. Brivio, P. Zygmanski, M. Arnoldussen, J. Hanlon, E. Chell, E. Sajo, G. M. Makrigiorgos e W. Ngwa, “Kilovoltage radiosurgery with gold nanoparticles for neovascular age-related macular degeneration (AMD): a Monte Carlo evaluation”, *Physics in Medicine Biology*, vol. 60, n.º 24, pp. 9203–13, 2015, ISSN: 0031-9155.
- [16] C. Wälzlein, E. Scifoni, M. Kramer e M. Durante, “Simulations of dose enhancement for heavy atom nanoparticles irradiated by protons”, *Physics in Medicine Biology*, vol. 59, n.º 6, pp. 1441–58, 2014, ISSN: 0031-9155.
- [17] C. Sicard-Roselli, E. Brun, M. Gilles, G. Baldacchino, C. Kelsey, H. McQuaid, C. Polin, N. Wardlow e F. Currell, “A new mechanism for hydroxyl radical production in irradiated nanoparticle solutions”, *Small*, vol. 10, n.º 16, pp. 3338–46, 2014, ISSN: 1613-6810.
- [18] Y. Lin, S. J. McMahon, M. Scarpelli, H. Paganetti e J. Schuemann, “Comparing gold nano-particle enhanced radiotherapy with protons, megavoltage photons and kilovoltage photons: a Monte Carlo simulation”, *Physics in Medicine Biology*, vol. 59, n.º 24, pp. 7675–89, 2014, ISSN: 0031-9155.
- [19] J. Cho, C. Gonzalez-Lepera, N. Manohar, M. Kerr, S. Krishnan e S. H. Cho, “Quantitative investigation of physical factors contributing to gold nanoparticle-mediated proton dose enhancement”, *Physics in Medicine Biology*, vol. 61, n.º 6, pp. 2562–81, 2016, ISSN: 0031-9155.
- [20] I. Martinez-Rovira e Y. Prezado, “Evaluation of the local dose enhancement in the combination of proton therapy and nanoparticles”, *Medical Physics*, vol. 42, n.º 11, pp. 6703–10, 2015, ISSN: 0094-2405.
- [21] H. N. Tran, M. Karamitros, V. N. Ivanchenko, S. Guatelli, S. McKinnon, K. Murakami, T. Sasaki, S. Okada, M. C. Bordage, Z. Francis, Z. El Bitar, M. A. Bernal, J. I. Shin, S. B. Lee, P. Barberet, T. T. Tran, J. M. C. Brown, T. V. N. Hao e S. Incerti, “Geant4 Monte Carlo simulation of absorbed dose and radiolysis yields enhancement from a gold nanoparticle under MeV proton irradiation”, *Nuclear Instruments Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms*, vol. 373, pp. 126–139, 2016, ISSN: 0168-583X.
- [22] B. Rudek, A. McNamara, J. Ramos-Mendez, H. Byrne, Z. Kuncic e J. Schuemann, “Radio-enhancement by gold nanoparticles and their impact on water radiolysis for x-ray, proton and carbon-ion beams”, *Physics in Medicine and Biology*, vol. 64, n.º 17, p. 12, 2019, ISSN: 0031-9155.
- [23] H. Murshed, *Fundamentals of Radiation Oncology*, 3rd Edition. 2019, p. 746.
- [24] G. Choppin, J.-O. Liljenzin, J. Rydberg e C. Ekberg, *Radiochemistry and Nuclear Chemistry*, 4th Edition. 2013.
- [25] M. Morgan, R. Haken e T. Lawrence, “Essentials of Radiation Therapy”, *Fastest Oncology and Hematology Insight Engine*,
- [26] J. S. Tobias e D. Hochhauser, *Cancer and its Management*. Oxford, UK, 2014.
- [27] W. H. Organization, *Cancer*, Acedido: 2019-11-05. URL: <http://web.archive.org/web/20080207010024/http://www.808multimedia.com/winnt/kernel.htm>.
- [28] D. A. Jaffray e M. K. Gospodarowicz, *Radiation Therapy for Cancer*, 3rd Edition. 2015, vol. 3, pp. 239–247.

- [29] K. Langen e M. Minesh, “Proton Beam Therapy Basics”, *Journal of the American College of Radiology*, 2015.
- [30] W. D. Newhauser, A. B. de Gonzalez, R. Schulte e C. Lee, “A Review of Radiotherapy-Induced Late Effects Research after Advanced Technology Treatments”, *Frontiers in Oncology*, vol. 6, 2016, ISSN: 2234-943X.
- [31] S. Lacombe, E. Porcel e E. Scifoni, “Particle therapy and nanomedicine: state of art and research perspectives”, *Cancer Nanotechnol*, vol. 8, n.º 1, p. 9, 2017, ISSN: 1868-6958 (Print)1868-6958.
- [32] Z. Kuncic e S. Lacombe, “Nanoparticle radio-enhancement: principles, progress and application to cancer treatment”, *Physics in Medicine Biology*, vol. 63, n.º 2, 02tr01, 2018, ISSN: 0031-9155.
- [33] K. Haume, S. Rosa, S. Grellet, M. A. Śmiałek, K. T. Butterworth, A. V. Solov’yov, K. M. Prise, J. Golding e N. J. Mason, “Gold nanoparticles for cancer radiotherapy: a review”, *Cancer Nanotechnology*, vol. 7, 2016.
- [34] G. F. Knoll, *Radiation Detection and Measurement, 4th Edition*. 2010, p. 864.
- [35] F. Silva, A. Zambre, M. P. C. Campello, L. Gano, I. Santos, A. M. Ferraria, M. J. Ferreira, A. Singh, A. Upendran, A. Paulo e R. Kannan, “Interrogating the Role of Receptor-Mediated Mechanisms: Biological Fate of Peptide-Functionalized Radiolabeled Gold Nanoparticles in Tumor Mice”, *Bioconjugate Chemistry*, vol. 27, n.º 4, pp. 1153–1164, 2016, ISSN: 1043-1802.
- [36] F. Silva, “Multifunctional Gold Nanoparticles for Targeted Theranostics”, 2017, URL: <http://c2tn.tecnico.ulisboa.pt/index.php/75-workshops-conferences/1st-c2tn-workshop/365-poster-presentations>.
- [37] H. Zaidi, *Therapeutic Applications of Monte Carlo Calculations in Nuclear Medicine*. 2003. URL: <https://www.crcpress.com/Therapeutic-Applications-of-Monte-Carlo-Calculations-in-Nuclear-Medicine/Zaidi-Sgouros/p/book/9780750308168>.
- [38] L. Brualla, M. Rodriguez e A. M. Lallena, “Monte Carlo systems used for treatment planning and dose verification”, *Strahlenther Onkol*, vol. 193, n.º 4, pp. 243–259, 2017, ISSN: 0179-7158.
- [39] J. F. Briesmeister, “MCNP: A General Monte Carlo N-Particle Transport Code”, n.º LA-13709-M, 2003. URL: <http://inspirehep.net/record/1382884/files/tr.pdf>.
- [40] J. Perl, J. Shin, J. Schumann, B. Faddegon e H. Paganetti, “TOPAS: an innovative proton Monte Carlo platform for research and clinical applications”, *Medical Physics*, vol. 39, n.º 11, pp. 6818–37, 2012, ISSN: 0094-2405 (Print)0094-2405.
- [41] J. Schuemann, A. L. McNamara, J. Ramos-Mendez, J. Perl, K. D. Held, H. Paganetti, S. Incerti e B. Faddegon, “TOPAS-nBio: An Extension to the TOPAS Simulation Toolkit for Cellular and Sub-cellular Radiobiology”, *Radiation Research*, vol. 191, n.º 2, pp. 125–138, 2019, ISSN: 0033-7587.
- [42] S. Agostinelli, “GEANT4 - a simulation toolkit”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*, vol. 506, p. 53, 2003.
- [43] G. Poludniowski, G. Landry, F. DeBlois, P. M. Evans e F. Verhaegen, “SpekCalc: a program to calculate photon spectra from tungsten anode x-ray tubes”, *Physics in Medicine and Biology*, vol. 54, n.º 19, N433–N438, 2009, ISSN: 0031-9155.

- [44] M. Bardies, M. C. Bordage, C. Champion, S. Incerti e D. N. A. C. Geant, “The Geant4-DNA project”, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, vol. 39, S317–S318, 2012, ISSN: 1619-7070.
- [45] S. Le Caër, “Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H<sub>2</sub> Production under Ionizing Radiation”, *Water*, vol. 3, n.º 1, pp. 235–253, 2011, ISSN: 2073-4441.
- [46] J. Ramos-Mendez, J. Perl, J. Schuemann, A. McNamara, H. Paganetti e B. Faddegon, “Monte Carlo simulation of chemistry following radiolysis with TOPAS-nBio”, *Physics in Medicine and Biology*, vol. 63, n.º 10, 2018, ISSN: 0031-9155.
- [47] M. Scholz e G. Kraft, “The physical and radiobiological basis of the local effect model: A response to the commentary by R Katz”, *Radiation Research*, vol. 161, n.º 5, pp. 612–620, 2004, ISSN: 0033-7587.
- [48] D. Dionysiou, G. Stamatakos, D. Gintides, N. Uzunoglu e K. Kyriaki, “Critical Parameters Determining Standard Radiotherapy Treatment Outcome for Glioblastoma Multiforme: A Computer Simulation”, *The Open Biomedical Engineering Journal*, vol. 2, n.º 1, pp. 43–51, 2008, ISSN: 1874-1207.
- [49] M. J. Berger, J. S. Coursey, M. A. Zucker e J. Chang, *NIST Standard Reference Database 124: Stopping-Power Range Tables for Electrons, Protons, and Helium Ions*, Acedido: 2020-11-02. URL: <https://www.nist.gov/pml/stopping-power-range-tables-electrons-protons-and-helium-ions>.
- [50] E. K. Elmaghraby, K. F. Hassan, H. Omara e Z. A. Saleh, “Production of the mercury-197 through proton induced reaction on gold”, *Applied Radiation and Isotopes*, vol. 68, n.º 9, pp. 1694–1698, 2010.