



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Diana Pereira Gonçalves

**SUSCETIBILIDADE DOS INDIVÍDUOS PORTADORES DE  
MUTAÇÕES *BRCA1/2* À RADIAÇÃO DE DIAGNÓSTICO**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Engenharia Biomédica orientada pela Professora Doutora Ana Margarida Coelho Abrantes e coorientada pela Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia.

setembro de 2022





UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**

Diana Pereira Gonçalves

**SUSCETIBILIDADE DOS INDIVÍDUOS PORTADORES DE  
MUTAÇÕES *BRCA1/2* À RADIAÇÃO DE DIAGNÓSTICO**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Engenharia Biomédica orientada pela Professora Doutora Ana Margarida Coelho Abrantes e coorientada pela Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia.

setembro de 2022



Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.



*“O que impede de saber não são nem o tempo nem a inteligência, mas  
somente a falta de curiosidade.”*

**AGOSTINHO DA SILVA**



# Agradecimentos

O término desta bonita etapa não seria possível unicamente com o esforço individual, mas sim graças a uma equipa multidisciplinar, da qual me orgulho de fazer parte. Não podia deixar de prestar os meus agradecimentos às múltiplas pessoas e instituições que, das mais diversas formas, me ensinaram, inspiraram e apoiaram, contribuindo direta ou indiretamente para a concretização desta dissertação.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e diretora do Instituto de Biofísica desta mesma instituição, obrigada pela oportunidade de realizar esta dissertação no Instituto e por me ter acolhido na sua equipa. Agradeço também toda a partilha do conhecimento e experiência científica ao longo deste ano, assim como todas as críticas e conselhos na revisão deste manuscrito.

À Professora Doutora Ana Margarida Abrantes, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e orientadora desta dissertação, obrigada por ter aceite, desde início, o desafio de me orientar. Agradeço todo o apoio, companheirismo, confiança em mim depositada e, acima de tudo, pela enorme paciência demonstrada ao longo deste último ano. Agradeço também por toda a partilha de conhecimento e por todas as críticas construtivas e ajuda na revisão deste manuscrito. Foi um enorme prazer trabalhar e aprender consigo. A sua dedicação e paixão pelo seu trabalho são uma grande fonte de inspiração.

À Professora Doutora Ana Salomé Pires Lourenço, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, obrigada pela ajuda na análise estatística, pela disponibilidade ao longo do ano e por toda a simpatia.

À Doutora Gabriela Sousa, diretora do serviço de Oncologia Médica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, obrigada por toda a colaboração na identificação dos indivíduos analisados neste trabalho. Foi um trabalho árduo, mas, com a sua ajuda e empenho em tudo o que faz, tudo se tornou possível.

À Professora Doutora Isabel Correia, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e diretora do Laboratório de Citogenética e Genómica desta mesma

instituição, assim como à Dra. Patrícia Paiva, ao Dr. Nuno Lavoura e à Dra. Ana Jardim, um enorme obrigada pela colaboração na formação das linhas celulares utilizadas, na extração de DNA e na execução do ensaio de cromossomas dicêntricos. Toda a vossa ajuda foi crucial para a concretização deste projeto.

Ao Professor Doutor Filipe Caseiro Alves, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e Diretor Clínico do Hospital da Luz de Coimbra, obrigada pela disponibilidade do serviço de Radiologia para a irradiação das amostras e pela colaboração no projeto.

À Professora Doutora Joana Santos, Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, obrigada pela colaboração na irradiação das amostras que fizeram parte da presente dissertação, assim como pela cedência do fantoma utilizado.

À Doutora Maria Margarida Leonor, diretora do serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, obrigada pela disponibilidade deste serviço para a irradiação das amostras com doses empregues em radioterapia. Ainda, ao Eng. Paulo Rachinhas e ao Eng. Paulo César Simões, obrigada pela colaboração na irradiação.

À Mestre Inês Marques, obrigada por seres uma pessoa incansável, pelo apoio nos momentos mais difíceis, pela disponibilidade permanente em todas as fases do projeto, por toda a paciência e por toda a partilha de conhecimento e experiência. Certamente são ensinamentos que irei guardar para sempre. Acima de tudo, por toda a simpatia e amizade, muito obrigada.

Aos alunos de Mestrado e de Doutoramento do Instituto de Biofísica, obrigada por toda a ajuda, amizade, preocupação, partilha de conhecimento e pela tranquilidade que me passaram nos momentos de maior dificuldade.

À Mestre Inês Gomes, muito obrigada por toda a ajuda, partilha de conhecimento e preocupação na fase inicial do projeto.

Não posso deixar de agradecer às minhas colegas de faculdade que me acompanharam durante estes loucos cinco anos. Obrigada por todos os momentos fantásticos que vivenciámos, por todas as palavras que surgiram no momento certo e pela bonita amizade que se criou. Às Joanas e à Filipa, por estarem comigo desde o primeiro dia, obrigada! À Carolina e à Mariana, por todo o apoio neste último ano, obrigada! Sem vocês por perto, teria sido muito mais difícil.

À minha grande e eterna amiga Margarida, obrigada por teres tornado estes anos muito mais fáceis. Obrigada pelos abraços de conforto cada vez que quis desistir e por entenderes sempre o meu lado. Obrigada pela nossa bonita amizade e por todas as lágrimas partilhadas. Se consegui hoje chegar aqui, foi também graças a ti.

À minha prima e amiga Beatriz, obrigada por nunca me teres deixado cair. Obrigada por todo o apoio, por todas as palavras que apareceram no momento certo, por partilhares comigo as minhas preocupações, mas também todos os momentos de felicidade.

Às pessoas que o mestrado se encarregou de colocar no meu caminho, Inês, muito obrigada por partilhares este último ano comigo. Certamente será uma amizade para a vida.

Ao Daniel, agradeço todo o amor e segurança demonstrados ao longo desta fase bastante agitada da minha vida. Obrigada pela enorme paciência, pelo carinho, pela amizade, pelo apoio incondicional e por estares sempre presente. Obrigada por seres quem és e por me arrancares sempre o maior dos sorrisos. Que continues por muitos e muitos anos a meu lado.

À minha irmã, aquela que, para mim, será sempre a minha grande fonte de inspiração, obrigada por todo o apoio, pelas palavras, por nunca me teres deixado desistir e acreditares que isto seria possível. A tua dedicação e paixão pelo que fazes são uma fonte de inspiração. És um orgulho.

Aos meus sobrinhos, Maria e Manel, obrigada por, mesmo sem saberem, tornarem sempre tudo mais fácil e alegrarem sempre o meu dia.

Um agradecimento especial aos meus pais, Sara e Paulo, as pessoas mais importantes da minha vida, por me terem proporcionado tudo isto. Um obrigada do tamanho do mundo por todos os valores que me transmitiram, os quais me tornaram na pessoa que sou hoje, pelo apoio incondicional, por todos os conselhos e por todo o sacrifício. Obrigada por nunca terem desistido de mim e por suportarem as minhas escolhas. Sei que nem sempre foi fácil. Este é o meu sonho, mas também é o vosso e, sem vocês, nada disto teria sido possível. É um orgulho gigante poder dizer que sou vossa filha. Amo-vos com todo o meu coração.

A toda a minha família, a melhor que poderia ter, e aos meus amigos que mesmo à distância estiveram sempre comigo, muito obrigada.

Por último, aos que fisicamente já não se encontram cá, mas que para sempre permanecerão na minha memória. Tenho a certeza de que estão orgulhosos.

A todos vós um bem-haja.

# Resumo

**Introdução:** A síndrome hereditária de cancro da mama e ovário (SHCMO) é, maioritariamente, causada por mutações autossómicas dominantes nos genes supressores tumorais *BRCA1 DNA repair associated gene (BRCA1)* e *BRCA2 DNA repair associated gene (BRCA2)*. Esta condição genética determina que os indivíduos apresentam uma maior suscetibilidade de desenvolvimento de diferentes tipos de cancro, comparativamente à população em geral, nomeadamente cancro da mama e cancro do ovário, assim como cancro da próstata, cancro do pâncreas e melanoma, embora estes últimos sejam menos frequentes. Considerando o risco aumentado de desenvolver cancro, os indivíduos portadores destas mutações têm um plano de seguimento clínico apertado para a sua deteção precoce, baseado principalmente em técnicas imagiológicas de diagnóstico que implicam a exposição a radiação ionizante. Apesar do benefício destes exames, têm sido levantadas questões relativas à sensibilidade de indivíduos com SHCMO à radiação ionizante e o impacto que pode conferir na suscetibilidade ao desenvolvimento de determinadas neoplasias.

**Objetivo:** Avaliar a radiosensibilidade e os possíveis efeitos biológicos quando indivíduos portadores de mutações no gene *BRCA2* são expostos a radiação ionizante com origem em procedimentos imagiológicos de diagnóstico, comparativamente a não portadores, pertencentes a famílias diagnosticadas com SHCMO.

**Materiais e Métodos:** Linhas celulares linfoblastoides (LCLs) de indivíduos caracterizados geneticamente com mutação no gene *BRCA2* ou de não portadores pertencentes a famílias com a síndrome foram incluídas neste estudo. As linhas celulares foram obtidas a partir da infeção de células mononucleares do sangue periférico destes indivíduos com o vírus Epstein-Barr. Em seguida, as LCLs foram irradiadas, semanalmente, com doses de radiação correspondentes a CT lombar, durante 4 semanas, obtendo uma dose efetiva cumulativa de radiação ionizante de 108,76 mSv (27,19 mSv/semana), ou com uma dose efetiva única de 2 Sv. Ensaios radiobiológicos foram realizados para analisar a atividade metabólica (ensaio do XTT), a viabilidade celular e tipos de morte celular (citometria de fluxo) e a genotoxicidade (ensaio de micronúcleos e ensaio de cromossomas dicêntricos).

**Resultados:** No presente estudo, 15 LCLs foram obtidas e mantidas em cultura com posterior realização do protocolo correspondente à exposição a radiação ionizante, assim como o ensaio

do XTT, a citometria de fluxo e os ensaios de micronúcleos e de cromossomas dicêntricos. No ensaio do XTT, após a exposição cumulativa a radiação, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na atividade metabólica entre o grupo de portadores e o indivíduo não portador para as diferentes semanas de irradiação. Adicionalmente, a dose efetiva de 2 Sv não foi suficiente para que ocorresse uma diminuição considerável no metabolismo celular. Relativamente à citometria de fluxo, realizada após a exposição cumulativa, no grupo de portadores observou-se uma redução na percentagem de células viáveis comparativamente ao indivíduo não portador, com um aumento paralelo na percentagem de células em apoptose tardia/necrose. Por fim, a genotoxicidade foi avaliada através do ensaio de cromossomas dicêntricos, para a exposição cumulativa a radiação, e através do ensaio de micronúcleos, para a dose efetiva de 2 Sv. Para o primeiro ensaio, não foi observada a formação de cromossomas dicêntricos. Já para o ensaio de micronúcleos, com bloqueio da citocinese, não foi possível avaliar a genotoxicidade por não se ter conseguido obter células binucleadas com um citoplasma bem definido que permitissem a contagem de micronúcleos.

**Discussão:** Os resultados obtidos, na sua maioria, contrariam os resultados esperados, nomeadamente em relação às amostras irradiadas com uma dose elevada, correspondente a 2 Sv. Nestas condições, seria expectável que se observasse uma redução na atividade metabólica, assim como a formação de micronúcleos. No entanto, mais experiências deverão ser realizadas e a amostra aumentada com o objetivo de esclarecer os efeitos relacionados com a exposição a radiação ionizante, o que indicará as consequências da realização de diversos procedimentos imagiológicos ao longo da vida.

**Conclusão:** Tendo em conta as condições avaliadas, não foi possível validar se existe, de facto, um aumento da radiosensibilidade em indivíduos portadores de mutações no gene *BRCA2*, comparativamente a não portadores, sendo sugeridas alterações no protocolo, nomeadamente relativamente ao número de irradiações realizado.

# Abstract

**Introduction:** Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome is mostly caused by autosomal dominant mutations in the tumor suppressor genes *BRCA1 DNA repair associated gene (BRCA1)* and *BRCA2 DNA repair associated gene (BRCA2)*. This genetic condition determines that individuals have a greater susceptibility to developing different types of cancer, compared to the general population, namely breast and ovarian cancers, as well as prostate cancer, pancreatic cancer, and melanoma, although the latter are less frequent. Considering the risk of developing cancer, carriers of these mutations have a tight clinical follow-up plan for their early detection, based mainly on diagnostic imaging techniques that involve exposure to ionizing radiation. Despite the benefit of these exams, questions have been raised regarding the sensitivity of individuals with this syndrome to ionizing radiation and the impact it may have on the susceptibility to the development of certain neoplasms.

**Aim:** To evaluate the radiosensitivity and possible biological effects for individuals carrying mutations in the *BRCA2* gene exposed to ionizing radiation originating from diagnostic imaging procedures, compared to non-carriers belonging to families diagnosed with HBOC syndrome.

**Materials and Methods:** Lymphoblastoid cell lines (LCLs) from genetically characterized individuals with *BRCA2* gene mutation or from non-carriers belonging to families with the syndrome were included in this study. The cell lines were obtained from the infection of peripheral blood mononuclear cells from these individuals with the Epstein-Barr virus. Then, LCLs were irradiated weekly with radiation doses corresponding to lumbar CT for 4 weeks, obtaining a cumulative effective dose of ionizing radiation of 108.76 mSv (27.19 mSv/week), or with an effective dose of 2 Sv. Radiobiological assays were performed to analyze metabolic activity (XTT assay), cell viability and types of cell death (flow cytometry) and genotoxicity (micronucleus assay and dicentric chromosome assay).

**Results:** In the present study, 15 LCLs were obtained and maintained in culture with subsequent implementation of the protocol corresponding to exposure to ionizing radiation, as well as the XTT assay, flow cytometry and micronucleus and dicentric chromosome assays. In the XTT assay, after cumulative exposure to radiation, there were no statistically significant differences in metabolic activity between the carrier group and the non-carrier individual for the different

weeks of irradiation. Additionally, the effective dose of 2 Sv was not enough to cause a considerable decrease in cellular metabolism. Regarding flow cytometry, performed after cumulative exposure, in the carrier group a reduction in the percentage of viable cells was observed compared to the non-carrier individual, with a parallel increase in the percentage of cells in late apoptosis/necrosis. Finally, the genotoxicity was evaluated through the dicentric chromosome assay, for the cumulative exposure to radiation, and through the micronucleus assay, for the effective dose of 2 Sv. For the first assay, the formation of dicentric chromosomes was not observed. As for the cytokinesis-block micronucleus assay it was not possible to evaluate the genotoxicity because it was not possible to obtain binucleated cells with a well-defined cytoplasm that would allow the counting of micronuclei.

**Discussion:** The results obtained, for the most part, contradict the expected results, namely in relation to samples irradiated with a high dose, corresponding to 2 Sv. Under these conditions, a reduction in metabolic activity would be expected, as well as the formation of micronuclei. However, more experiments should be performed, and the sample increased to clarify the effects related to exposure to ionizing radiation, which will indicate the consequences of performing several imaging procedures throughout life.

**Conclusion:** Considering the conditions evaluated, it was not possible to validate whether there is, in fact, an increase in radiosensitivity in individuals carrying mutations in the *BRCA2* gene, compared to non-carriers.

# Índice

1.	Introdução .....	1
1.1.	Síndrome hereditária de cancro da mama e ovário.....	3
1.1.1.	Diagnóstico, vigilância e prevenção .....	5
1.1.2.	Genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> .....	9
1.2.	Radiação .....	11
1.2.1.	Efeitos biológicos da radiação.....	13
1.2.2.	Radiação ionizante e DNA .....	15
1.2.3.	Vias de reparação do DNA.....	17
1.2.4.	Aplicações da radiação ionizante .....	19
1.2.4.1.	Radiografia planar e tomografia computadorizada .....	20
1.2.4.2.	Radioterapia .....	22
1.3.	Impacto da radiação ionizante em indivíduos portadores de mutações nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> .....	23
2.	Objetivo.....	29
3.	Materiais e Métodos .....	33
3.1.	Amostra.....	35
3.1.1.	Caracterização da amostra.....	36
3.1.2.	Colheita da amostra sanguínea .....	36
3.2.	Estabelecimento de linhas celulares linfoblastoides .....	36
3.3.	Cultura celular .....	38
3.4.	Extração de DNA.....	40
3.5.	Tempo de duplicação da população .....	42
3.6.	Morfologia celular .....	43
3.7.	Irradiação .....	43
3.8.	Avaliação da atividade metabólica.....	46

3.9.	Avaliação da viabilidade celular e tipos de morte celular .....	47
3.10.	Avaliação da genotoxicidade.....	49
3.11.	Análise estatística.....	52
4.	Resultados .....	53
4.1.	Caracterização da amostra.....	55
4.2.	Estabelecimento de linhas celulares linfoblastoides .....	60
4.3.	Extração de DNA.....	62
4.4.	Tempo de duplicação da população .....	63
4.5.	Morfologia celular .....	65
4.6.	Tomografia Computorizada.....	66
4.6.1.	Avaliação da atividade metabólica.....	66
4.6.2.	Avaliação da viabilidade celular e tipos de morte celular .....	69
4.6.3.	Avaliação da genotoxicidade.....	70
4.7.	Radioterapia .....	71
4.7.1.	Avaliação da atividade metabólica.....	71
4.7.2.	Avaliação da genotoxicidade.....	72
5.	Discussão .....	77
6.	Conclusão e Perspetivas Futuras.....	89
	Anexo 1. ....	103
	Anexo 2. ....	104
	Anexo 3. ....	105

# Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Esquema representativo dos domínios funcionais das proteínas BRCA1 e BRCA2. ...	11
<b>Figura 2</b> - Espectro da radiação eletromagnética.....	12
<b>Figura 3</b> - Lesões diretas e indiretas no DNA causadas por radiação ionizante.....	14
<b>Figura 4</b> - Esquema representativo de agentes responsáveis por lesões no DNA, tipos de lesão e mecanismos de reparação. ....	17
<b>Figura 5</b> - Esquema representativo do processo de reparação de uma quebra de cadeia dupla através de recombinação homóloga.....	19
<b>Figura 6</b> - Processo subjacente à tomografia computadorizada.....	21
<b>Figura 7</b> - Efeito de fatores internos e externos nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> . ....	23
<b>Figura 8</b> - Distribuição dos diferentes constituintes do sangue periférico após centrifugação. 37	
<b>Figura 9</b> - Cultura de linhas células linfoblastoides obtidas a partir do sangue periférico de indivíduos portadores e do indivíduo não portador de mutação nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> ....	38
<b>Figura 10</b> - Diagrama da formação de linhas celulares linfoblastoides (LCLs), expansão e criopreservação.....	40
<b>Figura 11</b> - Fantoma empregue na irradiação das amostras com doses correspondentes a CT lombar. ....	44
<b>Figura 12</b> - Acelerador linear Truebeam (Varian). ....	46
<b>Figura 13</b> - Esquema representativo do protocolo do ensaio do XTT, utilizado no estudo da atividade metabólica.....	47
<b>Figura 14</b> - Exemplos representativos de cromossomas dicêntricos, obtidos após a irradiação de linfócitos de sangue periférico.....	50

<b>Figura 15</b> - Esquema representativo do protocolo do ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese, para avaliação da genotoxicidade.....	52
<b>Figura 16</b> - Gráfico representativo da distribuição de idade dos indivíduos incluídos no estudo, por grupo (portadores e não portador). .....	56
<b>Figura 17</b> - Gráfico representativo da distribuição do IMC dos indivíduos incluídos no estudo, por grupos: portadores, à esquerda, e não portador, à direita. ....	58
<b>Figura 18</b> - Gráfico representativo da distribuição da ingestão diária de água dos indivíduos incluídos no estudo, por grupos: portadores, à esquerda, e não portador, à direita.....	59
<b>Figura 19</b> - Gráfico representativo da distribuição da dose efetiva cumulativa dos indivíduos pertencentes ao grupo de portadores de mutações nos genes <i>BRCA1/2</i> . .....	60
<b>Figura 20</b> - Células antes e após a transformação por EBV, visualizadas através de microscópio ótico invertido. ....	61
<b>Figura 21</b> - Curvas correspondentes ao crescimento de LCLs obtidas a partir de diferentes indivíduos. ....	64
<b>Figura 22</b> - Imagens obtidas através do microscópio ótico invertido Motic AE31. ....	64
<b>Figura 23</b> - Células obtidas a partir de linhas celulares linfoblastoides. ....	66
<b>Figura 24</b> - Percentagem de atividade metabólica determinada através do ensaio do XTT. ....	68
<b>Figura 25</b> - Percentagem de células vivas (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e em necrose (N), para as condições controlo e irradiada, para um portador de mutação no gene <i>BRCA2</i> (P) e para o não portador (NP). ....	70
<b>Figura 26</b> - Cromossomas obtidos através da realização do ensaio de cromossomas dicêntricos. ....	71
<b>Figura 27</b> - Percentagem de atividade metabólica determinada através do ensaio do XTT, 7 dias após a exposição única a radiação ionizante. ....	72
<b>Figura 28</b> - Resultados obtidos através da realização do ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese com dois protocolos distintos, realizado após a dose efetiva de 2 Sv.....	73

**Figura 29** - Resultados obtidos após a otimização do protocolo do ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese.. ..... 74

**Figura 30** - Resultados obtidos após a exposição a radiação ionizante, correspondente a uma dose efetiva de 2 Sv, e após a otimização do protocolo do ensaio de micronúcleos..... 75



# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Síntese do risco de desenvolvimento dos diversos tipos de cancro associados à SHCMO para a população em geral e para indivíduos portadores de mutações nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> . .....	5
<b>Tabela 2</b> - Resumo dos estudos desenvolvidos que avaliam os riscos associados à exposição a radiação ionizante, associada a técnicas imagiológicas de diagnóstico, em portadores de mutações nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> .....	27
<b>Tabela 3</b> - Padrões de marcação com Anexina V/Iodeto de Propídeo para os diferentes grupos celulares. ....	48
<b>Tabela 4</b> - Variantes causais identificadas nas famílias incluídas no presente estudo.....	55
<b>Tabela 5</b> - Distribuição da população em estudo, por grupo (portadores e não portador), tendo em conta o género. ....	56
<b>Tabela 6</b> - Classificação segundo a Organização Mundial de Saúde, a partir do IMC. ....	57
<b>Tabela 7</b> - Dados relativos à extração de DNA, no que diz respeito à concentração, em ng/ $\mu$ L, e à pureza.....	62
<b>Tabela 8</b> - Dados relativos ao tempo de duplicação da população para diferentes amostras, obtidas a partir de diferentes indivíduos, assim como ao respetivo desvio padrão. ....	65



# Lista de Abreviaturas, Acrónimos, Siglas e Símbolos Químicos

ABRAXAS	<i>BRCA1-A complex subunit</i>
AnV	Anexina V
ATM	<i>ATM serine/threonine kinase</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BARD1	<i>BRCA1-associated RING domain 1</i>
BER	<i>Base excision repair</i>
BRCA1	<i>BRCA1 DNA associated gene</i>
BRCA2	<i>BRCA2 DNA associated gene</i>
BRCT	<i>BRCA1 C-terminal</i>
BRIP1/FACJ	<i>BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1</i>
CA-125	<i>Cancer antigen 125</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CHUC	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
CHEK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CT	<i>Computed tomography</i>
CTDI	<i>Computed tomography dose index</i>
CTDIvol	<i>Computed tomography dose index (volume)</i>
CtIP	<i>C-terminal-binding protein interacting protein</i>
DLP	<i>Dose length product</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DSB	<i>Double strand break</i>
DT	<i>Doubling time</i>
EBV	<i>Epstein-Barr virus</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
eV	Eletrão-volt

FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FMUC	Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
g	Gramma
Gy	Gray
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Ácido clorídrico
HR	<i>Homologous recombination</i>
H2AX	<i>H2A histone family member X</i>
IMC	Índice de massa corporal
IP	Iodeto de propídeo
IPOCFG	Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil
k	Fator de conversão
kb	Quilobase
KCl	Cloreto de potássio
kg	Quilograma
keV	Quilo - eletrão-volt
kV	Quilovolt
L	Litro
LCLs	<i>Lymphoblastoid cell lines</i>
LET	<i>Linear energy transfer</i>
m	Metro
M	Massa molar
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
mA	Miliampere
mAs	Miliampere – segundo
mg	Miligrama
mGy	Miligray
mGy.cm	Miligray – centímetro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mSv	Milisievert
MMR	<i>Mismatch repair</i>
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>

NLS	<i>Nuclear localization signals</i>
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
NP	Não portador
OER	<i>Oxygen enhancement ratio</i>
P	Portador
PALB2	<i>Partner and localizer of BRCA2</i>
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PMMA	Polimetilmetacrilato
PMS	Metil sulfato de N-metil dibenzopirazina
PSA	<i>Prostate specific antigen</i>
RBE	<i>Relative biological effectiveness</i>
RI	Radiação ionizante
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SCHMO	Síndrome hereditária de cancro da mama e ovário
SSB	<i>Single strand break</i>
Sv	Sievert
TAD	<i>Transcriptional activation domain</i>
U	Unidade
V	Volt
XTT	(2,3bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5[(fenilamino)carbonilo] -2H-tetrazolio) de sódio
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
53BP1	<i>p53-binding protein 1</i>



# 1. Introdução



## 1.1. Síndrome hereditária de cancro da mama e ovário

O cancro constitui a principal causa de morte prematura em Portugal e inclui um conjunto de doenças heterogêneas e, maioritariamente, não hereditárias. Considerando os cancros da mama e do ovário, a maioria ocorre esporadicamente, como resultado de mutações que se verificam em células somáticas. Contudo, em determinados casos, as alterações genéticas são transmitidas à descendência, estabelecendo-se uma síndrome hereditária (1,2).

Durante o século XIX, em consequência do aparecimento de várias mulheres, pertencentes à mesma família, com o diagnóstico de cancro da mama foi colocada a hipótese da hereditariedade ser uma condicionante. No entanto, as razões por detrás desta particular ocorrência permaneciam desconhecidas. Foi Pierre Paul Broca, um médico anatomista e antropólogo francês que, em 1866, fez o primeiro relato de uma família com esta predisposição familiar ao averiguar que a sua esposa apresentava cancro da mama, assim como outras mulheres da mesma família, ao longo de 3 gerações e numa idade precoce (3,4). Todavia, apenas no século XX, em 1971, após Alfred Gudson ter proposto o modelo genético “*two-hit*” para a carcinogénese, é que a definição do cancro hereditário, assim como o papel dos genes supressores tumorais foram estabelecidos. Este modelo propõe que o desenvolvimento de um tumor maligno pode resultar de mutações que se acumulam no material genético de uma célula. Desta forma, foi possível compreender a função crucial dos genes supressores tumorais, como o *BRCA1 DNA associated gene (BRCA1)* e o *BRCA2 DNA associated gene (BRCA2)* (5). Nos finais do século XX, estes genes foram associados à síndrome hereditária de cancro da mama e ovário (SHCMO), possibilitando a aplicação de um teste genético preditivo a este distúrbio genético (3). Contudo, é de salientar que o desenvolvimento de SHCMO resulta de uma complexa interação entre fatores ambientais, genéticos e do próprio indivíduo pelo que muitos portadores de mutações genéticas germinativas poderão nunca desenvolver cancro ao longo da vida.

A SHCMO é a síndrome hereditária mais comum, de penetrância incompleta, caracterizada por uma maior suscetibilidade, ou seja, uma probabilidade superior à esperada na população em geral, de desenvolver cancro da mama, em ambos os sexos, assim como cancro do ovário, incluindo cancro nas trompas de Falópio e cancro peritoneal primário. Menos frequentemente, pode ainda estar associada a um maior risco de desenvolver outras neoplasias, como o cancro da próstata, cancro do pâncreas e melanoma. Os indivíduos afetados tendem a desenvolver estes tipos de cancro numa idade mais precoce, geralmente antes dos 50 anos (2,6–9).

De acordo com a literatura, a SHCMO é causada, maioritariamente, por mutações nos genes supressores tumorais *BRCA1* e *BRCA2*, autossômicas dominantes e responsáveis por até 10% do total de casos de cancro da mama, e afetam todos os grupos étnicos e raças. Na população em geral, excluindo a população judaica Ashkenazi, estima-se que as mutações nestes genes tenham uma incidência de 1:400-1:500. No entanto, em indivíduos com ancestralidade judaica Ashkenazi, a incidência é de 1:40. Estas mutações levam ao desenvolvimento de proteínas disfuncionais, incapazes de exercer a função reparadora do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*). A sua não reparação conduz a instabilidade genómica, aumentando o risco de malignidade (2,6–9).

As mulheres não portadoras de mutação nos genes *BRCA1/2* apresentam o risco de desenvolvimento de um tumor mamário ou no ovário de, aproximadamente, 12% ou 1-2%, respetivamente. Contudo, quando existem mutações nestes genes, o risco de cancro da mama aumenta consideravelmente: 55-72% para mutações no gene *BRCA1* e 45-69% para mutações no gene *BRCA2*; assim como o risco de cancro do ovário: 39-44% para mutação no gene *BRCA1* e 11-17% para mutação no gene *BRCA2*. Relativamente aos homens portadores de mutações no gene *BRCA2*, assim como no gene *BRCA1*, embora com riscos associados inferiores, também têm um maior risco de desenvolver cancro, nomeadamente cancro da mama e cancro da próstata. O melanoma está apenas associado a indivíduos portadores de mutações no gene *BRCA2* (2,6,7,10). A Tabela 1 descreve o risco de desenvolvimento dos diversos tipos de cancro associados à SHCMO na população em geral, assim como em indivíduos portadores de mutações nos genes em estudo.

**Tabela 1** - Síntese do risco de desenvolvimento dos diversos tipos de cancro associados à SHCMO para a população em geral e para indivíduos portadores de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. [Adaptado de (6)]

Tipo de cancro	Risco para a população geral	Risco para portadores de mutação <i>BRCA1</i>	Risco para portadores de mutação <i>BRCA2</i>
<b>Mama</b>	12%	55-72% até aos 70 anos	45-69%
<b>Mama contralateral</b>	2% até aos 5 anos após o diagnóstico da primeira neoplasia mamária	20-30% até aos 10 anos após o diagnóstico da primeira neoplasia mamária; 40-50% em 20 anos	
<b>Mama masculino</b>	0,1%	1-2%	6-8%
<b>Ovário</b>	1-2%	39-44%	11-17%
<b>Próstata</b>	6% até aos 69 anos	21% até aos 75 anos; 29% até aos 85 anos	27% até aos 65 anos; 60% até aos 85 anos
<b>Pâncreas</b>	0,5%	1-3%	3-5% até aos 70 anos
<b>Melanoma (cutâneo e ocular)</b>	1,6%	-	Risco elevado

Embora as mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* sejam as principais responsáveis pela SHCMO, somente 25% dos casos estão associados a elas. Atualmente, mais de 25 genes estão identificados como ligados a esta síndrome, incluindo os genes *CHEK2* (do inglês *checkpoint kinase 2*), *ATM* (do inglês *ATM serine/threonine kinase*) e *PALB2* (do inglês *partner and localizer of BRCA2*), os quais são responsáveis pela codificação e respetiva síntese de proteínas que exercem funções nas vias de manutenção do genoma, em conjunto com os genes *BRCA1/2* (3).

### 1.1.1. Diagnóstico, vigilância e prevenção

A SHCMO deve ser suspeitada quando um indivíduo apresenta história pessoal ou familiar (primeiro, segundo ou terceiro grau) que coincida com uma das seguintes

características: cancro da mama diagnosticado numa idade inferior aos 50 anos, cancro da mama masculino, múltiplos cancros da mama primários, em uma ou ambas as mamas, cancro do ovário, combinação de cancro da próstata e/ou cancro pancreático com cancro da mama e/ou cancro do ovário, cancro da mama triplo-negativo, particularmente quando diagnosticado antes dos 60 anos de idade, cancro da mama diagnosticado em qualquer idade num indivíduo de ascendência judaica Ashkenazi, dois ou mais familiares diagnosticados com cancro de mama, um deles com menos de 50 anos de idade, três ou mais familiares diagnosticados com cancro da mama, em qualquer idade, ou identificação prévia de uma variante patogénica nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* na família (2,6).

Posto isto, um indivíduo que apresente pelo menos uma destas características é aconselhado a realizar um teste genético molecular, através da colheita de duas amostras sanguíneas. O teste determinará se estamos perante um caso de SHCMO, através da identificação de uma variante patogénica em genes associados à síndrome, como os genes *BRCA1* e *BRCA2* (6). Os testes genéticos identificam alterações em genes ou proteínas, dividindo-se em testes moleculares, testes citogenéticos e testes bioquímicos. Os testes genéticos moleculares, preconizados na presente síndrome, avaliam um ou vários genes por forma a identificar variações ou mutações responsáveis por doenças genéticas. Já os testes citogenéticos avaliam cromossomas inteiros para a deteção de anomalias, enquanto os testes bioquímicos são responsáveis pela deteção de mutações em proteínas, como enzimas, recetores, proteínas estruturais e hormonas, as quais podem resultar em doença caso a mutação conduza à síntese de uma proteína incapaz de exercer a sua função (11). Da realização do teste molecular podem resultar duas situações distintas: ou nenhuma alteração genética é identificada, sendo importante informar o indivíduo que o risco de desenvolver cancro ao longo da sua vida é idêntico ao da população em geral, ou o resultado é positivo, isto é, é identificada uma mutação num gene associado à SHCMO, sendo crucial testar também os familiares para a mutação específica, por forma a ser possível um acompanhamento médico adequado (12).

O teste genético deve ser realizado, em primeiro lugar, no indivíduo que apresente uma das características previamente referidas e, somente depois, em familiares. Caso não seja possível a realização do teste neste indivíduo, o mesmo pode ser feito num membro da família sem antecedentes de cancro, no entanto, é necessário deixar claro que um resultado negativo não elimina a possibilidade de existir uma variante patogénica nos genes *BRCA1/2* na família (6).

Em indivíduos que não cumpram com, pelo menos, uma das características acima referidas, diversos modelos matemáticos preditivos podem ser empregues, tendo em conta a história familiar, para estimar a probabilidade de um indivíduo ser portador de uma mutação germinativa em um dos dois genes. Caso o resultado esteja acima de um determinado limiar, geralmente de 10%, a realização de teste genético é aconselhada (6). Entre esses modelos, destaca-se o modelo estatístico BRCAPRO, uma ferramenta computacional empregue com o intuito de prever se um indivíduo apresenta uma mutação patogénica no gene *BRCA1* e/ou no gene *BRCA2*, usando uma abordagem Mendeliana. Ainda, quando é identificada uma mutação nestes genes, este modelo possui a capacidade de prever o risco genético associado ao desenvolvimento de cancro da mama. Para tal, este *software* incorpora a história pessoal e familiar do indivíduo, incluindo o número de tumores do indivíduo, assim como dos seus familiares de primeiro, segundo e terceiro grau (12). Contudo, este modelo apresenta algumas desvantagens, como o facto de não incorporar características da doença como, por exemplo, cancro da mama triplo-negativo. Desta forma, o modelo Myriad assim como o Manchester score são alternativas também utilizadas na atualidade (2,13).

O diagnóstico precoce de variantes patogénicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* é crítico para a aplicação de medidas eficazes de vigilância e profilaxia e de opções associadas a um maior controlo. O objetivo é a prevenção ou, quando esta não for possível, o diagnóstico atempado de tumores malignos (6).

Em mulheres saudáveis, portadoras conhecidas de mutação nos genes *BRCA1/2*, as medidas de vigilância e prevenção iniciam-se numa idade mais precoce quando comparada com a população em geral. Estas medidas devem ser equacionadas individualmente e após o adequado esclarecimento sobre as vantagens, riscos e limitações. Caso a opção da portadora seja apenas de vigilância, o objetivo não passa por evitar o surgimento de cancro, mas identificá-lo numa fase inicial. Para tal, a vigilância é realizada através da combinação de autoexame mensal da mama, exame clínico da mama a cada 6 ou 12 meses, ressonância magnética anual da mama a partir dos 25 anos de idade ou 5-10 anos antes da idade do diagnóstico mais jovem de cancro da mama na família, e mamografia anual a partir dos 30 anos de idade. A vigilância clínica e imagiológica no cancro do ovário, através de ecografia transvaginal, assim como a avaliação da concentração do marcador tumoral CA-125 (do inglês *cancer antigen 125*) no sangue, não são eficazes na identificação precoce desta neoplasia. Assim, existem programas de prevenção associados à realização de cirurgias de redução de risco de desenvolvimento de cancro (cirurgias profiláticas), as quais incluem a remoção cirúrgica de ambas as mamas

(mastectomia bilateral), com cirurgia reconstrutiva, e/ou a remoção cirúrgica dos ovários e trompas de Falópio (salpingo-ooforectomia bilateral), considerada após a última gravidez desejada (6,14,15).

Para mulheres portadoras que recusem as estratégias cirúrgicas, quer pelos efeitos que destas podem advir, quer pelo risco associado à própria cirurgia, ou pelo desejo reprodutivo ou de amamentar, a quimioprevenção parece ser uma boa opção, em substituição de estratégias mais definitivas. A quimioprevenção é realizada com recurso a agentes químicos naturais ou sintéticos capazes de prevenir o desenvolvimento de cancro (16). Contudo, a escolha desta alternativa deve ser ponderada e partilhada com um profissional de saúde. O tamoxifeno é um modulador seletivo de recetores de estrogénios, antagonista destes recetores na mama e agonista em outros tecidos, como o endométrio (17). Este fármaco é utilizado no tratamento do cancro da mama através do bloqueio dos recetores de estrogénios, os quais podem existir nas membranas de células tumorais, não permitindo que os estrogénios se liguem. Desta forma, a sua função é inibida (17). Um estudo retrospectivo mostrou que a toma de tamoxifeno é capaz de reduzir significativamente o risco de cancro da mama, que expresse recetores de estrogénios, entre mulheres saudáveis com mutação no gene *BRCA2*, contudo, a amostra analisada era bastante reduzida o que pode constituir um viés (18). Um estudo adicional comprovou a sua eficácia como agente de quimioprevenção contra cancro da mama contralateral em mulheres portadoras de variantes patogénicas nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* que haviam sido diagnosticadas com cancro da mama (19). Adicionalmente ao tamoxifeno, a utilização de contraceptivos orais por portadoras de mutação nestes genes tem sido associada a uma redução do risco de cancro do ovário, proporcional ao tempo de uso (20).

A vigilância em homens portadores de mutação nos genes *BRCA1/2* inicia-se mais tardiamente, aos 35 anos de idade, recomendando-se a realização de autoexame mensal da mama e exame clínico anual da mama. Além disso, a partir dos 40 anos de idade, deve ser realizada uma consulta anual de urologia e análise anual do PSA (do inglês *prostate specific antigen*) e, a partir dos 50 anos, deve ser realizada mamografia e ecografia mamária anual, se o indivíduo apresentar ginecomastia, ou ressonância magnética abdominal e/ou ecoendoscopia anual para vigilância de cancro do pâncreas (6).

### 1.1.2. Genes *BRCA1* e *BRCA2*

O DNA, a estrutura mais importante da célula, sofre constantemente lesões causadas por fatores internos, como hidrólise e oxidação, e/ou fatores externos, como luz ultravioleta, agentes químicos e radiação ionizante. A reparação destas lesões é fundamental para que a célula desempenhe normalmente as suas funções (7). Os genes supressores tumorais são cruciais para o funcionamento e desenvolvimento normal do organismo, constituindo a chave para a regulação e inibição da divisão celular, mantendo-as sob controlo. A partir destes genes, são codificadas proteínas específicas com diversas funções na célula (21).

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* foram associados pela primeira vez à suscetibilidade para os cânceros da mama e do ovário por Miki *et al.* em 1994 (*BRCA1*) e por Wooster *et al.* em 1995 (*BRCA2*) (22,23).

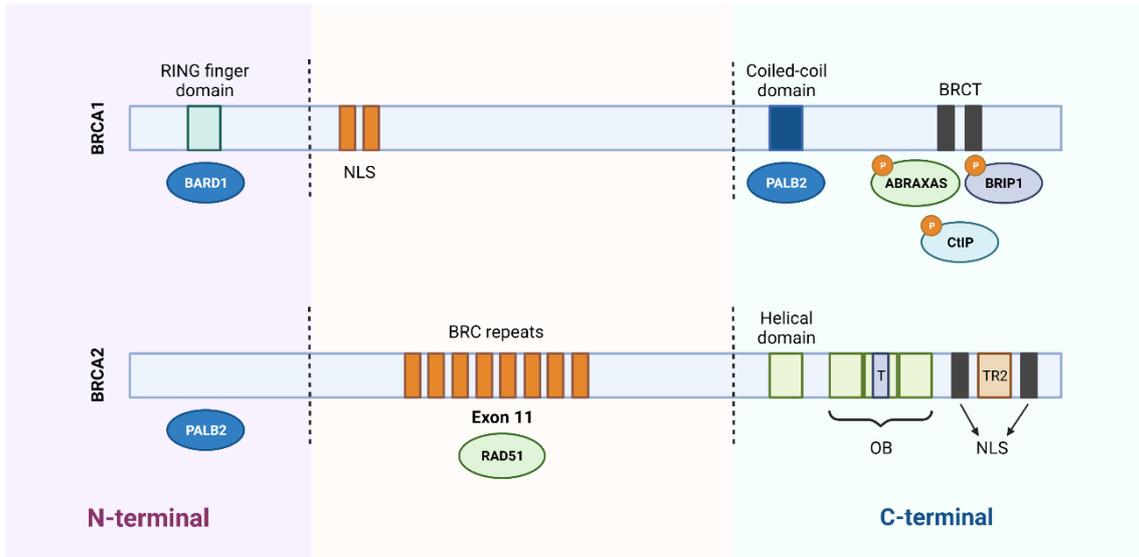
O gene *BRCA1*, localizado na região 21.31 do braço longo do cromossoma 17 (cromossoma 17q21.31), é um gene supressor tumoral constituído por 24 exões, 22 dos quais são codificantes, distribuídos por 100 kb de DNA genómico. Foram descritas mais de 1700 mutações neste gene, com mais de 800 confirmadas como clinicamente significativas, ou seja, associadas ao aumento da suscetibilidade tumoral. Este gene é responsável pela codificação e respetiva síntese da fosfoproteína BRCA1, a qual desempenha um papel crucial na manutenção da estabilidade genómica, atuando como proteína supressora tumoral (2,24–26).

A proteína BRCA1, localizada no núcleo e constituída por 1863 aminoácidos, consiste em três domínios essenciais: um terminal amínico (N-terminal), uma região central e um terminal carboxilo (C-terminal). A região N-terminal contém um importante domínio rico em cisteínas, o domínio RING (do inglês *really interesting new gene*), essencial para a interação com a proteína BARD1 (do inglês *BRCA1-associated RING domain 1*) e para a formação do complexo BRCA1 com a ubiquitina ligase E3. A atividade desta enzima é crucial para que a proteína BRCA1 exerça corretamente a sua função de supressão tumoral. A região central da proteína contém dois sinais de localização nuclear (NLS, do inglês *nuclear localization signals*) e o local específico para a fosforilação da proteína CHEK2, processo fundamental para que a proteína BRCA1 consiga recrutar a proteína RAD51 para os locais onde ocorreram lesões no DNA. Finalmente, o terminal carboxilo é constituído pelo domínio *coiled-coil*, o qual se associa a PALB2, e por dois domínios BRCT (do inglês *BRCA1 C-terminal*) que medeiam a interação com proteínas fosforiladas importantes, como a ABRAXAS (do inglês *BRCA1-A complex subunit*), a BRIP1/FACJ (do inglês *BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1*) e a CtIP (do inglês *C-terminal-binding protein*

*interacting protein*) (Figura 1) (2,24,27). Diversas mutações hereditárias no gene *BRCA1* associadas ao cancro foram encontradas no domínio RING e nos domínios BRCT, o que indica que ambos estão envolvidos na supressão de cancro da mama e do ovário (24). Desta forma, conclui-se que a proteína BRCA1 tem um papel preponderante a nível celular uma vez que, através dos seus domínios funcionais, é capaz de estabelecer interações com diversas proteínas supressoras tumorais (CHEK2, PALB2), assim como com outras proteínas envolvidas na reparação do DNA, contribuindo para a estabilidade genómica (24).

O gene *BRCA2*, localizado na região 13.1 do braço longo do cromossoma 13 (cromossoma 13q13.1), é um gene supressor tumoral constituído por 27 exões, 26 dos quais são codificantes. Estão descritas mais de 1800 mutações associadas a este gene, o qual é responsável pela codificação da proteína BRCA2 (2,24,28,29).

A proteína BRCA2 é constituída por 3418 aminoácidos, por uma região central e dois terminais, o N-terminal e o C-terminal. A região central da proteína é codificada pelo exão 11 e contém 8 repetições BRC com aproximadamente 1000 aminoácidos responsáveis pela associação da BRCA2 à proteína RAD51. Muitos casos de SHCMO têm sido associados à presença de mutações nestas repetições, demonstrando que as interações entre as proteínas BRCA2 e RAD51 são fulcrais para que estas não se desenvolvam. A região N-terminal contém o domínio de ativação transcricional (TAD, do inglês *transcriptional activation domain*), fundamental para que exista uma interligação entre as proteínas BRCA2 e PALB2. Esta proteína é responsável pelo auxílio das proteínas BRCA1 e BRCA2 na reparação de lesões no DNA. No C-terminal está localizado o domínio de ligação ao DNA que possui um domínio helicoidal, um domínio *tower* e 3 domínios de ligação de oligonucleótidos (OB) que facilitam a ligação da proteína a lesões de DNA, nomeadamente quebras simples e dupla da cadeia de DNA. Este terminal também contém dois NLS e um domínio TR2 (Figura 1) (2,24,27).



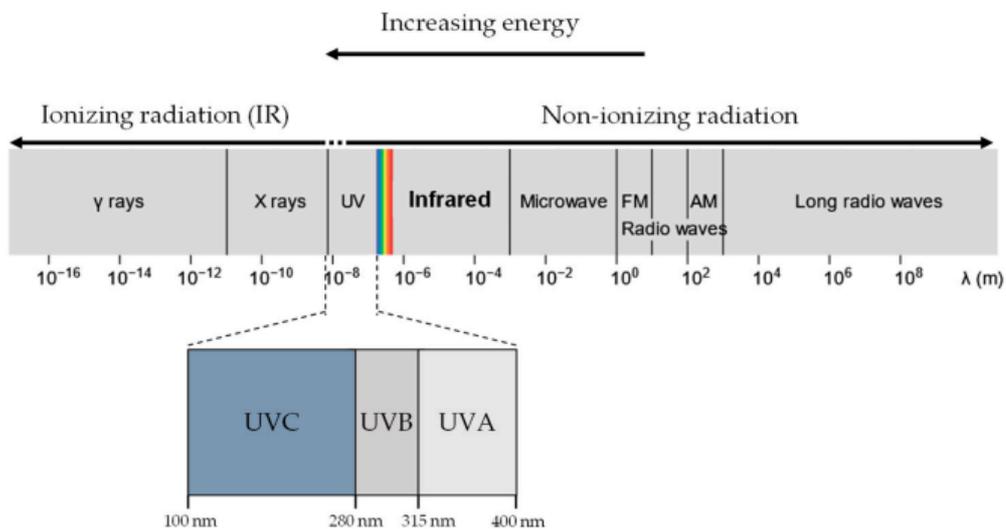
**Figura 1** - Esquema representativo dos domínios funcionais das proteínas BRCA1 e BRCA2. A região N-terminal da proteína BRCA1 contém um domínio RING que se associa à proteína BARD1, a região central contém dois sinais de localização nuclear (NLS) e a região C-terminal contém um domínio *coiled-coil* que se associa à proteína PALB2 e dois domínios BRCT que medeiam a interação com diversas proteínas fosforiladas. Em relação à proteína BRCA2, esta liga-se à PALB2 através da região N-terminal e contém, na região central, 8 repetições BRC responsáveis pela sua associação à proteína RAD51. A região C-terminal contém um domínio de ligação ao DNA constituído por um domínio helicoidal, um domínio *tower* (T) e 3 domínios de ligação de oligonucleótidos (OB), os quais facilitam a ligação de BRCA2 a lesões de DNA. Ainda, este terminal contém dois NLS e um domínio TR2. [Adaptado de (2)]

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* são genes supressores tumorais responsáveis pela reparação de lesões que ocorrem no DNA, nomeadamente quebras de cadeia dupla, permitindo a manutenção da estabilidade genómica. Além da função de reparação, estão envolvidos na dinâmica do centróssoma, na segregação dos cromossomas, na citocinese e estabilizam o genoma temporal e espacialmente no ciclo celular. Assim, a interrupção de uma destas funções celulares poderá conduzir à instabilidade e ser propícia à carcinogénese (7).

## 1.2. Radiação

A radiação pode ser descrita como uma forma de energia, emitida a partir de uma fonte e transmitida na forma de ondas eletromagnéticas ou de partículas subatómicas. Este processo de transmissão pode ocorrer em qualquer meio (30).

Relativamente à interação com a matéria, a radiação pode ser classificada em dois tipos diferentes: radiação ionizante (RI) e radiação não ionizante (Figura 2) (31). A radiação ionizante é definida como uma forma de radiação que possui energia suficiente para ionizar átomos ou moléculas com as quais interage através da ejeção de eletrões, contrariamente à radiação não ionizante. O eletrão ejetado pode ainda apresentar energia cinética suficiente para produzir outras ionizações à medida que atravessa a matéria. A radiação ionizante pode ser radiação eletromagnética, como os raios-X e os raios gama ( $\gamma$ ) (Figura 2), ou radiação constituída por partículas, como as partículas alfa ( $\alpha$ ), as partículas beta ( $\beta$ ), os neutrões e os prótons (2,31–33).



**Figura 2** - Espectro da radiação eletromagnética. O espectro é dividido em radiação ionizante, de maior energia, da qual fazem parte os raios-X e os raios- $\gamma$ , e radiação não ionizante, de menor energia. [Adaptado de (31)]

A radiação ionizante, quando atravessa o tecido humano, pode interagir ao ceder-lhe energia, o que pode determinar o aparecimento de alterações biológicas. A absorção da energia depositada por esse tipo de radiação pode resultar em danos catastróficos na célula, principalmente no DNA, a estrutura mais radiosensível. Contudo, embora a radiação ionizante possa causar efeitos nocivos nos tecidos e nos órgãos que atravessa, os benefícios a ela associados, como o diagnóstico e aplicações terapêuticas, na maior parte das situações, ultrapassam os riscos que dela podem advir (34).

Para um certo meio, a taxa de perda de energia depende não só do tipo de radiação e da sua energia, como também da densidade do material irradiado. Assim, a transferência linear

de energia (LET, do inglês *linear energy transfer*), definida como a quantidade média de energia que a radiação transfere para o material atravessado por unidade de comprimento de percurso, é um fator importante que influencia o efeito biológico da radiação. De facto, em geral, quanto maior o LET, maior o efeito biológico e, partículas carregadas, como as partículas  $\alpha$ , assim como os prótons e os neutrões, em geral, têm um LET mais elevado do que os raios-X, os raios- $\gamma$  e as partículas  $\beta$ , os quais são bastante penetrantes e, como tal, possuem longos trajetos antes que toda a sua energia seja cedida (2,35,36). Para além do LET, existem ainda dois outros fatores que afetam a resposta celular à radiação ionizante: a eficácia biológica relativa (RBE, do inglês *relative biological effectiveness*), e a relação do enriquecimento em oxigénio (OER, do inglês *oxygen enhancement ratio*).

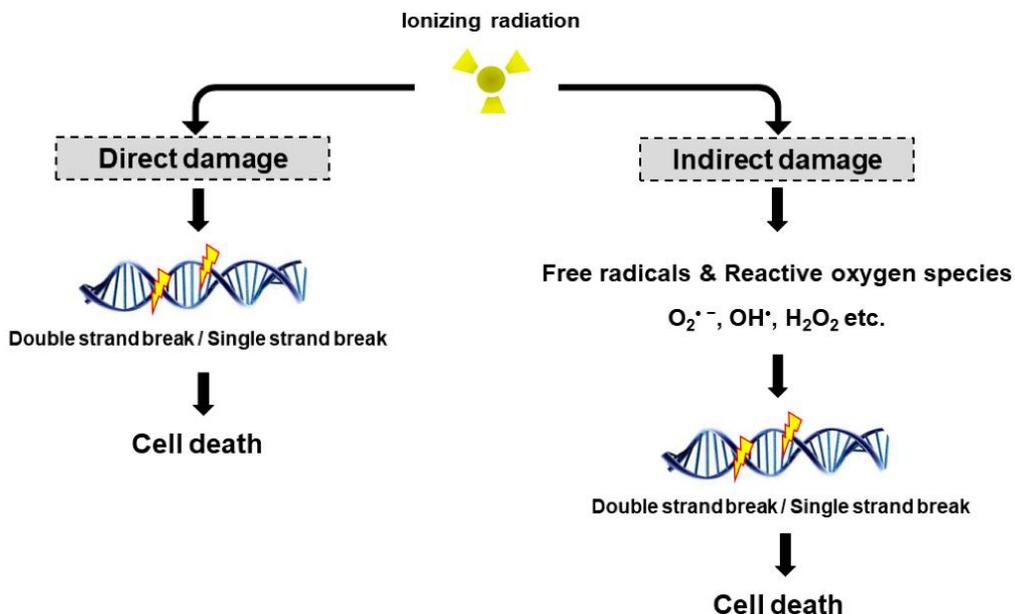
A RBE é um parâmetro utilizado para quantificar o dano biológico produzido por um tipo de radiação e descreve o efeito relativo do LET. Este parâmetro corresponde à razão entre a dose de radiação considerada *standard* (raios-X de 250 keV ou fótons de 1MeV provenientes de uma fonte de cobalto-60) e a dose de radiação teste que produz a mesma resposta biológica, e aumenta com o aumento de LET até um valor máximo de LET de, aproximadamente, 100 keV/ $\mu\text{m}$ . De facto, com a utilização de radiação de elevado LET, quando comparada com radiação de baixo LET, é geralmente mais provável a ocorrência de lesão celular. Acima dos 100 keV/ $\mu\text{m}$ , o aumento de LET não contribui para maior dano celular uma vez que a maior parte da energia é desperdiçada devido a densidades de ionização elevadas (2,35–37).

A OER descreve o efeito do oxigénio na sensibilidade à radiação por parte das células e refere-se à razão entre a dose de radiação que produz uma determinada resposta na ausência de oxigénio e a dose de radiação que produz o mesmo efeito biológico na presença de oxigénio. Efetivamente, os efeitos biológicos causados pela radiação são maiores em situações aeróbias uma vez que, nessas condições, se produz um maior número de radicais livres durante a radiólise da água. Para radiações de baixo LET, a presença de oxigénio no meio celular afeta drasticamente o efeito da radiação (2,38).

### **1.2.1. Efeitos biológicos da radiação**

Relativamente aos efeitos biológicos da radiação, estes podem ser diretos ou indiretos. Os efeitos diretos ocorrem quando a radiação ionizante interage diretamente, através da cedência de energia, com componentes celulares fundamentais para o normal funcionamento

da célula, como o DNA (Figura 3), o RNA (do inglês *ribonucleic acid*) mensageiro, os lípidos de membrana ou as enzimas, causando alterações nos mesmos (39). Essa interação pode afetar a capacidade de a célula se dividir e, assim, sobreviver. Este tipo de efeito é o mecanismo preponderante quando as células interagem com radiação de elevado LET, como as partículas  $\alpha$ , os neutrões e os prótons. Por outro lado, os efeitos indiretos ocorrem quando a radiação ionizante interage com um constituinte celular não crítico, como a água – radiólise da água. Após esta interação, ocorre uma sequência de reações que conduz à produção de espécies reativas perigosas, como o radical livre hidroxilo, ou de precursores de espécies reativas, como o peróxido de hidrogénio, precursor direto do radical hidroxilo. Estes são responsáveis por cerca de dois terços de todas as lesões provocadas pela radiólise da água. Os radicais possuem eletrões desemparelhados na sua estrutura, o que os torna muito reativos e suscetíveis à interação com moléculas de DNA, sendo capazes de inativar mecanismos celulares e causar alterações nos mecanismos genéticos ao lesar o DNA, proteínas e/ou lípidos. No final, estas moléculas podem causar o comprometimento da função celular ou a morte (Figura 3) (39). Este tipo de efeito é causado essencialmente por radiação ionizante eletromagnética (raios-X e raios  $\gamma$ ), ou seja, radiação com baixo LET. Além disso, uma vez que a água constitui cerca de 60% da composição celular, a maioria das lesões induzidas por radiação resulta da ação indireta da mesma (2,36,40,41).



**Figura 3** - Lesões diretas e indiretas no DNA causadas por radiação ionizante. A radiação pode, diretamente, interagir com o DNA e causar lesões ou morte celular. O dano indireto é causado por espécies reativas perigosas ou por precursores dessas espécies, formados após a radiólise da água, os quais podem conduzir a alterações no DNA e, ainda, a morte celular. [Adaptado de (39)]

Os efeitos biológicos decorrentes da exposição a radiação ionizante podem também ser classificados de acordo com a dose absorvida como efeitos determinísticos ou efeitos estocásticos. Os efeitos determinísticos dependem diretamente da exposição, existindo um limiar de dose abaixo do qual não se verificam quaisquer efeitos. A probabilidade de ocorrência destes efeitos, assim como a sua severidade, estão relacionados com o aumento de dose. Estes conduzem a morte celular e são sempre somáticos, isto é, a radiação causa lesões em células que estão continuamente a reproduzir-se (células somáticas). Desta forma, os efeitos ocorrem nas células do indivíduo exposto, sem se transmitirem à descendência. É de notar que, indivíduos diferentes apresentam radiosensibilidades diferentes e, portanto, limiares diferentes. Os efeitos estocásticos, como a ocorrência de uma mutação ou a carcinogénese, são aqueles que conduzem a uma transformação celular e para os quais não existe um limiar de dose para que ocorram, podendo manifestar-se meses ou anos após a exposição à radiação. Ao contrário dos efeitos determinísticos, os efeitos estocásticos não permitem estabelecer de forma clara uma relação causal entre o efeito e a exposição à radiação devido à grande quantidade de variáveis envolvidas, assim como ao longo tempo de latência. Estes efeitos estão relacionados com baixas doses, como aquelas às quais os profissionais que trabalham com radiação estão sujeitos diariamente. Os efeitos estocásticos podem ser genéticos, se ocorrerem em células germinativas (espermatozoides ou oócitos), ou somáticos. Os efeitos genéticos da radiação conduzem a uma alteração permanente no material genético que é transmitido à descendência, podendo conduzir a defeitos ou malformações, dependendo da dose. Os efeitos somáticos não são transmitidos à descendência, contudo, podem induzir, por exemplo, o aparecimento de cancro ao longo da vida. Podem ser imediatos, se ocorrerem num período de horas até algumas semanas após a irradiação, ou tardios, caso surjam vários meses ou anos após a exposição à radiação. Os efeitos somáticos tardios são difíceis de distinguir de outros efeitos que possam ocorrer uma vez que demoram a surgir, não se sabendo ao certo se a patologia se deve ao processo de envelhecimento natural do ser humano ou à exposição a radiação (42).

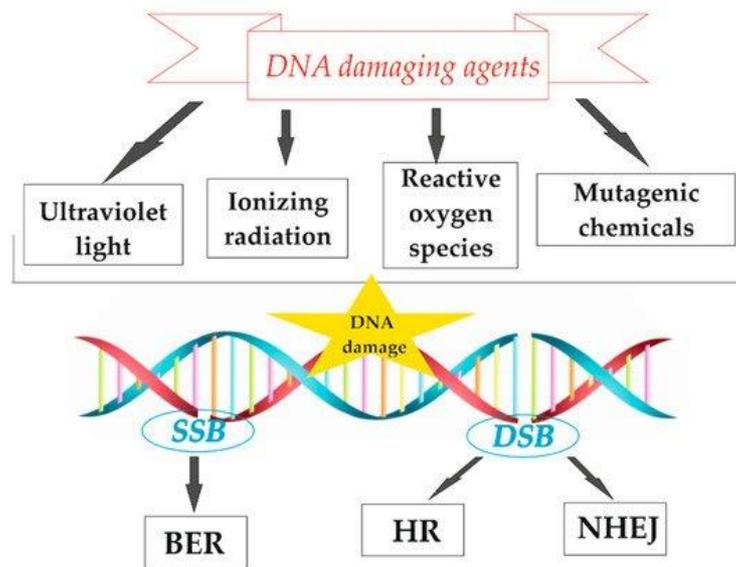
### **1.2.2. Radiação ionizante e DNA**

A radiação ionizante, como referido, tem a capacidade de lesar diversos constituintes celulares, como a membrana celular e/ou organelos, através de vários mecanismos. Contudo, são os danos no DNA, a região mais radiosensível da célula, que podem conduzir a mutações, à divisão celular descontrolada e ao desenvolvimento de cancro.

Relativamente às lesões induzidas pela radiação na molécula de DNA, estas são capazes de provocar danos estruturais e interferir na transcrição genética. Essas lesões envolvem alterações nas ligações entre as bases nitrogenadas, como substituição, adição ou deleção de bases, substituição cruzada, quebra simples (SSB, do inglês *single strand break*) e/ou quebra dupla (DSB, do inglês *double strand break*) da cadeia do DNA (43).

A SSB representa o tipo mais comum de lesão no DNA e, tal como o nome indica, envolve a quebra de apenas uma das cadeias de DNA (Figura 4), sendo produzida essencialmente por radiação de baixo LET (44). Uma vez que as bases nitrogenadas são complementares, este tipo de lesão é relativamente fácil de reparar, pois a cadeia oposta serve como molde para preencher a lacuna que se criou (45).

A DSB, a lesão mais citotóxica do DNA, envolve a quebra em ambas as cadeias de DNA, no mesmo local ou em locais próximos (Figura 4) (44). Estas lesões são mais prováveis de ocorrer com radiação de alto LET e também de resultar numa reparação defeituosa pois o molde para guiar a reparação pode ser perdido. A maioria das DSBs é letal para a célula uma vez que os fragmentos produzidos são detetados durante a replicação através de *checkpoints* do ciclo celular, não permitindo que a célula progrida no ciclo e complete o seu processo de divisão. Uma vez que as DSBs podem resultar na perda de grandes regiões cromossómicas, elas são consideradas o tipo de lesão no DNA mais complexo de reparar (45).



**Figura 4** - Esquema representativo de agentes responsáveis por lesões no DNA, tipos de lesão e mecanismos de reparação. Diversos agentes, como a luz ultravioleta, a radiação ionizante, espécies reativas de oxigênio e químicos mutagênicos, são capazes de causar lesões ao nível do DNA, nomeadamente quebras simples, SSB, e quebras duplas, DSB, da cadeia de DNA. Por sua vez, estas lesões, quando detetadas, podem ser reparadas por diferentes mecanismos celulares, como reparação por excisão de base, BER, por recombinação homóloga, HR, ou por união de extremidade não homóloga, NHEJ. [Adaptado de (44)]

### 1.2.3. Vias de reparação do DNA

A reparação de lesões no DNA inicia-se com a sua identificação: dois *checkpoints* do DNA monitorizam as lesões em pontos específicos dentro do ciclo celular e interrompem-no para que haja tempo para que a reparação ocorra (43).

Quando uma SSB é detetada, os mecanismos de reparação a que a célula recorre são a reparação por excisão de bases (BER, do inglês *base excision repair*), a reparação por excisão de nucleótidos (NER, do inglês *nucleotide excision repair*) ou a reparação de erros no emparelhamento de bases (MMR, do inglês *mismatch repair*). Relativamente à BER, esta inicia-se pelo reconhecimento específico da lesão, seguido da excisão da base de DNA lesada por glicosilases de DNA e do corte da molécula de DNA no local da lesão por endonucleases. Posteriormente, o nucleótido em falta é colocado por uma polimerase de reparação, a enzima DNA ligase sela o corte na cadeia de DNA e, finalmente, as ligações fosfodiéster são restabelecidas e a lesão reparada (43). Este mecanismo corresponde ao principal mecanismo pelo qual as células reparam lesões de nucleótidos causadas por espécies reativas de oxigênio

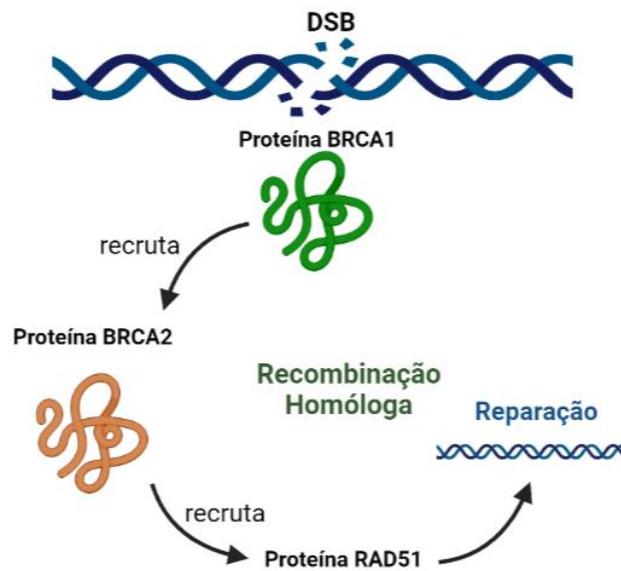
ou outras espécies reativas geradas pelo normal metabolismo. Adicionalmente, é o principal mecanismo de reparação para pequenas alterações de bases no DNA, como aquelas causadas por oxidação, alquilação e desaminação (46). Por outro lado, a NER é usada para remover extensas lesões causadas pela radiação ultravioleta e para corrigir bases que distorcem a dupla hélice do DNA. Durante este mecanismo, a helicase abre o DNA, os nucleótidos modificados são removidos juntamente com uma porção de DNA circundante, a DNA polimerase substitui o DNA ausente e a DNA ligase fecha a lacuna (47). Em relação à MMR, pares incorretos base-base e pequenas inserções-deleções geradas durante a replicação do DNA são corrigidos, garantindo a estabilidade genómica. Esta técnica é empregue tanto em células procarióticas como em células eucarióticas e compreende várias proteínas envolvidas no reconhecimento da lesão, iniciação da reparação, excisão da lesão e, finalmente, síntese de DNA. Uma vez que a MMR reduz o número de erros associados à replicação, os defeitos na mesma aumentam a taxa de mutações espontâneas, estando associados ao cancro (2,47,48).

Além dos mecanismos empregues para a reparação de SSBs, a célula possui também mecanismos para reparar as DSBs, os quais são de grande interesse uma vez que este é o tipo de lesões mais comum após a exposição a radiação ionizante. As DSBs são geralmente mais graves uma vez que a lesão resulta em duas extremidades livres de DNA (43). A reparação eficiente destas lesões é crítica para a estabilidade genómica, contrariamente à reparação errónea, a qual pode conduzir à carcinogénese.

Para DSBs, existem duas vias principais envolvidas na reparação: a recombinação homóloga (HR, do inglês *homologous recombination*) e a união de extremidade não homóloga (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*) (Figura 4). A HR corresponde a um processo complexo no qual as proteínas de reparação localizam o DNA homólogo, que possui a mesma sequência relativa do DNA lesado, ou o cromossoma irmão. Em seguida, o DNA danificado é ressecado e ocorre a invasão da cadeia. A ressecção corresponde ao processo pelo qual o DNA adjacente à lesão é removido da extremidade 5' da quebra, enquanto a invasão da cadeia ocorre na extremidade 3'. Finalmente, o DNA perdido é sintetizado e, quando a reparação estiver concluída, os cromossomas separam-se. Esta via de reparação do DNA atua exclusivamente nas fases S e G2 do ciclo celular uma vez que, nestas fases, existe um maior número de cromátides irmãs, as quais podem ser usadas como modelos de reparação. Por outro lado, a via NHEJ atua na fase G1 do ciclo celular, onde a HR não está disponível, e é denominada de “não homóloga” pois não requer um molde para que ocorra: as pontas do DNA lesado são apenas ligadas entre si. Esta técnica de reparação, quando comparada com a recombinação homóloga, é mais rápida,

contudo, menos eficiente na reparação de DSBs pois não utiliza modelos homólogos para garantir que a cadeia reparada seja igual à sequência de DNA original (2,36,43).

As proteínas *BRCA1/2* desempenham um papel crucial na reparação de DSBs através de HR. Durante este processo, a proteína *BRCA1* recruta a proteína *BRCA2* para o local onde a lesão ocorreu. Por sua vez, a proteína *BRCA2* recruta a proteína *RAD51* para esse local, conduzindo à reparação do DNA através do processo de recombinação homóloga (Figura 5). Adicionalmente, a proteína *BRCA1* está também envolvida na regulação da via de reparação NHEJ (24).



**Figura 5** - Esquema representativo do processo de reparação de uma quebra de cadeia dupla através de recombinação homóloga. A proteína *BRCA1*, no local da lesão, recruta a proteína *BRCA2* que, por sua vez, recruta a proteína *RAD51*, conduzindo à sua reparação. Figura criada com recurso ao Biorender.

#### 1.2.4. Aplicações da radiação ionizante

Os vários tipos de radiação ionizante, desde a sua descoberta, têm sido aplicados em diversas áreas, nomeadamente na medicina e na indústria, através da utilização de fontes de radiação artificiais, com consequências bastante benéficas. De facto, a radiação ionizante proporcionou avanços na área da medicina, seja em procedimentos imagiológicos para diagnóstico ou prevenção, os quais fazem uso de baixas doses, ou em abordagens terapêuticas, associadas a doses elevadas, representando a principal fonte de radiação artificial a que a população está exposta (49).

Atualmente, diversas técnicas imagiológicas de diagnóstico são utilizadas, algumas das quais utilizam fontes de raios-X, nomeadamente a radiografia, a fluoroscopia, a mamografia e a tomografia computadorizada (50). Ainda, diversas técnicas terapêuticas também as utilizam, como a telerradioterapia.

#### **1.2.4.1. Radiografia planar e tomografia computadorizada**

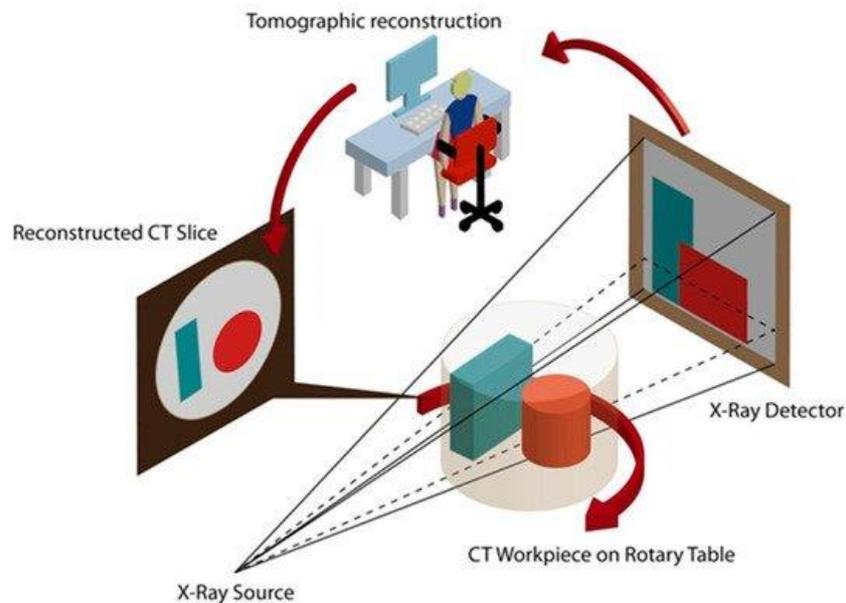
Até aos finais do século XIX, os médicos não tinham acesso imagiológico ao que acontecia no interior do corpo, contudo, em 1895, o físico Wilhelm Conrad Roentgen produziu e detetou radiação eletromagnética com um comprimento de onda correspondente a raios-X, desencadeando uma enorme revolução no diagnóstico médico que continua até aos dias de hoje (50).

A radiografia foi a primeira tecnologia de imagem médica empregue na clínica. Esta técnica utiliza um feixe de raios-X como fonte para a obtenção das imagens, produzido por efeito termoiónico numa ampola, o qual é transmitido através do indivíduo e atinge o detetor. Uma vez que diferentes estruturas do corpo humano apresentam diferentes composições, a atenuação do feixe é variável, contribuindo para a formação da imagem radiográfica, bidimensional. Esta imagem corresponde à projeção de todos os tecidos e órgãos localizados entre a fonte e o detetor, fixos e em oposição, verificando-se uma sobreposição das estruturas (51).

A radiografia, desde a sua descoberta, sofreu grandes avanços contribuindo para que, na década de 1970, fosse introduzida uma nova técnica imagiológica designada tomografia computadorizada (CT, do inglês *computed tomography*), a qual corresponde a uma das mais importantes inovações médicas da história humana. Trata-se de uma técnica de radiodiagnóstico por imagem que utiliza radiação X com o intuito de obter imagens a três dimensões do interior do corpo, devido ao movimento da fonte e do detetor, que se encontram num anel (*gantry*), assim como da mesa onde se encontra o indivíduo (terceira direção). Este método complementar de diagnóstico possibilita a reconstrução de uma série de imagens, com recurso a algoritmos matemáticos, recorrendo a diversas projeções tomográficas sobre determinada região corporal (Figura 6) (52). Posteriormente, a mesa avança para uma nova posição z, com repetição do processo até à reconstrução da imagem final. Apesar do valor inquestionável da CT, ao ser um método rápido, não-invasivo e que possibilita uma boa

visualização das estruturas anatómicas sem que haja sobreposição dos tecidos, a mesma, quando comparada com a radiografia planar, tem uma maior dose associada (30,53). Nos equipamentos que empregam nesta técnica, o *pitch* é um parâmetro aplicável, selecionado pelo operador, o qual corresponde à razão entre o deslocamento da mesa por rotação completa da *gantry* e a espessura de corte. Geralmente, um *pitch* de 1 permite uma melhor qualidade de imagem. Aumentando esta razão para valores superiores a 1, a aquisição será mais rápida e os artefactos de movimento menores, sendo vantajoso quando o exame é realizado em crianças ou indivíduos agitados, contudo, a interpolação necessária para a formação da imagem será maior, associada a uma menor resolução espacial (54).

Atualmente, a tomografia computadorizada é um exame complementar de diagnóstico de fácil acesso nas instituições de saúde, com aquisição rápida de dados e elevada qualidade imagiológica, tornando-o um dos exames mais frequentemente realizado. Esta técnica mantém-se em constante transformação como resultado de evoluções permanentes, permitindo a realização de estudos mais precisos e com menor exposição à radiação.



**Figura 6** - Processo subjacente à tomografia computadorizada. [Adaptado de (52)]

#### **1.2.4.2. Radioterapia**

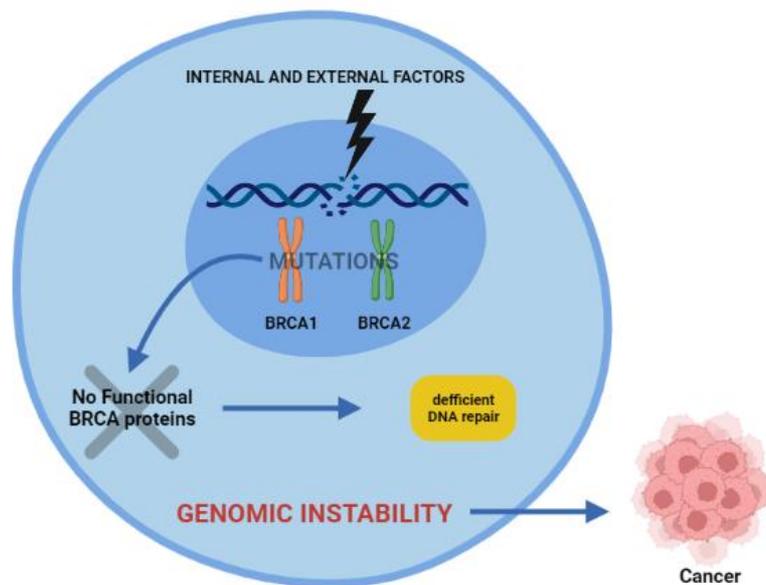
Desde a descoberta de raios-X por Roentgen, em 1895, que a mesma despertou um grande interesse, levando a uma intensa investigação em diversas direções. Desta forma, em 1896, a sua utilidade clínica como meio para o tratamento do cancro foi apreciada, surgindo o primeiro indivíduo tratado com recurso a raios-X. Apesar dos primeiros anos de investigação não terem sido animadores, mais tarde, ocorreram importantes desenvolvimentos que conduziram ao estabelecimento de uma nova especialidade médica. A radioterapia é uma técnica que emprega radiação ionizante com finalidade terapêutica, tendo como alvo fundamentalmente o tratamento oncológico (cerca de 60%). Esta modalidade tem como intuito destruir células cancerígenas através da administração precisa e controlada de determinada dose no volume tumoral, procurando minimizar a exposição nos tecidos sãos adjacentes (55).

A radioterapia pode ser classificada em telerradioterapia, a abordagem mais comum na prática clínica, que utiliza uma fonte externa de radiação de alta energia produzida através de um acelerador, a qual é direcionada para o tumor, ou em braquiterapia, um procedimento no qual se utilizam fontes radioativas colocadas no interior ou na proximidade do volume tumoral (55). Esta opção terapêutica pode ser utilizada isoladamente ou combinada com outras modalidades de tratamento (cirurgia, quimioterapia e/ou imunoterapia) de forma neoadjuvante e/ou adjuvante. Adicionalmente, a radioterapia pode, em casos mais avançados, ser utilizada com o intuito de aliviar sintomas e melhorar a qualidade de vida do doente (56). A escolha dos tratamentos depende de vários fatores entre eles o tipo de tumor, o estágio do tumor e outras características tumorais, assim como o estado clínico do doente.

Nas últimas décadas, a radioterapia tem sofrido uma evolução tecnológica, permitindo uma maior eficácia nos tratamentos, maior precisão na aplicação da radiação, preservando assim os órgãos e tecidos adjacentes à região tumoral, e redução dos efeitos colaterais que o tratamento causava no passado.

### 1.3. Impacto da radiação ionizante em indivíduos portadores de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*

A radiação ionizante, como referido, é conhecida por causar lesões no DNA, seja direta ou indiretamente, através das espécies radicalares produzidas na radiólise da água. Alterações no DNA, como alterações nas bases nitrogenadas, substituição cruzada e/ou quebras simples ou duplas da cadeia de DNA são conhecidas por causar cancro. Desta forma, a carcinogénese induzida pela exposição a radiação ionizante, como cancro da mama e cancro do ovário, pode surgir em indivíduos que apresentam mutações nos genes supressores tumorais *BRCA1* e *BRCA2* uma vez que as proteínas codificadas por estes genes são essenciais na reparação de lesões no DNA e na manutenção da estabilidade genómica (Figura 7) (2,7,57).



**Figura 7** - Efeito de fatores internos e externos nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Mutações nestes genes conduzem a uma reparação ineficiente do DNA, contribuindo para a instabilidade genómica, a qual pode culminar com o desenvolvimento de cancro. [Adaptado de (2)]

Os indivíduos com SHCMO são frequentemente sujeitos a técnicas imagiológicas de diagnóstico que utilizam radiação ionizante, nomeadamente, as mulheres iniciam a vigilância através de mamografia a partir dos 30 anos de idade. Assim, é fundamental entender o papel das doses de radiação ionizante de diagnóstico em indivíduos com esta síndrome e verificar se

existem diferenças na capacidade de reparação de lesões entre portadores e não portadores de mutações nos genes *BRCA1/2*. Desta forma, na tentativa de esclarecer se, de facto, os indivíduos portadores são mais radiosensíveis, diversos estudos de *coorte* retrospectivos têm sido realizados ao longo dos anos, em humanos, para avaliar os efeitos da exposição a doses correspondentes a radiografias ao tórax ou a mamografias, no risco de desenvolvimento de cancro, nomeadamente de cancro da mama (Tabela 2) (2,58).

Em 1997, um estudo desenvolvido por Sharan *et al.* abordou pela primeira vez a hipótese de que indivíduos portadores de mutações no gene *BRCA2* poderiam apresentar maior sensibilidade à radiação ionizante quando comparados com a população geral. Este estudo, embora inconclusivo, foi crucial, pois levantou preocupações relativamente às possíveis consequências da exposição à radiação em indivíduos com mutações neste gene (59). Desta forma, anos mais tarde, em 2006, Narod *et al.* e Goldfrank *et al.* realizaram estudos de *coorte* retrospectivos com o objetivo de investigar se a exposição a doses de radiação ionizante, devido a mamografias, de indivíduos portadores de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* estava associada a um maior risco de desenvolvimento de cancro da mama. Relativamente ao estudo desenvolvido por Narod *et al.*, o mesmo envolveu um total de 3200 mulheres previamente identificadas com mutações nestes genes, 50% das quais haviam sido diagnosticadas com cancro da mama, enquanto as restantes eram portadoras saudáveis, constituindo o grupo controlo. Cada mulher incluída no estudo respondeu a um questionário no qual foi possível obter informações relativas ao número de mamografias previamente realizadas, bem como a idade do primeiro exame. Os resultados obtidos não mostraram qualquer associação entre a realização de mamografias e o risco de desenvolver cancro da mama (60). Em relação ao estudo de Goldfrank *et al.*, o mesmo incluiu 213 mulheres, previamente diagnosticadas com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e que iniciaram o rastreio com mamografia entre os 25 e os 30 anos de idade. Das 213 mulheres, 85 haviam sido diagnosticadas com cancro da mama há pelo menos um ano. No início do estudo, todas as portadoras forneceram informações relativas ao número de mamografias realizadas, o número de mamografias realizadas nos últimos 12 meses e a idade da primeira mamografia. Desta forma, foi possível estimar as doses cumulativas a que as portadoras estiveram expostas ao longo da vida. Para as portadoras diagnosticadas com cancro da mama há menos de um ano, a exposição a radiação ionizante foi calculada através da subtração do número de mamografias recebidas no ano anterior ao diagnóstico ao número total de mamografias realizadas ao longo da vida. Os autores obtiveram um risco relativo de 0,94,

não encontrando qualquer associação entre a exposição a doses de mamografia e o desenvolvimento de cancro da mama (61).

Mais tarde, em 2013, outro estudo de *coorte* retrospectivo desenvolvido por John *et al.* investigou a influência das doses de radiação devidas a radiografias ao tórax no desenvolvimento de cancro da mama. Neste estudo foram incluídas 454 portadoras de mutações no gene *BRCA1* e 273 portadoras de mutações no gene *BRCA2*, com idade inferior a 50 anos. De entre os envolvidos, 261 (36%) tinham história pregressa de cancro da mama. Os resultados obtidos não suportam uma relação positiva entre a realização de radiografias ao tórax e o desenvolvimento de cancro da mama antes dos 50 anos de idade (62).

Em contraste com os estudos apresentados anteriormente, sem associação entre a exposição a radiação ionizante associada a exames de diagnóstico e o desenvolvimento de cancro da mama, outros estudos desenvolvidos foram capazes de mostrar uma associação positiva. O estudo de *coorte* retrospectivo realizado em 2006 por Andrieu *et al.* analisou a relação entre a realização de radiografias ao tórax ao longo da vida, excluindo mamografias, e o risco de desenvolver cancro da mama. O estudo incluiu 1601 mulheres portadoras de mutações *BRCA*: 1187 portadoras da mutação *BRCA1* e 414 portadoras da mutação *BRCA2*. Das 1601 mulheres, 853 tinham sido diagnosticadas com um tumor mamário. Os autores concluíram que qualquer exposição torácica a radiação X aumentava a probabilidade de desenvolver este tipo de cancro, comparativamente com a população em geral, com um *hazard ratio* de 1,54. Adicionalmente, os autores verificaram que as mulheres, com menos de 20 anos, que realizaram este exame tinham um risco de desenvolver cancro da mama primário ainda maior. Desta forma, este estudo apoia a hipótese de que indivíduos portadores de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são mais sensíveis à radiação ionizante quando comparados com a população em geral (63).

Anos mais tarde, em 2012, Pijpe *et al.* desenvolveram também um estudo de *coorte* retrospectivo incluído no Projeto GENE-RAD-RISK, no qual estudaram 1993 portadoras de mutações nos genes *BRCA*, com idade superior a 18 anos, e que já haviam sido incluídos em três grandes estudos - GENEPSO, realizado na França, EMBRANCE, no Reino Unido, e HEBON, na Holanda. Tal como no estudo anterior, os autores observaram uma relação positiva entre qualquer exposição a radiação ionizante num exame de diagnóstico antes dos 30 anos e o risco de desenvolver cancro da mama, com um *hazard ratio* de 1,90. Ainda, concluíram que o risco aumenta com o aumento do número de radiografias realizadas. Contudo, não foi encontrada

uma relação entre a realização destes exames entre os 30 e 39 anos de idade e o desenvolvimento de cancro da mama (64).

Finalmente, mais recentemente, em 2016 e 2017, Baert *et al.* realizaram dois estudos nos quais foram observadas diferenças estatisticamente significativas na radiosensibilidade de indivíduos com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* quando comparados com não portadores. O estudo desenvolvido em 2016 estudou 18 portadores e 18 não portadores de mutações nos genes *BRCA1*, através da realização do ensaio de micronúcleos, após a exposição das células a doses de 2 e 4 Gy. Os resultados obtidos mostraram diferenças com significado estatístico entre portadores e não portadores de mutações *BRCA1*, verificando que 72% dos portadores apresentaram um fenótipo radiosensível, contrariamente a 72% do grupo controlo (65). Um ano mais tarde, em 2017, com o intuito de avaliar se os mesmos resultados eram obtidos para portadores de mutações no gene *BRCA2*, um segundo estudo foi realizado utilizando os mesmos métodos. O estudo incluiu amostras de sangue de 18 portadores e de 17 não portadores, pertencentes a famílias com mutações no gene *BRCA2*, a partir das quais se obtiveram linfócitos sanguíneos. Posteriormente, estes foram irradiados com radiação  $\gamma$  com a dose de 2 Gy proveniente de uma fonte de cobalto-60. Tal como no primeiro estudo, os resultados mostraram diferenças estatisticamente significativas entre portadores e não portadores de mutações no gene em estudo (66). Desta forma, os resultados mostram que indivíduos portadores de mutações nos genes *BRCA1/2* são mais radiosensíveis comparativamente a não portadores. Baseado nestas conclusões, os autores reforçam a importância de controlar a exposição a radiação ionizante em indivíduos portadores de mutações nestes genes, quer seja para exames de diagnóstico, quer seja para fins terapêuticos.

Tendo em conta os estudos apresentados, apesar do interesse crescente em tentar entender se a exposição a radiação ionizante em exames de diagnóstico tem efeitos em portadores de mutações nos genes *BRCA1/2*, até ao momento, as evidências são inespecíficas, havendo a necessidade de realizar mais estudos e clarificar o assunto.

**Tabela 2** - Resumo dos estudos desenvolvidos que avaliam os riscos associados à exposição a radiação ionizante, associada a técnicas imagiológicas de diagnóstico, em portadores de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

Autores	Ano	Amostra (n)	Gene	Exposição	Resultados
<b>Narold et al.</b> (60)	2006	3200 (1600 portadores com cancro da mama e 1600 sem)	<i>BRCA1/2</i>	Mamografia	Não foi encontrada associação entre a realização de mamografia e o risco de cancro da mama
<b>Goldfrank et al.</b> (61)	2006	213 portadores			
<b>John et al.</b> (62)	2013	727 (454 portadores de mutação <i>BRCA1</i> e 273 portadores de mutação <i>BRCA2</i> , idade < 50 anos)		Radiografia ao tórax	Não foi encontrada associação entre a realização de radiografia ao tórax antes dos 50 anos e o risco de cancro da mama
<b>Andrieu et al.</b> (63)	2006	1601 portadores			Foi encontrada uma associação positiva entre a realização de radiografia ao tórax e o risco de cancro da mama. O risco foi superior em mulheres com idade igual ou superior a 40 anos
<b>Pijpe et al.</b> (64)	2012	1993 portadores		<0,0020 Gy, ≥ 0,0020-0,0065 Gy, ≥ 0,0066-0,0173 Gy, ≥ 0,0174 Gy	Foi encontrada uma associação positiva entre a realização de radiografia ao tórax antes dos 30 anos e o risco de cancro da mama
<b>Baert et al.</b> (65)	2016	36 (18 portadores de mutações <i>BRCA1</i> e 18 não portadores)	<i>BRCA1</i>	2 e 4 Gy	Foi encontrada uma maior radiosensibilidade em indivíduos portadores de mutação no gene <i>BRCA1</i> comparativamente a controlos saudáveis
<b>Baert et al.</b> (66)	2017	35 (18 portadores de mutações <i>BRCA2</i> e 17 não portadores)	<i>BRCA2</i>	2 Gy	Foi encontrada uma maior radiosensibilidade em indivíduos portadores de mutação no gene <i>BRCA2</i> comparativamente a controlos saudáveis

Tendo em conta os resultados apresentados, alguns estudos realizados mostram que existe associação entre a exposição de indivíduos com SHCMO a doses empregues em exames de diagnóstico e o desenvolvimento de cancro. Além disso, alguns mostram que a idade e o número de exames têm influência no aumento do risco de desenvolver cancro. Na verdade, quanto mais jovem é o portador e quanto maior o número de exames realizados, maior o risco

de desenvolver cancro da mama primário (63,64). Assim, seria espectável que, atualmente, já existissem diretrizes específicas e definidas para portadores de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Contudo, apesar de cada vez mais se acreditar que esses indivíduos apresentam, de facto, maior sensibilidade à radiação ionizante quando comparados com a população em geral, não há evidências concretas suficientes para se ajustarem as diretrizes atuais, pelo que estes indivíduos continuam a estar expostos rotineiramente a radiação ionizante.

Assim, com o intuito de continuar a estudar a influência da exposição a radiação ionizante, empregue em algumas técnicas imagiológicas de diagnóstico, assim como clarificar o comportamento de indivíduos com SHCMO aquando da exposição, planificou-se o presente estudo.

## **2. Objetivo**



A síndrome hereditária de cancro da mama e ovário, causada maioritariamente por mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, é uma alteração genética caracterizada por um aumento do risco de desenvolvimento de diversas neoplasias em comparação com a população em geral, nomeadamente cancro da mama e cancro do ovário. Os indivíduos que apresentam esta síndrome são alvo de vigilância regular, a qual é realizada através de exames imagiológicos que envolvem a exposição a radiação ionizante (6). Apesar dos benefícios associados à mesma, como a sua utilização para diagnóstico e terapêutica, os riscos que dela poderão advir, como lesões em componentes críticos para o normal funcionamento da célula, fez com que, nos últimos anos, a questão da radiosensibilidade dos portadores de mutações nos genes *BRCA* tivesse sido amplamente estudada.

Assim, o presente estudo surgiu com o propósito de contribuir para o esclarecimento relativo aos possíveis efeitos biológicos decorrentes da exposição de indivíduos diagnosticados com SHCMO a radiação ionizante. Por forma a estratificar o risco associado à exposição, estudaram-se indivíduos portadores de mutações no gene *BRCA2*, assim como não portadores, pertencentes a famílias com a síndrome, através da colheita de amostras de sangue periférico para posterior obtenção de linhas celulares linfoblastoides. Estas são constituídas por linfócitos B imortalizados, possibilitando a avaliação dos efeitos decorrentes da exposição a dose cumulativa, assim como os efeitos em tempos mais tardios, considerando o tempo de latência, sem que haja perda das propriedades dos linfócitos. Após a imortalização, estas linhas celulares foram mantidas em cultura, expostas a radiação ionizante e avaliadas no que diz respeito à atividade metabólica, viabilidade celular e tipos de morte celular e genotoxicidade.



### **3. Materiais e Métodos**



De modo a esclarecer a influência da exposição a radiação ionizante em indivíduos portadores de mutações no gene *BRCA2*, assim como em não portadores, pertencentes a famílias com SHCMO, realizou-se o presente projeto. Este resulta da colaboração de diversas entidades, nomeadamente, do Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC) e do serviço de Oncologia Médica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG). O projeto foi submetido às comissões de ética destas duas instituições, das quais se obteve um parecer favorável (Anexos 1,2).

### **3.1. Amostra**

Foram colhidas e incluídas amostras de sangue de portadores e não portadores de variantes causais nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Todos os indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos, com e sem mutações confirmadas nestes genes, através da realização de teste genético, foram elegíveis para a participação no estudo. Contudo, os portadores de variantes cujo significado clínico não era conhecido foram excluídos.

Os indivíduos portadores de mutações *BRCA* incluídos no projeto foram recrutados através de consultas de Risco Familiar do serviço de Oncologia Médica do IPOCFG, realizadas entre o dia 10 de janeiro de 2022 e o dia 13 de junho de 2022. O indivíduo não portador destas mutações foi recrutado através da consulta de Genética Médica do serviço de Oncologia Médica do IPOCFG, realizada no dia 4 de maio de 2022. Por forma a garantir o anonimato dos mesmos ao longo do processo, a cada amostra foi atribuído um número (100 a 114), tendo em conta a ordem pela qual foi realizada a colheita de sangue. Este número foi utilizado para identificar as amostras e as informações relativas a cada indivíduo.

Para estudar a questão da radiosensibilidade na SHCMO, os participantes foram divididos em dois grupos, o grupo controlo e o grupo de portadores. O grupo controlo foi constituído pelo indivíduo não portador de mutações nos genes *BRCA1/2*, confirmado através de teste genético por pertencer a uma família com portadores de mutações nesses genes.

### **3.1.1. Caracterização da amostra**

A todos os indivíduos que aceitaram colaborar no presente estudo, foi solicitada a realização de um inquérito (Anexo 3) através do qual foram recolhidos dados sociodemográficos, nomeadamente, o sexo, a idade e o local de residência; dados antropométricos, como o peso e a altura, permitindo o cálculo do índice de massa corporal (IMC); antecedentes patológicos médicos (oncológicos relacionados e não relacionados com a SHCMO, cardiovasculares, entre outros); e hábitos pessoais, particularmente hábitos tabágicos, prática de exercício físico e ingestão diária de água. Adicionalmente, dados relativos à exposição a radiação ionizante, em termos qualitativos e quantitativos, foram também recolhidos.

A dose efetiva cumulativa, para cada indivíduo, foi calculada através da soma das doses correspondentes a cada exame realizado com recurso a radiação ionizante. Para tal, consideraram-se como valores de referência dos exames radiológicos os valores apresentados no documento Dose Datamed II Portugal – Avaliação da exposição da população portuguesa a radiações ionizantes devido a exames médicos de Radiodiagnóstico e Medicina Nuclear. Contudo, devido à ausência de informação em relação a alguns tipos de tomografia computadorizada, os valores da dose efetiva para esses exames foram calculados através da multiplicação do valor de *dose length product* (DLP) descrito para Portugal, no estudo de Santos *et al.*, pelos fatores k (67). Relativamente aos exames que empregam radiação ionizante, para os quais não existiam dados portugueses, usou-se a estimativa de dose, internacionalmente aceite.

### **3.1.2. Colheita da amostra sanguínea**

Cada indivíduo incluído no projeto foi submetido a uma punção venosa periférica na flexura cubital para a colheita de uma amostra de cerca de 10 mL de sangue periférico, realizada nos serviços de Patologia Clínica do IPOCFG. A amostra de cada participante foi colocada num tubo de colheita heparinizado (Heparin Tubes, BD Vacutainer®, United Kingdom).

## **3.2. Estabelecimento de linhas celulares linfoblastoides**

Após a colheita, as amostras sanguíneas foram processadas no Laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC, por forma a obter linhas celulares linfoblastoides (LCLs, do

inglês *lymphoblastoid cell lines*). Estas resultam da infeção, *in vitro*, de células B humanas com o vírus Epstein-Barr (EBV, do inglês *Epstein-Barr virus*), conduzindo a alterações que as fazem crescer indefinidamente (população celular com proliferação contínua). Estas linhas celulares imortalizadas trouxeram inúmeras vantagens para a investigação ao possibilitarem o fornecimento ilimitado de linfócitos B de cada participante, minimizando a necessidade de colheita repetida de sangue e permitindo a realização de estudos mais prolongados (68,69).

O protocolo iniciou-se com o isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) usando os diferentes gradientes de densidade através da centrifugação do sangue periférico na solução Histopaque®. Para tal, adicionaram-se 3 mL da referida solução a um tubo, homogeneizou-se o sangue por forma a evitar a formação de coágulos e colocaram-se, lentamente, cerca de 5 mL de sangue periférico por cima do Histopaque®, criando duas camadas distintas. Posteriormente, centrifugou-se a mistura durante 20 minutos, a 1400 rpm (Heraeus Labofuge 400; raio do rotor 17,4 cm), com redução gradual da velocidade no período final da centrifugação de modo a evitar a destruição do anel de PBMCs. A Figura 8 representa a distribuição dos diferentes constituintes do sangue após a centrifugação.



**Figura 8** - Distribuição dos diferentes constituintes do sangue periférico após centrifugação, durante 20 minutos, a 1400 rpm (Heraeus Labofuge 400; raio do rotor 17,4 cm). O plasma, ao ser a camada mais leve, localiza-se no topo. Imediatamente abaixo, localiza-se o anel de PBMCs seguido do Histopaque® e, finalmente, a camada mais pesada, constituída por granulócitos e eritrócitos.

Seguidamente, com a ajuda de uma micropipeta, o anel das PBMCs foi aspirado para um novo tubo para ser submetido a lavagem. Para tal, adicionaram-se 7 a 8 mL de solução de *Hank*

(HBSS, do inglês *Hank's Balanced Salt Solution*) às PBMCs aspiradas e centrifugou-se novamente durante 8 minutos, a 1200 rpm (Heraeus Labofuge 400; raio do rotor 17,4 cm). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. O procedimento correspondente à lavagem das células foi realizado até que o sobrenadante se tornasse rosado. Após a lavagem, o *pellet*, correspondente às PBMCs, foi adicionado a um frasco de cultura que continha 3 mL de meio de transformação. Este meio é constituído por *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, 20% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *fetal bovine serum*), 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (100U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina) e 1% de ciclosporina, sendo esta última responsável pela inibição da divisão celular dos linfócitos T, conduzindo à proliferação apenas de linfócitos B. Finalmente, adicionaram-se 1,5 mL de uma suspensão com vírus ao frasco de cultura. Dois e três dias após o isolamento de PBMCs e colocação em meio de transformação com EBV, adicionaram-se 2 e 1 mL de meio de transformação, respetivamente. Posteriormente, adicionou-se 1 mL desse mesmo meio de dois em dois dias até se observar a formação de LCLs. Durante o processo, as células foram mantidas numa atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), a 37°C, numa incubadora Panasonic (Figura 9).



**Figura 9** - Cultura de linhas células linfoblastoides obtidas a partir do sangue periférico de indivíduos portadores e do indivíduo não portador de mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. As linhas celulares foram mantidas numa atmosfera húmida, a 37°C, com 95% de ar e 5% de dióxido de carbono, numa incubadora Panasonic.

### 3.3. Cultura celular

A cultura celular consiste em métodos laboratoriais que possibilitam o crescimento de células em condições fisiológicas, em suspensão ou aderentes em monocamada, com origem numa linha celular, cultura primária ou tecido (70). O conhecimento dos procedimentos

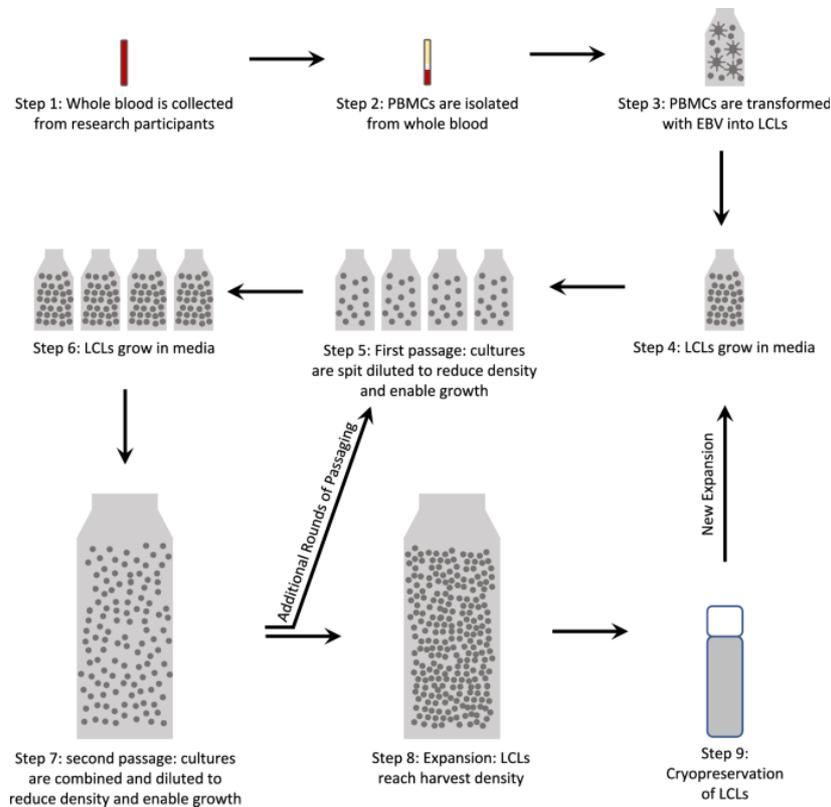
subjacentes à cultura celular, assim como das técnicas assépticas rigorosas e da morfologia celular, é essencial para a manutenção, *in vitro*, das culturas, livres de qualquer tipo de contaminação.

Após a transformação dos linfócitos B em LCLs, a qual durou cerca de 2 semanas, as células foram propagadas em culturas em suspensão, mantidas a 37°C, numa atmosfera humidificada com 95% de ar, 5% de CO<sub>2</sub>, numa incubadora Panasonic e cultivadas em meio completo, constituído por RPMI 1640, 20% de FBS e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina, até que estivessem em condições ótimas para congelamento.

Para a concretização dos estudos foi essencial realizar a manutenção das células em cultura. Assim, a cada 2-3 dias, a cultura em suspensão foi colocada com novo meio até que as células atingissem uma concentração de cerca de 10<sup>6</sup> células/mL, correspondente a uma confluência elevada, ou seja, um elevado número de agregados, de elevadas dimensões, característicos destas linhas celulares. Quando este ponto foi atingido, as LCLs foram divididas por forma a continuarem a crescer.

A criopreservação de LCLs foi realizada utilizando um meio de congelamento constituído por 90% de FBS e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, do inglês *dimethyl sulfoxide*), o qual corresponde a um agente crioprotetor. Trata-se de um processo no qual se utilizam temperaturas muito baixas para preservar células ou tecidos vivos estruturalmente intactos, por qualquer período de tempo. O meio de congelamento foi adicionado às células e, posteriormente, a suspensão foi dividida por tubos de congelamento, os quais foram colocados durante 30 minutos em gelo normal, 30 minutos em gelo seco e, finalmente, em azoto líquido até à sua utilização.

O processo subjacente à formação de LCLs, desde a colheita do sangue periférico até à criopreservação, encontra-se representado na Figura 10 (71).



**Figura 10** - Diagrama da formação de linhas celulares linfoblásticas (LCLs), expansão e criopreservação. O sangue total foi colhido e as células mononucleares do sangue periférico foram isoladas e transformadas em LCLs, através da infecção com o vírus Epstein-Barr. As linhas celulares cresceram em meio de cultura e, quando atingiram elevada concentração, foram divididas em subculturas diluídas, permitindo o crescimento contínuo ao longo do tempo. Quando a cultura atingiu uma elevada densidade celular, as células foram criopreservadas. [Adaptado de (71)]

### 3.4. Extração de DNA

As linhas celulares linfoblásticas obtidas após infecção pelo vírus Epstein-Barr, como mencionado, permitiram o fornecimento ilimitado de linfócitos B sendo, conseqüentemente, uma fonte ilimitada de DNA humano. Desta forma, após a formação de LCLs de cada um dos indivíduos envolvidos no presente estudo, procedeu-se à extração de DNA.

A extração de DNA genómico, realizada pela primeira vez em 1869 pelo médico suíço Friedrich Miescher, é um método crucial utilizado em biologia molecular que possibilita o isolamento de DNA a partir de qualquer material biológico. Para tal, esta técnica envolve,

primeiramente, a lise das membranas celulares e consequente exteriorização do DNA, seguida da remoção dos outros componentes celulares da solução, como restos de membranas, proteínas e RNA. O uso deste método deve conduzir à extração eficiente da biomolécula em causa, no que diz respeito ao seu grau de pureza (qualidade) e quantificação (concentração) (72,73).

Relativamente à pureza, esta é avaliada através da razão entre a absorvância com um comprimento de onda de 260 nm, a absorvância máxima dos ácidos nucleicos, e a absorvância com 280 nm, a absorvância máxima de proteínas. O DNA de boa qualidade deverá apresentar valores próximos ou superiores a 1,8, que indicam uma pureza adequada, enquanto valores abaixo podem indicar a presença de proteínas ou de outros contaminantes, como compostos fenólicos. Adicionalmente, a razão entre a absorvância nos 260 nm e nos 230 nm é amplamente utilizada como medida secundária da pureza de DNA, com valores entre 2 e 2,2. Caso a razão seja consideravelmente inferior, pode indicar a presença de contaminantes que absorvem nos 230 nm, como o EDTA (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*), proteínas, hidratos de carbono, lípidos e sais (74).

Em relação à quantificação, crucial para muitas aplicações de biologia molecular, o método mais utilizado é a espectrofotometria, na qual a amostra é exposta a luz ultravioleta com comprimento de onda de 260 nm e medida a quantidade de luz absorvida pelo DNA em solução. Quando maior a absorção, maior a concentração de DNA presente na amostra. No final, de acordo com a lei de Beer-Lambert, é possível relacionar a quantidade de luz absorvida com a concentração da molécula que a absorve (74). Desta forma, sabendo que o valor de absorvância de 1 corresponde a uma concentração de 50 µg de DNA/mL, é possível calcular a concentração de DNA obtida em cada amostra.

$$\text{Concentração } \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = A_{260} \times \text{fator de diluição} \times 50 \mu\text{g/mL} \quad (1)$$

Atualmente, diversos protocolos são empregues para realizar a extração de DNA. A escolha dependerá de diversos fatores, nomeadamente o tipo de tecido utilizado e o grau de pureza e de integridade necessária para a aplicação em que o DNA será usado.

O protocolo utilizado no projeto, pelo Laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC, teve como base a separação de DNA por adsorção seletiva em partículas de sílica, utilizando o *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche). Primeiramente, as amostras foram incubadas com um *Lysis Buffer*, responsável pela lise das células, e com a proteinase K, a qual

conduziu à clivagem das proteínas. De seguida, colocou-se o DNA em contacto com a superfície de sílica, o qual se liga seletivamente à mesma. Os restantes componentes celulares foram removidos durante etapas de lavagem à base de álcool, através de centrifugações sucessivas. Após a ligação e lavagem, o DNA foi eluído com água.

A extração de DNA, no presente estudo, teve como intuito isolar e manter o DNA de todos os indivíduos portadores e não portadores de mutações nos genes *BRCA1/2* envolvidos no projeto, caso seja necessário utilizar futuramente, por exemplo, para caracterizações moleculares adicionais que envolvam o DNA, não necessitando de uma nova colheita de sangue.

### **3.5. Tempo de duplicação da população**

A taxa de crescimento de uma população, isto é, quão rápido o tamanho da população varia ao longo do tempo, é uma característica fundamental de qualquer cultura celular, podendo ser afetada por diversos fatores, como a presença de fármacos ou toxinas, a temperatura e as alterações genéticas (75).

A medida mais comum para avaliar a taxa de crescimento de uma cultura celular é o tempo de duplicação da população (DT, do inglês *doubling time*), o qual corresponde ao tempo que uma população celular leva para duplicar o seu tamanho (75). Esta medida possibilita um maior conhecimento relativo às características das linhas celulares em estudo, nomeadamente o seu crescimento, assim como uma melhor compreensão dos tempos subjacentes à atuação dos mecanismos de reparação celular.

Para o cálculo do DT procedeu-se, primeiramente, à determinação da concentração da cultura celular, adicionando-se a uma amostra da suspensão celular um volume igual da solução de azul de tripano, seguindo-se a contagem do número de células, através de uma câmara de Neubauer e de um microscópio ótico invertido (Motic AE31), com uma ampliação de 100x. Posteriormente, centrifugou-se a amostra durante 10 minutos, a 1000 rpm (Heraeus Multifuge 11L-R; raio do rotor 18,7 cm), descartou-se o sobrenadante e adicionou-se meio de cultura por forma a manter as células numa concentração de  $0,5 \times 10^6$  células/mL. No final, colocaram-se 100  $\mu$ L em cada poço de uma placa de 96 poços de fundo redondo, em triplicado. As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, numa incubadora Binder® (Binder, Alemanha). Diariamente, durante 8 dias, determinou-se o tamanho da população celular, ou seja, o número

de células vivas, o qual está associado à taxa de crescimento, através do método de exclusão por azul de tripano. Finalmente, o tempo de duplicação da população foi determinado, através das equações:

$$\text{population doubling time} = \frac{\ln 2}{gr} \quad (2), \text{ com } gr = \frac{\ln(C_2 \div C_1)}{(t_2 - t_1)} \quad (3),$$

onde  $C_1$  e  $C_2$  correspondem às concentrações nos tempos  $t_1$  e  $t_2$ , respetivamente.

### 3.6. Morfologia celular

A morfologia celular, estudada com recurso a microscopia, diz respeito às características morfológicas das células, nomeadamente a forma e o tamanho. Assim, com o intuito de conhecer melhor as linhas celulares em estudo, procedeu-se à análise morfológica das células.

O protocolo iniciou-se com a determinação da concentração da cultura celular através do método de exclusão por azul de tripano. De seguida, adicionaram-se 200 000 células a um tubo, centrifugou-se durante 5 minutos, a 2500 rpm (Heraeus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18,7 cm) e descartou-se o sobrenadante, com ressuspensão do *pellet* em 50  $\mu$ L de FBS. Realizou-se um esfregaço das células em lâminas (Normax, Portugal) previamente limpas com metanol e deixaram-se a secar durante 30 minutos. Posteriormente, fixaram-se as células em metanol durante 5 minutos e procedeu-se à coloração das lâminas com Giemsa (Merck, Germany) a 4% em água destilada durante 15 minutos, no escuro.

Finalmente, no dia seguinte, foi utilizado o microscópio ótico Nikon Eclipse 80i, equipado com Nikon Digital Camera DXM 1200F, para observação das células.

### 3.7. Irradiação

#### 3.7.1. Tomografia Computorizada

De modo a irradiar as linhas celulares com raios-X de diagnóstico, foi preparada uma suspensão celular com concentração conhecida, de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, e adicionada em microtubos, previamente identificados com o código de identificação do participante e com a

respetiva condição: controlo (não sujeito a irradiação) ou irradiado, com cada condição em duplicado. Em todos os microtubos foi colocado o mesmo volume de LCLs (2,2 mL) e todos foram preparados e mantidos nas mesmas condições. A irradiação foi realizada no serviço de Imagiologia do Hospital da Luz de Coimbra recorrendo a um fantoma.

As amostras foram irradiadas com doses cumulativas num esquema fracional, ou seja, a irradiação foi realizada uma vez por semana, durante 4 semanas, por forma a mimetizar o que acontece na prática clínica e considerando que o tempo entre os procedimentos imagiológicos pode representar uma resposta biológica relevante nos efeitos da radiação ionizante.

A cada semana, as amostras foram irradiadas com doses correspondentes a CT lombares. Para tal, utilizou-se o *computed tomography dose index (CTDI) body phantom* de polimetilmetacrilato (PMMA), um fantoma de controlo de qualidade de CT. Este fantoma tem orifícios que possibilitam a colocação dos microtubos no seu interior por forma a serem irradiados. Para simular a CT lombar, foi usado um tomógrafo da Siemens, SOMATOM® *Definition Flash*, do serviço de Imagiologia do Hospital da Luz de Coimbra. O fantoma foi colocado alinhado com o centro da *gantry*, na mesa do tomógrafo, e os microtubos foram colocados nos orifícios externos do fantoma por forma a que a radiação sofresse reduzidas interações até os atingir (Figura 11).



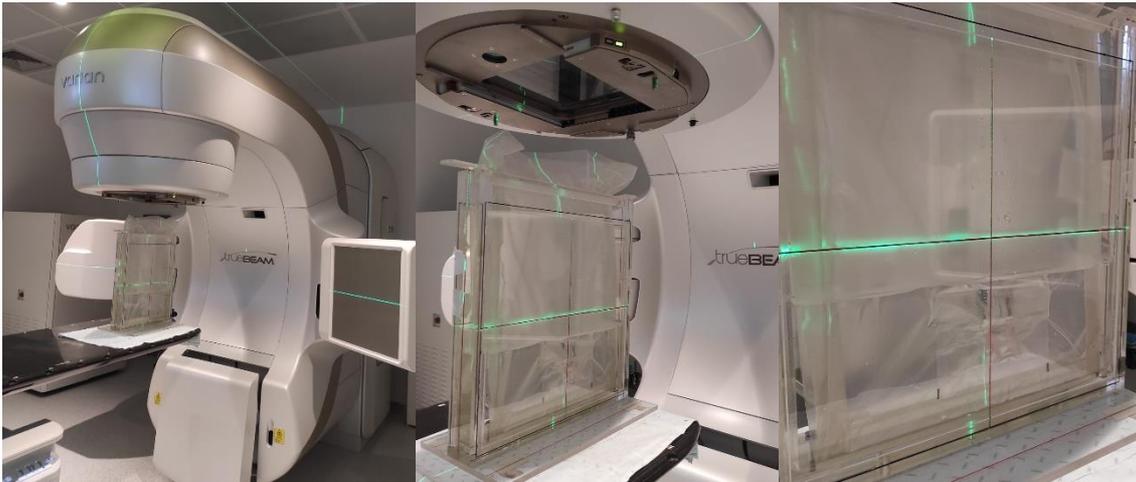
**Figura 11** - Fantoma empregue na irradiação das amostras com doses correspondentes a CT lombar. Os microtubos foram colocados nos orifícios externos do fantoma, o qual se encontrava alinhado com o centro da *gantry*.

Antes das irradiações, realizou-se um topograma usando uma tensão na ampola de 120 kV e uma corrente de 35 mA. O topograma consiste numa imagem digital semelhante à radiografia convencional realizado com o intuito de planear a CT subsequente. Relativamente às CT lombares, na primeira, utilizou-se uma tensão na ampola de 140 kV, com um valor do produto entre a corrente e o tempo de 350 mAs e um *pitch* de cerca de 1. A CTDI volumétrica (CTDIvol), a qual representa a dose através de uma fatia do fantoma, foi de 34,27 mGy e o DLP, o qual corresponde ao produto de CTDIvol pelo comprimento do *scan*, de 668,9 mGy.cm. Utilizando 0,015 como fator de conversão, obteve-se uma dose efetiva de CT lombar de 10,03 mSv. Na segunda CT utilizou-se uma tensão na ampola de 140 kV, um valor do produto entre a corrente e o tempo de 600 mAs e um *pitch* de cerca de 1. A CTDIvol foi de 58,58 mGy e o DLP de 1143,7 mGy.cm. Utilizando 0,015 como fator de conversão, obteve-se uma dose efetiva de CT lombar de 17,16 mSv. Desta forma, semanalmente, as amostras foram submetidas a uma dose efetiva total de 27,19 mSv.

### 3.7.2. Radioterapia

De modo a irradiar as linhas celulares com raios-X com dose terapêutica, foi preparada uma suspensão celular com uma concentração conhecida, de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, e adicionada a microtubos de 1,5 mL, previamente identificados com o código de identificação do participante e com a respetiva condição: controlo ou irradiado, com cada condição em duplicado. Em todos os microtubos foi colocado o mesmo volume de LCLs e todos foram preparados e mantidos nas mesmas condições. A irradiação foi realizada no serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), com o acelerador linear Truebeam da Varian (Figura 12).

As amostras foram expostas a radiação correspondente a uma dose efetiva de 2 Sv através de duas incidências ( $90^\circ$  e  $270^\circ$ ), com o intuito de obter um controlo positivo para as linhas celulares em estudo, através da replicação da experiência de Baert *et al.* (66). Para tal, as amostras foram colocadas num fantoma preenchido com água (Figura 12) uma vez que se conhece melhor o comportamento da radiação em meio líquido e para que as células fossem expostas a uma dose precisa.



**Figura 12** - Acelerador linear Truebeam (Varian). O acelerador foi empregue com o intuito de irradiar amostras de LCLs obtidas a partir de indivíduos portadores de mutação *BRCA2* com uma dose efetiva de 2Sv, as quais foram previamente colocadas num fantoma de água.

### 3.8. Avaliação da atividade metabólica

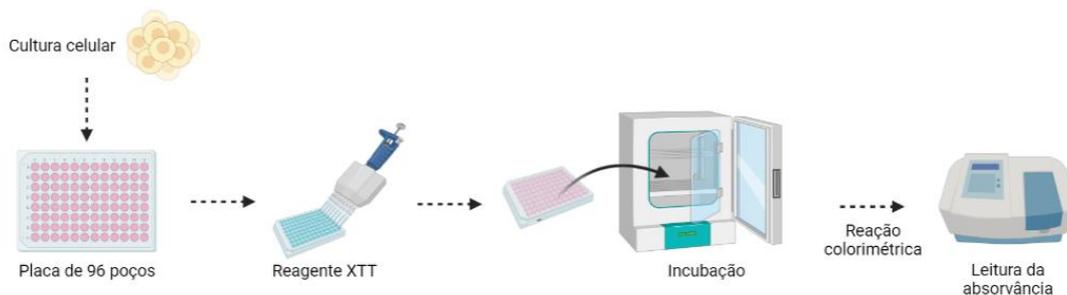
Existem diferentes métodos que possibilitam o estudo dos efeitos da exposição à radiação ionizante. Após a irradiação das amostras, utilizou-se um método de espectrofotometria, o ensaio do XTT, de modo a avaliar os efeitos na atividade metabólica e, conseqüentemente, na proliferação celular.

O ensaio do XTT (2,3bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5[(fenilamino)carbonilo] -2H-tetrazolio) de sódio), descrito pela primeira vez em 1988, por Scudiero *et al.*, é um ensaio colorimétrico empregue para quantificar a atividade metabólica celular como um indicador de proliferação e citotoxicidade celulares. Trata-se de um método que se baseia na redução de XTT, um sal incolor ou levemente amarelado, a formazano, de cor laranja, pelas enzimas desidrogenases mitocondriais presentes em células metabolicamente ativas. O produto de clivagem do XTT é solúvel em soluções aquosas e quantificado, de forma direta, através de um espectrofotómetro de leitura de microplacas. Uma maior atividade metabólica está associada a uma maior atividade das desidrogenases que, por sua vez, está associada a uma maior quantidade de formazano em solução (76). A sensibilidade deste ensaio é melhorada através da utilização de um transportador de elétrons intermediário, o metil sulfato de N-metil dibenzopirazina (PMS), o qual ajuda na redução do XTT e na formação de formazano.

Primeiramente, antes da realização do ensaio, prepararam-se os reagentes necessários: XTT e PMS. Relativamente ao XTT, preparou-se uma solução com concentração inicial de 1 mg/mL em RPMI, com agitação em vórtex para homogeneizar, filtrou-se e armazenou-se o reagente a -20°C, protegido da luz. Em relação ao PMS, preparou-se uma solução com concentração inicial de 1,25 mM, assim como alíquotas de 200 µL que também se armazenaram a -20°C, protegidas da luz.

Por forma a investigar os efeitos da exposição a radiação ionizante na atividade metabólica, após cada irradiação, as LCLs, irradiadas e não irradiadas (controlo), foram cultivadas numa placa de 96 poços, numa concentração de  $0,5 \times 10^6$  células/mL (50 000 células/poço), durante 7 dias. Posteriormente, 50 µL das soluções de reação homogénea de XTT e de PMS, previamente preparadas na proporção 50 µL XTT + 1 µL PMS, foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, numa incubadora Binder®, durante cerca de 4 horas, ao abrigo da luz. Finalmente, os resultados da reação química do ensaio do XTT (absorvância) foram medidos através de um espectrofotómetro (PerkinElmer, EnSpire® Multimode Plate Reader), com o comprimento de onda a 450 nm.

O protocolo correspondente ao ensaio do XTT encontra-se esquematizado na Figura 13:



**Figura 13** - Esquema representativo do protocolo do ensaio do XTT, utilizado no estudo da atividade metabólica. Figura criada com recurso ao Biorender.

### 3.9. Avaliação da viabilidade celular e tipos de morte celular

A citometria de fluxo é uma técnica importante empregue com o intuito avaliar, simultaneamente e num curto período de tempo, diversas características das células ou outras partículas biológicas microscópicas que se encontram em suspensão num meio líquido. Esta técnica tem como princípio a utilização de um fluxo de partículas que se dispõem umas a seguir

às outras, interagindo com um feixe de luz de um único comprimento de onda, permitindo a formação de um sinal (dispersão e/ou emissão de luz por fluorocromos), capaz de ser detetado por detetores. A combinação de luz dispersa e fluorescente permite explorar vários tipos de informação sobre cada partícula individual (77,78).

Neste projeto, a citometria de fluxo foi utilizada para avaliar os efeitos decorrentes da exposição das LCLs a radiação ionizante utilizada em diagnóstico a nível da viabilidade celular e dos tipos de morte celular (apoptose e necrose), através da dupla marcação com dois fluorocromos diferentes, a anexina V (AnV) e o iodeto de propídeo (IP). A AnV, ao ligar-se com elevada afinidade à fosfatidilserina, um fosfolípido presente na bicamada lipídica, permite identificar células em apoptose já que se transloca do folheto interno para o folheto externo da membrana. Por outro lado, o IP é um marcador fluorescente que apresenta a capacidade de se intercalar no DNA das células. No entanto, a membrana das células é impermeável a este fluorocromo, pelo que este apenas intercala em células que tenham a membrana celular comprometida, como células em necrose ou em apoptose tardia. Desta forma, através da dupla marcação AnV/IP é possível agrupar e classificar a população celular em estudo em quatro grupos distintos: o grupo I, correspondente a células viáveis ou com nenhuma morte celular mensurável; o grupo II, que engloba células que se encontram em apoptose inicial, onde a integridade da membrana celular se mantém intacta; o grupo III, que corresponde a células que se encontram em apoptose tardia/necrose; e o grupo IV, que contabiliza células em necrose. Assim, cada um dos grupos possui um perfil de marcação característico (Tabela 3) (79,80).

**Tabela 3** - Padrões de marcação com Anexina V/Iodeto de Propídeo para os diferentes grupos celulares.

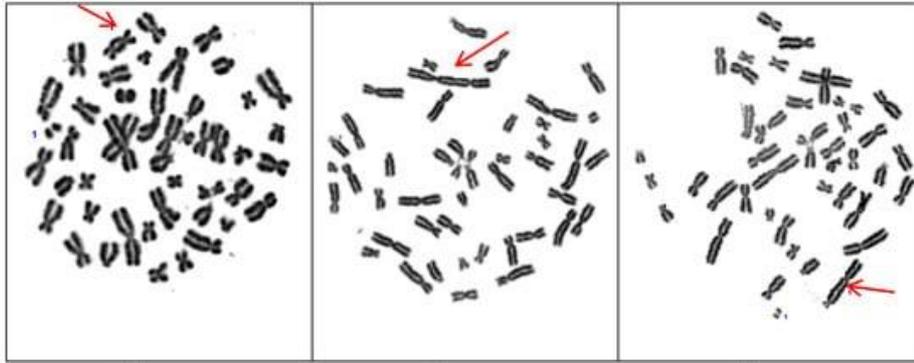
<b>Grupos</b>	<b>Anexina V</b>	<b>Iodeto de Propídeo</b>
<b>Grupo I</b> <b>Células vivas</b>	-	-
<b>Grupo II</b> <b>Células em apoptose inicial</b>	+	-
<b>Grupo III</b> <b>Células em apoptose tardia/necrose</b>	+	+
<b>Grupo IV</b> <b>Células em necrose</b>	-	+

Para realizar a citometria de fluxo utilizaram-se  $0,5 \times 10^6$  ou  $1 \times 10^6$  células de uma suspensão celular, obtidas após a centrifugação durante 5 minutos, a 2500 rpm (Heraeus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18,7 cm), com o intuito de obter tanto as células vivas como as mortas. O *pellet* obtido foi ressuspensão em PBS (do inglês *phosphate buffer saline*) 1X, para lavagem, e adicionado em tubos de citometria, com posterior centrifugação a 2500 rpm, durante 10 minutos. O *pellet* resultante foi ressuspensão em 100  $\mu$ L de tampão de ligação (1X) e as células foram incubadas em 2,5  $\mu$ L de AnV e 1  $\mu$ L de IP, durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, adicionaram-se 400  $\mu$ L de tampão de ligação (1X) e, seguidamente, realizou-se a análise no citómetro, utilizando os comprimentos de onda de excitação de 525 nm para a AnV e de 640 nm para o IP.

### 3.10. Avaliação da genotoxicidade

A genotoxicidade refere-se à capacidade de certos agentes químicos (genotoxinas) de conduzir a lesões no material genético contido no interior de uma célula (81). Embora a célula tenha diversos mecanismos envolvidos na reparação de danos no DNA, por vezes, eles falham. Desta forma, diversos testes foram desenvolvidos ao longo dos anos com o intuito de avaliar a genotoxicidade, nomeadamente o ensaio dos cromossomas dicêntricos e o ensaio de micronúcleos.

As aberrações cromossómicas são alterações que ocorrem no número ou na estrutura dos cromossomas. As aberrações cromossómicas numéricas verificam-se quando há um aumento ou diminuição do número de cromossomas, já as estruturais não alteram a quantidade de cromossomas numa célula, mas determinam o aparecimento de cromossomas anormais. Relativamente às aberrações estruturais, os cromossomas dicêntricos fazem parte das mesmas. Estes são cromossomas que apresentam dois centrómeros, resultantes de quebras de cadeia de DNA e conseqüente replicação anormal do cromossoma (Figura 14) (82). Os cromossomas dicêntricos são considerados os mais sensíveis e específicos para avaliar o efeito da radiação, mesmo para baixas doses efetivas ( $< 100$  mSv, de acordo com Abe *et al.*) (83). Adicionalmente, aumentos na dose de radiação produzem um número crescente destes cromossomas.



**Figura 14** - Exemplos representativos de cromossomas dicêntricos, obtidos após a irradiação de linfócitos de sangue periférico. As setas a vermelho representam os cromossomas dicêntricos. [Adaptado de (82)]

O ensaio dos cromossomas dicêntricos é um teste biodosimétrico bem estabelecido que se baseia no princípio de que a exposição a radiação conduz a lesões no DNA, como quebras de cadeia, em particular, DSBs (84).

O protocolo correspondente a este ensaio iniciou-se com a adição de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células a um frasco de cultura com 7,5 mL de meio (RPMI 1640, 20% FBS), o qual foi mantido durante 48 horas numa atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de  $\text{CO}_2$ , a  $37^\circ\text{C}$ , numa incubadora Panasonic. Posteriormente, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de colcemida (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), uma molécula inibidora do citoesqueleto microtubular, conduzindo à paragem da divisão celular quando a mesma atinge a metáfase e, de seguida, incubou-se novamente durante 2 horas. Após as 50 horas de incubação, centrifugaram-se as culturas, durante 3 minutos, a 1500 rpm (Heraeus Labofuge 400; raio do rotor 17,4 cm), descartou-se o sobrenadante para obtenção das células e adicionaram-se 10 mL da solução hipotónica de cloreto de potássio (KCl, 0,55g/mL, 10 minutos), procedendo-se a uma nova centrifugação nas mesmas condições. Seguidamente, adicionaram-se 10 mL da primeira solução fixadora composta por 92 mL de água destilada, 5 mL de ácido acético e 3 mL de metanol e levou-se novamente a centrifugar. Descartou-se o sobrenadante, adicionaram-se 10 mL de metanol, centrifugou-se novamente e, finalmente, adicionaram-se 10 mL da solução de fixação de metanol em ácido acético na proporção 3:1 em volume. Após a fixação, as células foram colocadas em lâminas e deixadas a secar durante a noite, à temperatura ambiente. No dia seguinte, procedeu-se à coloração das lâminas com Giemsa a 5% (Merck, Germany), durante 15 minutos, e procedeu-se à visualização dos cromossomas dicêntricos recorrendo ao microscópio ótico Nikon Eclipse 80i.

O micronúcleo é um fragmento de cromossoma, pequeno, redondo e com uma coloração semelhante à do núcleo, que permanece no citoplasma da célula após a sua divisão sendo, por isso, independente do seu núcleo principal. O micronúcleo pode resultar de lesões no DNA ou de instabilidade genómica, podendo surgir como resultado de processos naturais, como o metabolismo ou o envelhecimento, ou de fatores ambientais, hábitos ou doenças (85).

O ensaio de micronúcleos é um ensaio celular empregue na avaliação da genotoxicidade, tendo como unidade de observação a célula. Atualmente, existem diversos tipos de ensaios de micronúcleos, sendo o ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese, desenvolvido por Fenech e Moreley, o mais utilizado em células humanas. Dado que os micronúcleos são visíveis somente após a divisão celular, utiliza-se a citocalasina-B de forma a parar a citocinese, resultando na formação de células binucleadas, nas quais se realiza a contagem dos micronúcleos (86).

O protocolo do ensaio de micronúcleos teve início com a adição, 24 horas após a irradiação, de 15  $\mu\text{L}$  de citocalasina-B (concentração final de 6  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) a uma suspensão celular com  $0,5 \times 10^6$  células, de modo a parar a citocinese e se obterem células binucleadas. De seguida, colocaram-se novamente as células a incubar até perfazer cerca de 72 horas após a irradiação. Após as 72 horas, a cultura celular foi levada a centrifugar, a 900 rpm (Heraeus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18,7 cm), durante 10 minutos, para remover o meio de cultura. Depois, descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se, muito lentamente, 2 mL da solução de fixação metanol/ácido acético na proporção 3:1 em volume. Levou-se novamente a suspensão celular a centrifugar por 10 minutos a 900 rpm e, posteriormente, descartou-se o sobrenadante. Por fim, adicionaram-se 50  $\mu\text{L}$  da solução de fixação e colocaram-se, com o auxílio de uma micropipeta, 3 gotas de 10  $\mu\text{L}$  em lâminas (Normax, Portugal) previamente limpas com papel absorvente. Na manhã seguinte, procedeu-se à coloração das lâminas com Giemsa (Merck, Germany) a 4% em água destilada durante 15 minutos, no escuro.

Finalmente, foi utilizado o microscópio ótico Nikon Eclipse 80i para proceder à observação e contagem de micronúcleos.

O protocolo correspondente ao ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese encontra-se esquematizado na Figura 15:



**Figura 15** - Esquema representativo do protocolo do ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese, para avaliação da genotoxicidade. Figura criada com recurso ao Biorender.

### 3.11. Análise estatística

No projeto foi realizada a análise estatística dos resultados obtidos com recurso ao *software* GraphPad Prism® 9.00. Na análise descritiva, para as variáveis quantitativas, foram determinadas as medidas de tendência central, média e/ou mediana, e de dispersão, desvio-padrão.

A normalidade de distribuição de variáveis foi avaliada através do teste Shapiro-Wilk com o intuito de determinar o tipo de teste a utilizar, ou seja, no caso de uma distribuição normal utilizam-se testes paramétricos, contrariamente a uma distribuição não normal ou condições com  $n < 10$ , para as quais são empregues testes não paramétricos.

Uma vez que o presente estudo pretendia avaliar os efeitos decorrentes da exposição a radiação ionizante através da comparação de dois grupos independentes como, por exemplo, comparar a atividade metabólica entre o grupo de portadores e o grupo controlo para cada semana de irradiação, ou comparar os resultados obtidos através da citometria de fluxo para duas amostras distintas, realizou-se o teste estatístico Mann-Whitney.

Um nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ) foi considerado para todas as comparações.

## 4. Resultados



Os materiais e métodos mencionados no capítulo anterior foram empregues com o intuito de avaliar os efeitos decorrentes da exposição a radiação ionizante em linhas celulares linfoblastoides, obtidas a partir de sangue periférico de portadores e não portadores de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Os resultados obtidos encontram-se descritos no presente capítulo.

#### 4.1. Caracterização da amostra

Neste estudo, foram incluídos 15 indivíduos pertencentes a famílias com variantes patogénicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Destes, cerca de 93,3% (n=14) eram portadores de uma variante familiar, sendo identificadas 7 variantes: 3 no gene *BRCA1* e 4 no gene *BRCA2*, as quais se encontram discriminadas na Tabela 4. Entre as variantes em análise, a variante fundadora portuguesa (c.156\_157insAlu) foi a variante causal familiar com maior frequência, representando 40% (n=6) da amostra. A segunda variante com maior frequência foi a c.470\_471Delct (20%, n=3), seguida da variante c.5595\_5596delAT (13,33%, n=2). Finalmente, as variantes 5382InsC, c.1504\_1508del, c.3599\_3600del e c.1588A>T estiveram presentes unicamente em um indivíduo, representando 6,67% (n=1) dos casos para cada variante (Tabela 4).

**Tabela 4** - Variantes causais identificadas nas famílias incluídas no presente estudo.

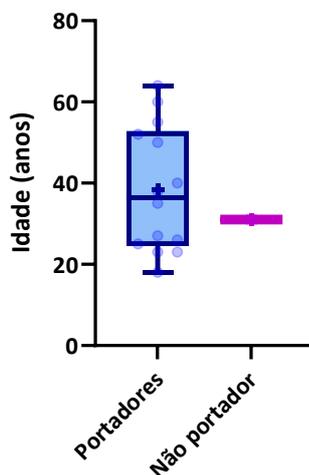
Gene	Variante	Não portadores de variantes causais (n)	Portadores de variantes causais(n)	Nº de famílias (n)
<b>BRCA1</b>	5382InsC	0	1	1
	c.470_471Delct	0	3	1
	c.1504_1508del	1	0	1
<b>BRCA2</b>	c.156_157insAlu	0	6	4
	c.3599_3600del	0	1	1
	c.5595_5596delAT	0	2	1
	c.1588A>T	0	1	1
<b>Total</b>		1	14	10

Relativamente aos dados sociodemográficos da amostra, o indivíduo não portador, o qual constitui o grupo controlo, era do género feminino (100%, n=1), enquanto, no grupo de portadores, 71,4% (n=10) eram do género feminino e 28,6% (n=4) do género masculino. A distribuição de género da nossa amostra encontra-se representada na Tabela 5.

**Tabela 5** - Distribuição da população em estudo, por grupo (portadores e não portador), tendo em conta o género.

Género	Não portador, n (%)	Portadores, n (%)
Feminino	1 (100%)	10 (71,4%)
Masculino	0	4 (28,6%)

Em relação às idades, no grupo controlo a idade foi de 31 anos. No grupo de portadores, a média de idades dos indivíduos foi de 38 anos e a mediana de 36,5 anos, tendo o indivíduo mais novo 18 anos e o mais velho 64 anos. A Figura 16 apresenta a distribuição de idades dos dois grupos.



**Figura 16** - Gráfico representativo da distribuição de idade dos indivíduos incluídos no estudo, por grupo (portadores e não portador), tendo em conta a média (cruz) e a mediana (segundo quartil) de idades, o primeiro quartil, o terceiro quartil e os valores mínimo (traço inferior) e máximo (traço superior).

Do ponto de vista profissional, o grupo controlo era constituído por uma empregada fabril (100%, n=1), enquanto no grupo de portadores 14,3% eram estudantes (n=2), e os

restantes 85,7% (n=12) tinham como ocupação profissional lavagem de automóveis, veterinário, chefe de equipa, canteiro, enfermeiro, auxiliar de jardim de infância, psicólogo, empregada doméstica, mediador de seguros, fruticultor, serralheiro ou desempregado (1 em cada).

No que diz respeito ao local de residência, o indivíduo não portador residia no distrito de Leiria, em Ansião (100%, n=1). Em relação aos indivíduos portadores, 35,7% (n=5) residiam no distrito de Coimbra (1 em Miranda do Corvo, 1 na Figueira da Foz, 1 em Coimbra e 2 na Carapinheira), 35,7% (n=5) residiam no distrito de Viseu (1 em Oliveira de Frades e 4 em Viseu) e 28,6% (n=4) residiam no distrito de Leiria (3 no Vimeiro e 1 em Fátima).

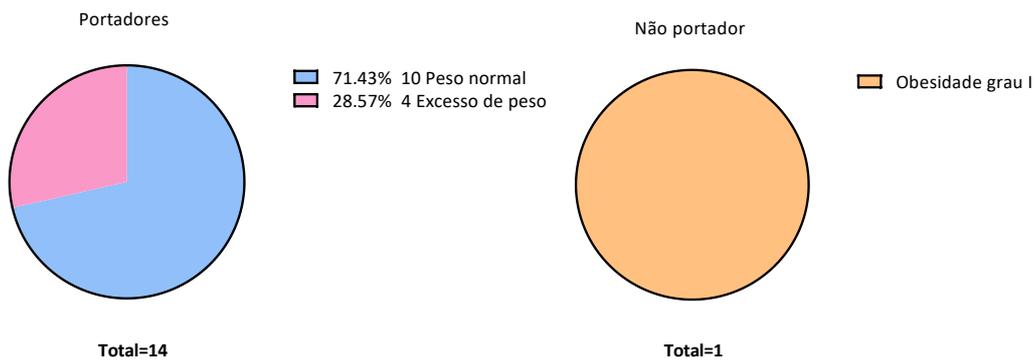
Relativamente aos dados antropométricos do grupo controlo, constituído apenas por um indivíduo, a massa corporal e a altura foram de 89 kg e 1,63 m, respetivamente. Nos portadores, a mediana da massa corporal foi de 63 kg, com uma massa corporal mínima de 50 e máxima de 82 kg, e a mediana da altura foi de 1,685 m, com altura mínima de 1,53 e máxima de 1,74 m. Para cada um dos indivíduos foi determinado o IMC, através da expressão  $IMC = \frac{Massa\ corporal\ (kg)}{(Altura(cm))^2}$ . Com base no IMC e de acordo com a Organização Mundial de Saúde, cada indivíduo foi inserido numa das categorias apresentadas na Tabela 6:

**Tabela 6** - Classificação segundo a Organização Mundial de Saúde, a partir do IMC.

Classificação	IMC (kg/m <sup>2</sup> )
Baixo Peso	Inferior a 18,5
Peso Normal	18,5 a 24,9
Excesso de Peso	25 a 29,9
Obesidade Grau I	30 a 34,9
Obesidade Grau II	35 a 39,9
Obesidade Mórbida	Superior ou igual a 40

Na Figura 17, estão representados os gráficos relativos à distribuição do IMC dos dois grupos em estudo. No diagrama da esquerda, correspondente ao grupo de portadores, observaram-se 10 indivíduos com peso normal (71,43%) e 4 com excesso de peso (28,57%), já no grupo controlo (diagrama da direita), o indivíduo apresentava obesidade de grau I.

## Suscetibilidade dos indivíduos portadores de mutações *BRCA1/2* à radiação de diagnóstico



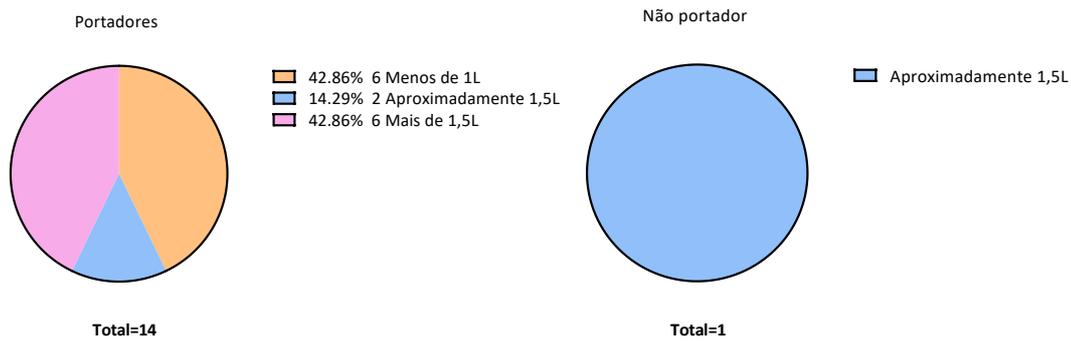
**Figura 17** - Gráfico representativo da distribuição do IMC dos indivíduos incluídos no estudo, por grupos: portadores, à esquerda, e não portador, à direita.

No que se refere aos hábitos, particularmente aos hábitos tabágicos, apenas um indivíduo pertencente ao grupo de portadores era fumador (7,14%).

Relativamente à atividade física, o indivíduo não portador não praticava qualquer tipo de atividade física, assim como 50% (n=7) dos indivíduos incluídos no grupo de portadores. Nos restantes indivíduos (50%, n=7) pertencentes a este último grupo, 57,2% praticavam caminhada ou corrida (2 em cada) e 42,8% fazia *crossfit*, hidroginástica ou BTT (1 em cada). No grupo de portadores, a duração da atividade física variava de 1 hora (caminhada, *crossfit*, corrida, hidroginástica) a 4 horas (BTT).

Em relação ao consumo diário de água, o indivíduo não portador (100%) ingeria aproximadamente 1,5 L de água por dia. No grupo de portadores, 42,86% (n=6) dos indivíduos ingeria menos de 1 L de água por dia, 14,28% (n=2) ingeria aproximadamente 1,5 L e 42,86% (n=6) ingeria mais de 1,5 L. Os dados relativos ao consumo diário de água em ambos os grupos encontram-se apresentados na Figura 18.

## Suscetibilidade dos indivíduos portadores de mutações *BRCA1/2* à radiação de diagnóstico



**Figura 18** - Gráfico representativo da distribuição da ingestão diária de água dos indivíduos incluídos no estudo, por grupos: portadores, à esquerda, e não portador, à direita.

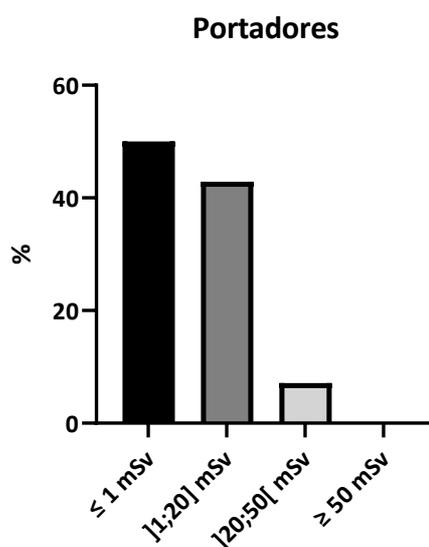
De todos os indivíduos incluídos no estudo, apenas 1 (7,14%), pertencente ao grupo de portadores, apresentava história clínica de doença oncológica (carcinoma da mama) associada à síndrome no momento da consulta de Risco Familiar. Os restantes (o indivíduo não portador,  $n=1$ , e 92,86% do grupo de portadores,  $n=13$ ) não apresentavam qualquer antecedente pessoal de doença oncológica.

Relativamente a outros antecedentes patológicos pessoais, apenas 3 indivíduos (21,43%) pertencentes ao grupo de portadores reportaram ter ou ter tido: hipertensão arterial (33,3%,  $n=1$ ), dislipidemia (66,6%,  $n=2$ ) ou meningite (33,3%,  $n=1$ ). Os restantes 78,57% ( $n=11$ ) negaram qualquer antecedente patológico pessoal.

No que diz respeito à exposição a radiação ionizante através de exames de diagnóstico, 26,67% ( $n=4$ ) da amostra total ( $n=15$ ) nunca havia sido exposta. O indivíduo não portador já tinha realizado 2 procedimentos de imagem até ao momento da recolha de dados: mamografia ( $n=1$ ) e CT ( $n=1$ ). Nos indivíduos portadores, observou-se uma média de 9 estudos imagiológicos por indivíduo. O número máximo de procedimentos imagiológicos realizados individualmente foi de 45. Adicionalmente, o exame de diagnóstico mais realizado foi a radiografia ao tórax (42,52%), seguida da mamografia (41,73%).

Tal como mencionado anteriormente, foi também realizada uma estimativa da dose efetiva cumulativa dos indivíduos incluídos no estudo. No indivíduo não portador, a dose efetiva cumulativa foi de 0,16 mSv até ao momento da realização do questionário. No grupo de portadores, a dose efetiva cumulativa foi, em média, de 5,25 mSv, com mediana de 1,31 mSv (valor mínimo de 0 e valor máximo de 22,12 mSv).

A Figura 19 representa a distribuição da dose efetiva cumulativa no grupo de portadores, verificando-se que em 50% (n=7) dos indivíduos portadores a dose efetiva cumulativa foi inferior ou igual a 1mSv, o limite de dose efetiva anual a que a população em geral pode ser exposta, em 42,86% (n=6) variou entre 1 e 20 mSv, o limite de dose efetiva para trabalhadores expostos por ano, e em 7,14% (n=1) foi superior a 20 mSv e inferior a 50 mSv, o limite de dose equivalente para a pele por ano, para a população em geral. Em nenhum indivíduo se obtiveram doses de diagnóstico iguais ou superiores a 50 mSv.



**Figura 19** - Gráfico representativo da distribuição da dose efetiva cumulativa dos indivíduos pertencentes ao grupo de portadores de mutações nos genes *BRCA1/2*.

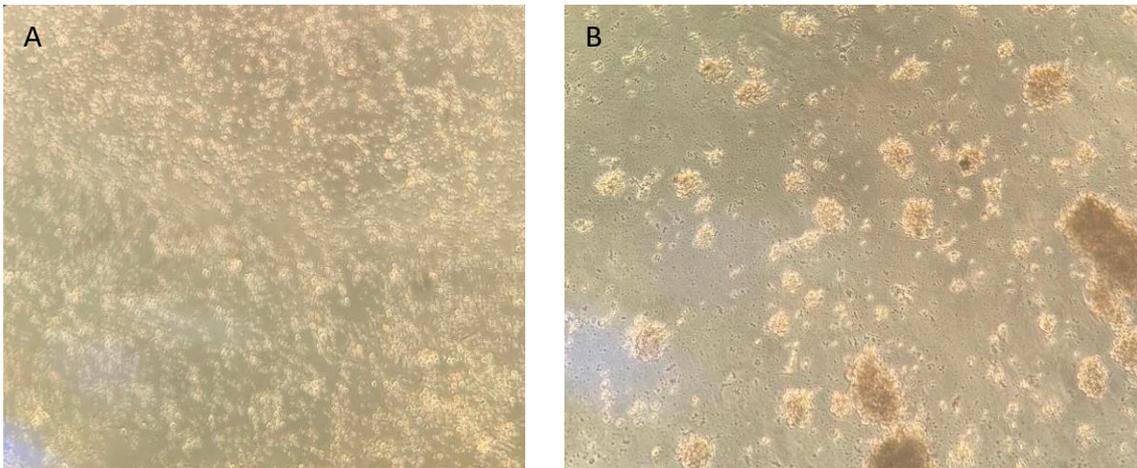
Na amostra em estudo, nenhum indivíduo tinha sido submetido a tratamentos de radioterapia até ao momento da recolha dos dados.

## 4.2. Estabelecimento de linhas celulares linfoblásticas

Após a colheita do sangue periférico dos 15 indivíduos incluídos no estudo, portadores e não portador de mutações nos genes *BRCA1/2*, para tubos heparinizados, pelos serviços de Patologia Clínica do IPOCFG, estes foram rapidamente transportados para o Laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC por forma a serem processados.

Primeiramente, a partir do sangue de cada indivíduo, foram isoladas as PBMCs de acordo com o protocolo anteriormente descrito. Posteriormente, estas foram infectadas pelo vírus Epstein-Barr e transformadas em linhas celulares linfoblastoides.

A taxa de sucesso de formação de LCLs foi de 100% o que significa que, em todas as amostras em que foi realizada a transformação dos linfócitos B do sangue em LCLs, esta foi bem-sucedida. A Figura 20 mostra, em A, células mononucleares do sangue periférico, obtidas através do protocolo descrito, antes da infecção com o EBV. Em B, é possível visualizar a presença de aglomerados celulares, característicos das linhas celulares em estudo, formados após a infecção das células com o vírus. Estes apresentam morfologia típica de linhas celulares em suspensão em forma de roseta com diversos tamanhos.



**Figura 20** - Células antes e após a transformação por EBV, visualizadas através de microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100), com uma ampliação de 100x; (A) PBMCs antes da transformação; (B) células B imortalizadas por EBV, derivadas de PBMCs de um indivíduo portador de mutação *BRCA*.

Apesar do sucesso na transformação, existiram amostras de portadores de mutações nos genes *BRCA1/2* em que a mesma ocorreu mais lentamente, o que pode estar associado a diversos fatores como, por exemplo, à toma de determinados fármacos no momento da colheita da amostra sanguínea, os quais podem causar uma baixa qualidade de PBMCs e, conseqüentemente, condicionar a formação de LCLs.

### 4.3. Extração de DNA

Após a formação de LCLs a partir do sangue periférico dos indivíduos inseridos no projeto, procedeu-se à extração de DNA, como mencionado na metodologia. Relativamente às amostras de dois indivíduos com mutação no gene *BRCA2* (102 e 103), não foi possível realizar a extração uma vez que, nos frascos de cultura correspondentes às mesmas, se observou infecção por micoplasma, uma bactéria capaz de infectar e contaminar culturas de células e de se disseminar com grande facilidade. Os indicadores de qualidade das amostras de DNA extraídas encontram-se apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7** - Dados relativos à extração de DNA, no que diz respeito à concentração, em ng/ $\mu$ L, e à pureza.

Amostra	Gene	Concentração (ng/ $\mu$ L)	Pureza A260/A280	Pureza A260/A230
100	<i>BRCA2</i>	547	1,77	1,39
101		247	1,74	1,56
104		140,8	1,96	1,53
105		367,9	1,94	1,86
111		749,7	1,91	2,25
112		274,9	1,91	2,22
113		261,1	1,91	2,45
106	<i>BRCA1</i>	200	1,97	2,29
107		319,3	1,89	2,14
108		352,8	1,94	2,43
109		442,0	1,96	2,46
110		334,5	1,90	2,12
114	-	276,5	1,96	2,18

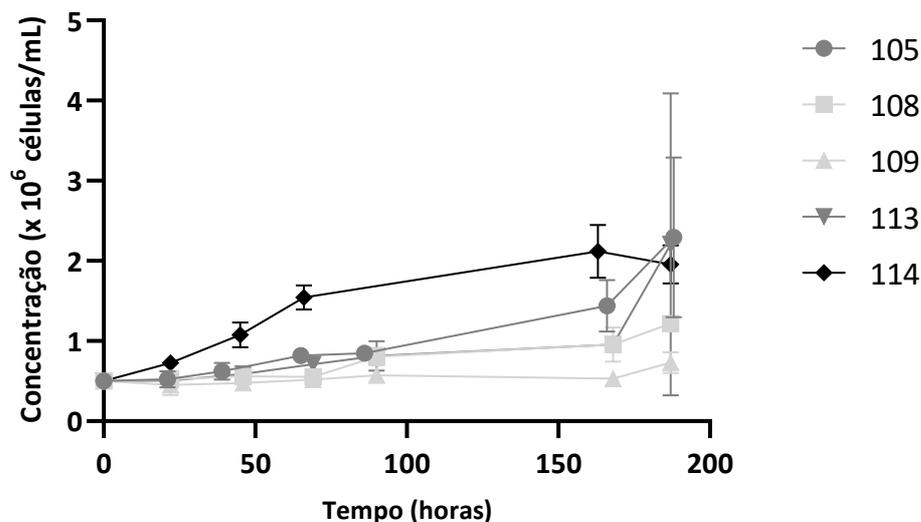
Analisando os dados apresentados, a concentração de DNA média foi de 347,19 ng/ $\mu$ L, com um desvio padrão de 159,23 ng/ $\mu$ L. Relativamente à pureza, a razão entre as absorvâncias medidas a um comprimento de onda de 260 nm e 280 nm teve como média 1,90 e desvio padrão 0,07, com apenas duas amostras com valores abaixo do valor recomendado de pureza (1,8), contudo, bastante próximos do mesmo. Em relação à razão entre as absorvâncias medidas a 260 nm e 230 nm, a mesma teve como média 2,07 e desvio padrão 0,37, com quatro amostras com valores abaixo do recomendando (2,0), podendo indicar a presença de contaminantes. No

protocolo empregue para a extração de DNA utilizaram-se soluções constituídas por guanidina-HCl, assim como EDTA, as quais absorvem a 230 nm. Assim, a possível presença de quantidades residuais destas substâncias pode ter conduzido a uma redução da razão de absorvância em 260 nm e 230 nm.

Desta forma, podemos concluir que, tendo em conta o primeiro e o segundo parâmetro de pureza, 84,62% e 69,23% do DNA extraído a partir das amostras são de boa qualidade, respetivamente, podendo ser empregue no futuro em estudos que envolvam a utilização de DNA.

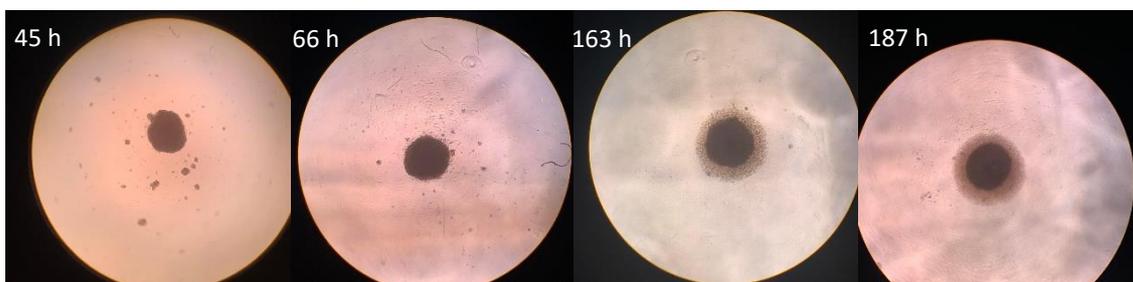
#### **4.4. Tempo de duplicação da população**

Aquando da cultura das linhas celulares linfoblastoides, determinou-se a taxa de crescimento de LCLs derivadas de cinco indivíduos: dois com mutação no gene *BRCA1* (108 e 109), dois com mutação no gene *BRCA2* (105 e 113) e um sem mutação nos genes em causa (114). A Figura 21 representa as curvas de crescimento de cada uma das linhas celulares, ou seja, a concentração de células ao longo do tempo. Os dados obtidos mostram que diferentes LCLs, obtidas a partir de indivíduos distintos, apresentam perfis de crescimento diferentes e, ainda, parece haver diferenças na taxa de crescimento quando consideramos amostras provenientes de portadores e do indivíduo não portador de mutações nos genes *BRCA1/2*.



**Figura 21** - Curvas correspondentes ao crescimento de LCLs obtidas a partir de diferentes indivíduos. Os indivíduos 105 e 113 são portadores de mutação no gene *BRCA2* (curvas a cinzento-escuro), enquanto os indivíduos 108 e 109 apresentam mutação no gene *BRCA1* (curvas a cinzento-claro). O indivíduo 114 corresponde a um não portador de mutação nos genes *BRCA1/2* (curva a preto).

Adicionalmente, foram obtidas imagens através de um microscópio ótico invertido (Motic AE31), com uma ampliação de 40x, com o intuito de complementar a informação acerca do crescimento das linhas celulares em diferentes pontos no tempo, incluindo 45, 66, 163 e 187 horas (Figura 22). Os resultados mostram que os agregados celulares, característicos de LCLs, vão aumentando de tamanho com o decorrer do tempo.



**Figura 22** - Imagens obtidas através do microscópio ótico invertido Motic AE31, com uma ampliação de 40x, em diferentes pontos temporais: 45 (esquerda), 66, 163 e 187 horas (direita).

De acordo com as equações (2) e (3) apresentadas na descrição da metodologia, foi possível determinar o tempo de duplicação de cada linha celular, apresentado na Tabela 8.

**Tabela 8** - Dados relativos ao tempo de duplicação da população para diferentes amostras, obtidas a partir de diferentes indivíduos, assim como ao respetivo desvio padrão.

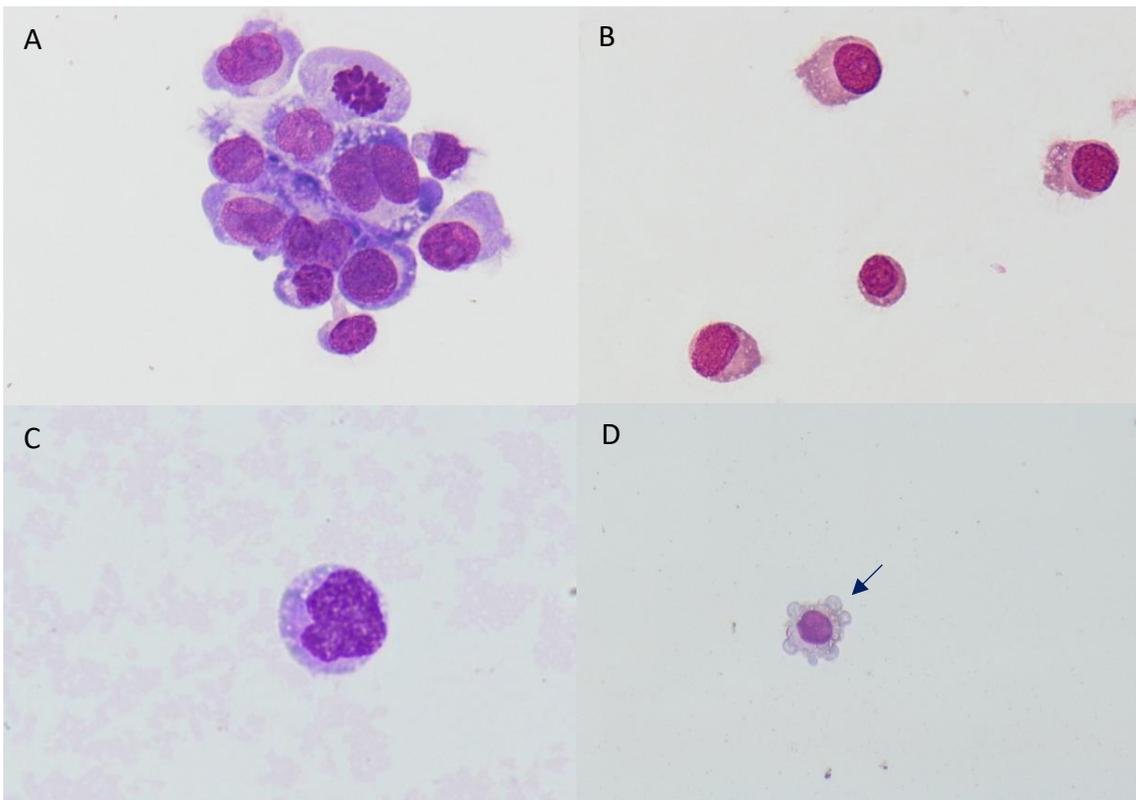
Amostra	Gene	Portador (P)/Não portador (NP)	DT (horas)	Desvio padrão (horas)	DT médio (horas)
105	<i>BRCA2</i>	P	99,33	40,89	206,20
113			127,37	58,59	
108	<i>BRCA1</i>		196,94	56,16	
109			401,17	158,76	
114	-	NP	91,01	9,53	91,01

O tempo médio de duplicação da população de células linfoblásticas de portadores de mutações nos genes *BRCA1/2* foi de 206,2 horas, correspondentes a 8,59 dias, variando de 99,33 a 401,17 horas. Considerando apenas os indivíduos portadores de mutações no gene *BRCA2* (105 e 113), o DT médio foi de 113,35 horas (4,72 dias). Desta forma, uma vez que no presente estudo apenas foi avaliada a questão da radiosensibilidade em portadores de mutações no gene *BRCA2*, procedeu-se à irradiação das amostras com uma semana de intervalo, tempo suficiente para que as células se dividam e para que possam ocorrer os mecanismos de reparação celular. Adicionalmente, determinou-se o tempo de duplicação da população para o indivíduo não portador de mutação nos genes em causa, com um DT médio de 91,01 horas, correspondentes a 3,79 dias. Para a determinação deste valor considerou-se o tempo correspondente à concentração de células mais elevada (163 horas), tendo em conta que às 187 horas se verificou uma ligeira diminuição da concentração como resultado da falta de meio de cultura nos poços na placa.

#### 4.5. Morfologia celular

Para um melhor conhecimento morfológico das linhas celulares em estudo, procedeu-se à análise morfológica das mesmas, seguindo o protocolo descrito no capítulo anterior. O protocolo inicial utilizava Giemsa a 4% em PBS 1X para a coloração das lâminas. Contudo, aquando da visualização das células ao microscópio, as mesmas apresentavam-se muito pouco coradas, com um número bastante reduzido de células visualizadas por lâmina. Desta forma, procedeu-se à alteração do protocolo através da substituição do PBS 1X por água destilada,

verificando-se uma grande melhoria na visualização das células. A Figura 23 apresenta os resultados obtidos após a alteração do protocolo: em A, é visível a presença de um aglomerado celular, característico das linhas celulares linfoblastoides, em B e C, visualizam-se células isoladas, esféricas e com um grande núcleo e, em D, encontra-se uma célula em apoptose, caracterizada pela presença de *blebbing* (seta), uma protuberância irregular na membrana plasmática de uma célula.



**Figura 23** - Células obtidas a partir de linhas celulares linfoblastoides. (A) Agregado característico das linhas celulares em análise; (B e C) Células isoladas, com diferentes dimensões; (D) Célula em apoptose. Imagens obtidas com o microscópio Nikon Eclipse 80i, equipado com Nikon Digital Camera DXM 1200F, a partir de lâminas relativas ao protocolo que utiliza Giemsa a 4% em água destilada (ampliação 500x).

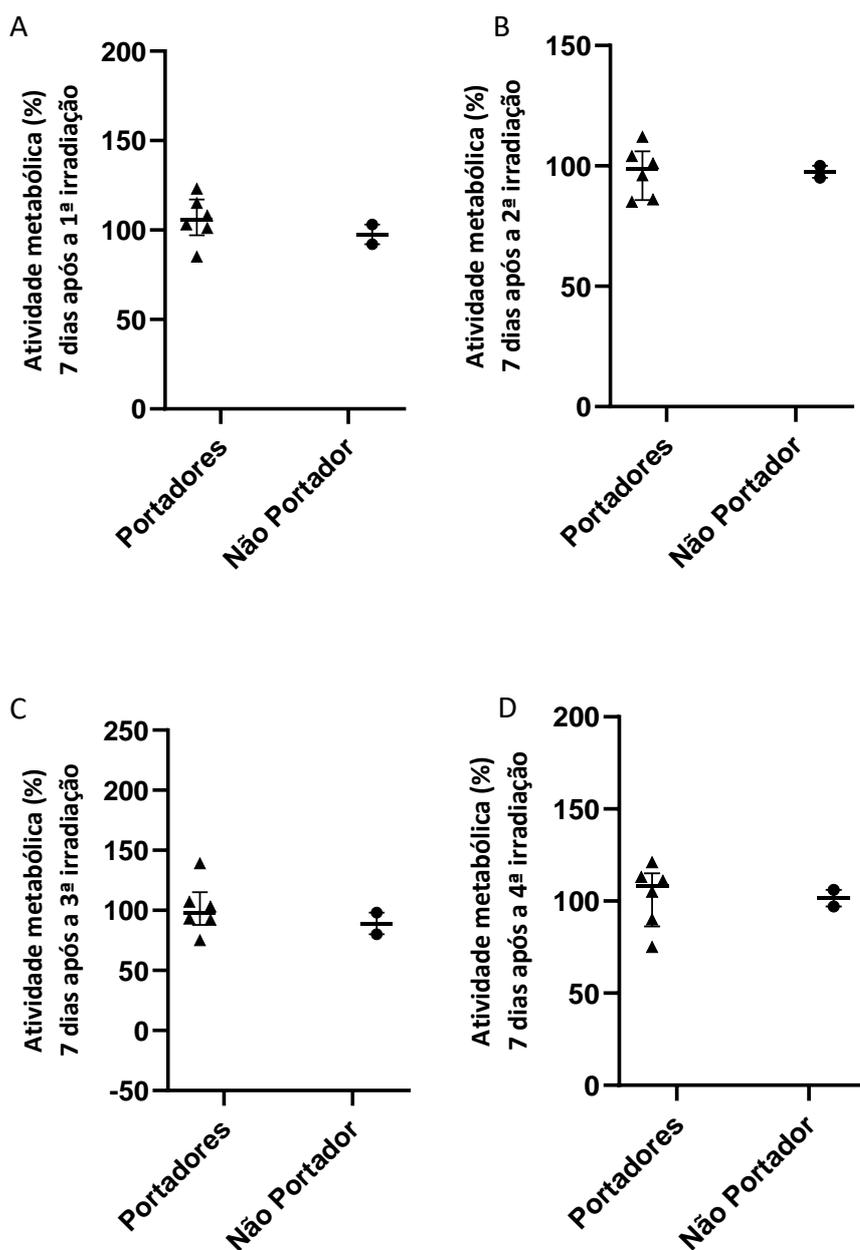
## 4.6. Tomografia Computorizada

### 4.6.1. Avaliação da atividade metabólica

A avaliação da atividade metabólica, através do ensaio do XTT, foi realizada uma semana após cada irradiação nas amostras que haviam sido submetidas a tomografias computadorizadas

semanais (4 semanas), numa dose efetiva de 27,19 mSv por semana. Os dados obtidos foram analisados tendo em consideração a informação genética, o fenótipo, a idade, o valor de IMC e a prática de exercício físico, os antecedentes pessoais, os hábitos tabágicos, a ingestão diária de água e a dose efetiva cumulativa.

Quanto aos resultados deste ensaio, analisados pelo teste estatístico de Mann-Whitney, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na atividade metabólica entre o grupo de portadores e o indivíduo não portador para cada irradiação. Na Figura 24 estão representadas as percentagens de atividade metabólica correspondentes à condição irradiada normalizada à condição não irradiada (controlo). O gráfico A representa os dados obtidos 7 dias após a primeira exposição a radiação ionizante, com a dose efetiva de 27,19 mSv. Para a dose e o tempo descritos, as amostras relativas ao grupo de portadores apresentaram uma mediana de atividade metabólica de 105,5% (mínimo de 85 e máximo de 123%), enquanto o indivíduo não portador exibiu uma mediana de 97,5% (mínimo de 92 e máximo de 103%). No gráfico B, é possível observar a percentagem de atividade metabólica 7 dias após a segunda irradiação, correspondente a uma dose efetiva cumulativa de 54,38 mSv. O grupo de portadores apresentou uma mediana de atividade metabólica de 98,5% (mínimo de 85 e máximo de 112%) e o indivíduo não portador uma mediana de 97,5% (mínimo de 95 e máximo de 100%). O gráfico C corresponde à percentagem de atividade metabólica das amostras de portadores e do não portador 7 dias após a terceira irradiação, correspondente à dose efetiva cumulativa de 81,57 mSv. Neste caso, a mediana da atividade metabólica para o grupo de portadores foi de 98% (mínimo de 75 e máximo de 139%), já para o indivíduo não portador foi de 89% (mínimo de 80 e máximo de 98%). O gráfico D corresponde à percentagem de atividade metabólica 7 dias após a quarta e última irradiação (108,76 mSv). Para o grupo de portadores, a mediana foi de 108% (mínimo de 75 e máximo de 121%), enquanto para o indivíduo não portador foi de 101,5% (mínimo de 97 e máximo de 106%).



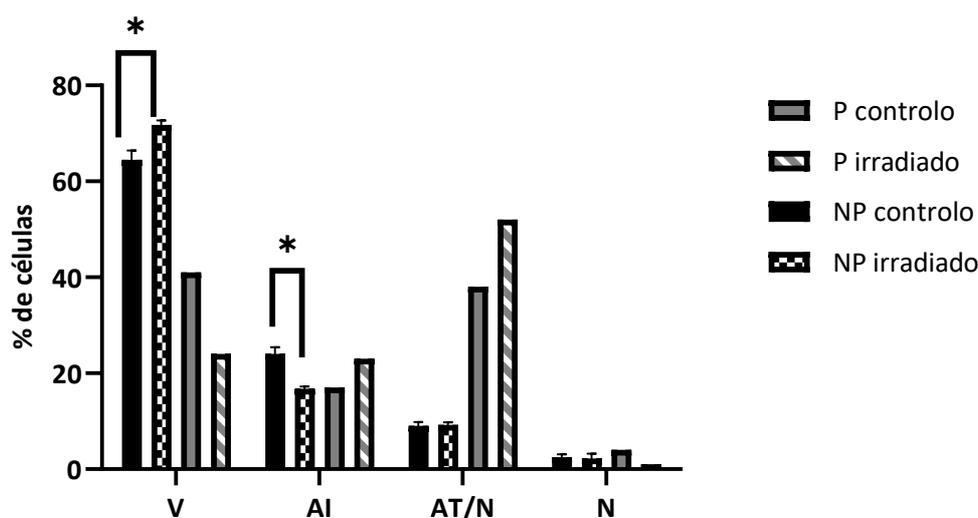
**Figura 24** - Percentagem de atividade metabólica determinada através do ensaio do XTT, 7 dias após a primeira irradiação (A), 7 dias após a segunda irradiação (B), 7 dias após a terceira irradiação (C) e 7 dias após a última irradiação (D). As amostras foram submetidas a uma dose efetiva cumulativa de 108,76 mSv (27,19 mSv/semana). Os resultados estão apresentados sob a forma de mediana dos valores obtidos para cada participante relativos à absorvância, com a normalização da condição irradiada à condição controle (não irradiada). O teste Mann-Whitney foi realizado.

Os valores de atividade metabólica foram relacionados com as variáveis anteriormente descritas, contudo, não foram encontradas diferenças com significado estatístico.

#### 4.6.2. Avaliação da viabilidade celular e tipos de morte celular

Os efeitos da exposição a radiação ionizante na viabilidade celular e nos tipos de morte celular foram avaliados por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Esta técnica permite distinguir entre células viáveis e células mortas, através das alterações que ocorrem a nível da permeabilidade e da composição membranar, o que possibilita distinguir o tipo de morte celular predominante: apoptose ou necrose. Esta técnica foi realizada 11 dias após a última irradiação em amostras de dois indivíduos, um portador de mutação no gene *BRCA2* (113) e um não portador de mutação nos genes *BRCA* (114). As amostras haviam sido submetidas a tomografia computadorizada semanal (4 semanas), correspondente a uma dose efetiva de 27,19 mSv por semana.

Contrariamente aos resultados obtidos através do ensaio do XTT para análise da atividade metabólica, os resultados obtidos através da citometria de fluxo, apresentados na Figura 25, apesar de corresponderem a resultados preliminares, pelo facto do tamanho da amostra ser reduzido, revelaram que a exposição cumulativa a radiação ionizante das amostras obtidas a partir do portador de mutação no gene *BRCA2*, comparativamente ao não portador, conduziu a uma diminuição significativa no número de células vivas e, por isso, a um aumento na morte celular, nomeadamente por apoptose tardia/necrose. Relativamente à apoptose inicial e à necrose, não existiram diferenças significativas entre amostras irradiadas do indivíduo portador comparativamente com amostras irradiadas do indivíduo não portador. Comparando os resultados obtidos para o indivíduo não portador tendo em conta as condições controlo e irradiado, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas na percentagem de células vivas ( $p=0,0286$ ), com uma menor percentagem para a condição controlo, com mediana de 64%, relativamente à condição de irradiação, com mediana de 71,5%, e na percentagem de células em apoptose inicial ( $p=0,0286$ ), com uma menor percentagem para a condição irradiada, com mediana de 17%, em relação à condição controlo, com mediana de 24,5%.

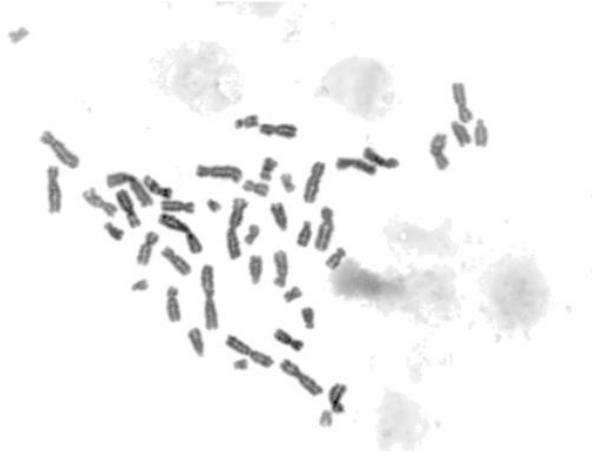


**Figura 25** - Percentagem de células vivas (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e em necrose (N), para as condições controle e irradiada, para um portador de mutação no gene *BRCA2* (P) e para o não portador (NP). A percentagem foi avaliada através da citometria de fluxo, após o esquema de irradiação (27,19 mSv/semana, durante 4 semanas). O ensaio foi realizado 11 dias após a última irradiação. Os resultados estão apresentados sobre a forma de percentagem de células. O teste Mann-Whitney foi realizado. As diferenças significativas estão apresentadas com \* para  $p < 0,05$ .

#### 4.6.3. Avaliação da genotoxicidade

Os cromossomas dicêntricos são cromossomas com dois centrômeros, formados através da fusão de duas extremidades cromossômicas. A pesquisa de cromossomas dicêntricos para avaliação da genotoxicidade é amplamente utilizada para avaliar os efeitos decorrentes da exposição a radiação ionizante, mesmo com baixas doses. Desta forma, no presente estudo, a avaliação da genotoxicidade através do ensaio de cromossomas dicêntricos foi realizada 7 a 14 dias após a última irradiação em amostras de dois indivíduos portadores de mutação no gene *BRCA2*.

Os resultados obtidos mostraram que a exposição repetida a radiação ionizante com uma dose efetiva de 27,19 mSv/semana, durante 4 semanas, não foi capaz de induzir a formação de cromossomas dicêntricos (Figura 26).



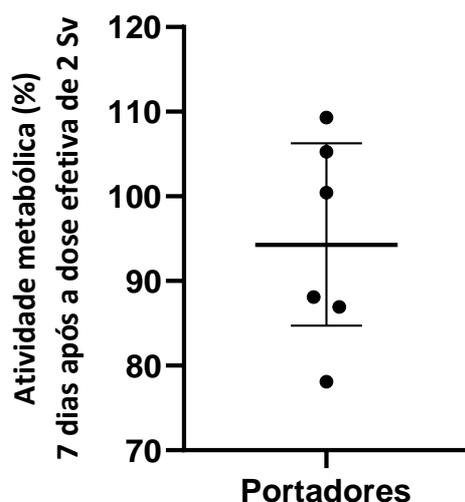
**Figura 26** - Cromossomas obtidos através da realização do ensaio de cromossomas dicêntricos, realizado 7 dias após a exposição cumulativa a radiação ionizante, durante 4 semanas, correspondente a 27,19 mSv/semana.

## 4.7. Radioterapia

### 4.7.1. Avaliação da atividade metabólica

A avaliação da atividade metabólica através do ensaio do XTT foi realizada em amostras correspondentes a três indivíduos portadores de mutações no gene *BRCA2*, as quais foram sujeitas a uma dose efetiva de 2 Sv através de um acelerador linear Truebeam da Varian, utilizado em radioterapia.

A análise da atividade metabólica, através da medição da absorvância a 450 nm, foi realizada 7 dias após a exposição das amostras a radiação. Na Figura 27 encontram-se as percentagens de atividade metabólica correspondentes à condição irradiada, normalizada à condição controlo. Para o tempo e a dose descritos, as amostras correspondentes ao grupo de portadores de mutação no gene *BRCA2* apresentaram uma mediana de atividade metabólica de 94,28% (mínimo de 78,12 e máximo de 109,3%).



**Figura 27** - Percentagem de atividade metabólica determinada através do ensaio do XTT, 7 dias após a exposição única a radiação ionizante, correspondente a uma dose efetiva de 2 Sv. Os resultados estão apresentados sob a forma de mediana dos valores obtidos para cada participante relativos à absorvância, com a normalização da condição irradiada à condição controlo (não irradiada).

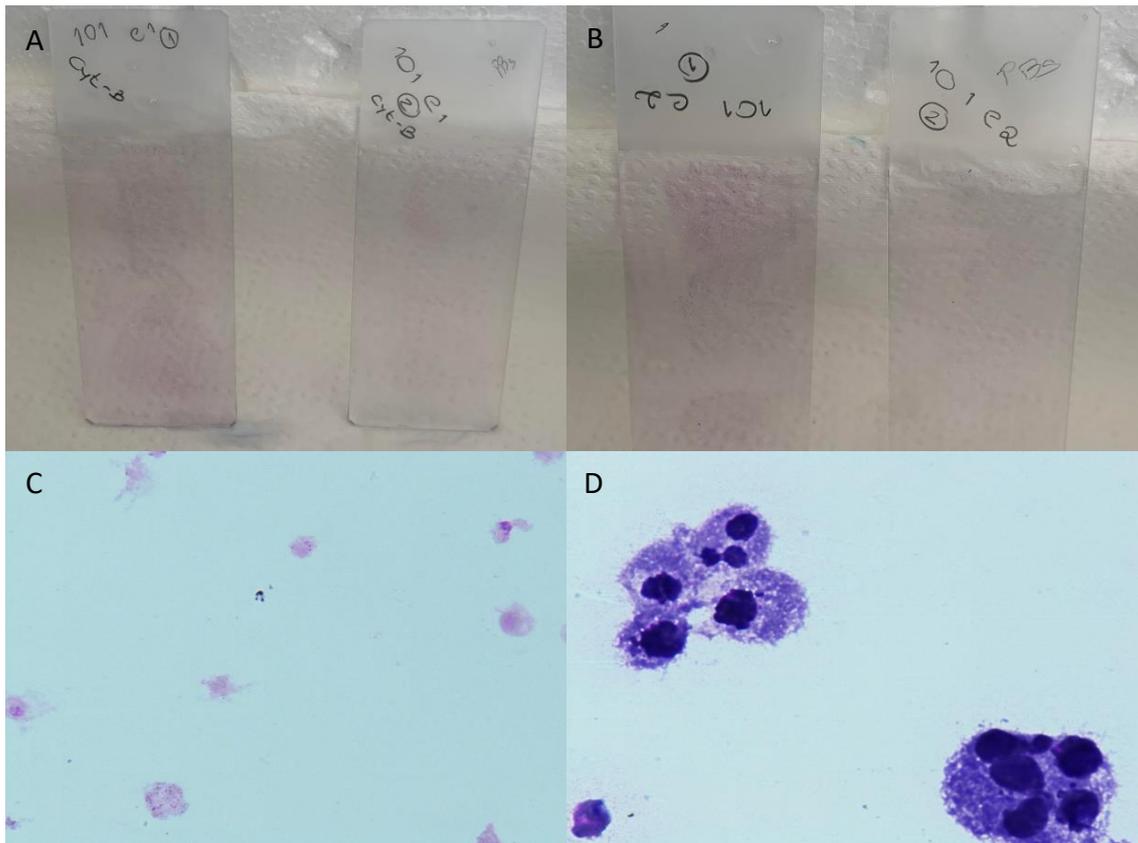
A dose utilizada parece não ser suficiente para provocar alterações significativas na atividade metabólica, contudo, pode conduzir a lesões celulares, nomeadamente, lesões cromossómicas, as quais não conseguem ser analisadas através do presente ensaio. Para tal, procedeu-se à realização do ensaio de micronúcleos para avaliação da genotoxicidade.

#### 4.7.2. Avaliação da genotoxicidade

A avaliação da genotoxicidade através do ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese foi realizada em amostras correspondentes a indivíduos portadores de mutações no gene *BRCA2*, submetidas a uma dose efetiva de 2 Sv através de um acelerador linear Truebeam.

O protocolo correspondente a este ensaio foi realizado utilizando duas abordagens distintas no que diz respeito à coloração das lâminas com Giemsa a 4%: com PBS 1X e com água destilada, com o intuito de verificar se existiam diferenças nos resultados. Na Figura 28 estão apresentados os resultados obtidos aquando da observação das lâminas e das respetivas células ao microscópio. Em A e B, podemos ver as lâminas utilizadas no ensaio de micronúcleos, verificando-se que, quando se realizou o protocolo no qual se utiliza PBS 1X para a coloração

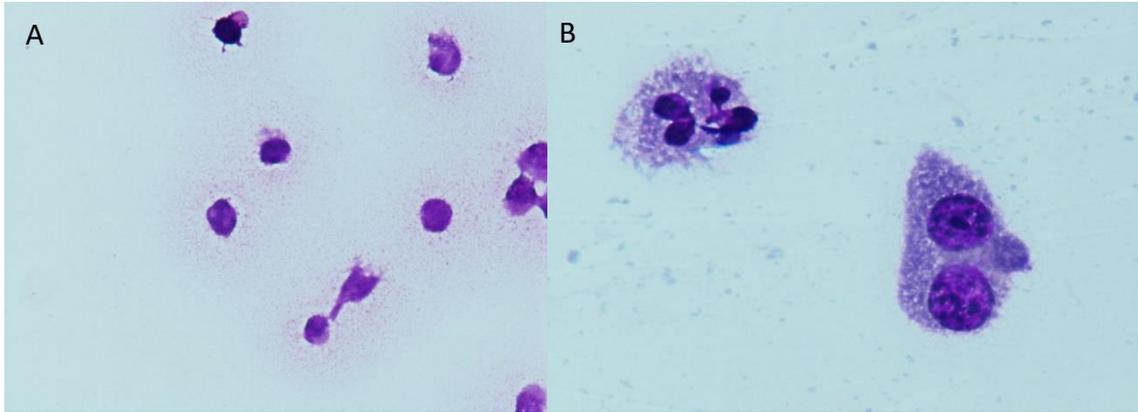
(lâminas da direita em A e B), as lâminas apresentavam-se menos coradas comparativamente às lâminas para as quais se utilizou água destilada (lâminas da esquerda em A e B). Em C, encontra-se uma imagem obtida a partir do protocolo que utilizou Giemsa a 4% em PBS 1X, com células pouco coradas, de difícil visualização, comparativamente à imagem em D, obtida através do protocolo que utilizou água destilada, na qual houve uma melhoria significativa na visualização do núcleo e do citoplasma celulares.



**Figura 28** - Resultados obtidos através da realização do ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese com dois protocolos distintos, realizado após a dose efetiva de 2 Sv. (A e B) Lâminas utilizadas no ensaio de micronúcleos, para o protocolo que utilizou PBS 1X para a coloração (lâminas da direita) e para o protocolo que utilizou água destilada (lâminas da esquerda); (C) Imagem obtida a partir do protocolo que utilizou PBS 1X, com células pouco coradas; (D) Imagem obtida através do protocolo que utilizou água destilada. As imagens C e D foram obtidas com o microscópio Nikon Eclipse 80i, equipado com Nikon Digital Camera DXM 1200F, a partir de duas lâminas correspondentes aos dois protocolos (ampliação 500x).

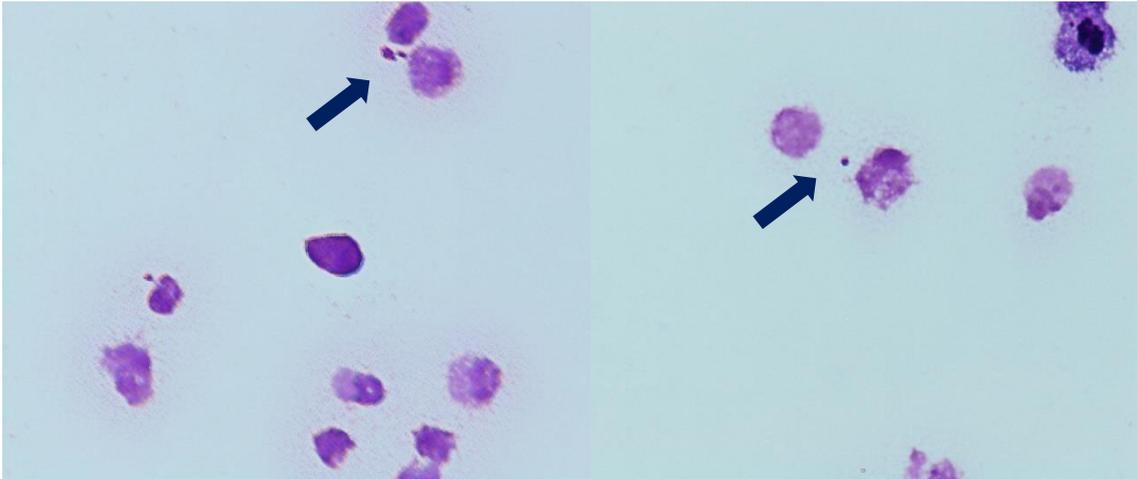
Posteriormente, após a otimização do protocolo no que diz respeito à coloração, o ensaio foi utilizado para avaliação comparativa das condições não irradiada e irradiada no que diz respeito à formação de micronúcleos. Para se proceder à contagem de micronúcleos é

necessário que as células apresentem um citoplasma bem definido. Contudo, esta condição não foi conseguida para as células submetidas a irradiação correspondente a uma dose efetiva de 2 Sv (Figura 29A), contrariamente às células controlo, não expostas a radiação (Figura 29B).



**Figura 29** - Resultados obtidos após a otimização do protocolo do ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese. (A) Condição irradiada (dose efetiva de 2 Sv) relativa a um indivíduo portador de mutação *BRCA2*, com ausência de citoplasma bem definido: (B) Condição controlo do mesmo indivíduo, com uma célula binucleada com citoplasma bem definido. Imagens obtidas com o microscópio Nikon Eclipse 80i, equipado com Nikon Digital Camera DXM 1200F (ampliação 500x).

Apesar da falta de condições para a correta análise do ensaio em causa, foi possível obter células binucleadas, resultantes da adição de citocalasina-B, nas quais parece existir um micronúcleo (Figura 30). Todavia, não foi possível retirar conclusões relativamente a este assunto.



**Figura 30** - Resultados obtidos após a exposição a radiação ionizante, correspondente a uma dose efetiva de 2 Sv, e após a otimização do protocolo do ensaio de micronúcleos. As duas imagens resultam da coloração com água destilada, verificando-se que, apesar de não existirem células com citoplasma bem definido, parecem existir micronúcleos (setas). Imagens obtidas com o microscópio Nikon Eclipse 80i, equipado com Nikon Digital Camera DXM 1200F (ampliação 500x).

Desta forma, como não foi possível visualizar células com um citoplasma bem definido para a condição irradiada (condição de interesse), não se conseguiu realizar a análise dos micronúcleos.



## **5. Discussão**



Nos últimos anos, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de esclarecer quais os efeitos que poderão advir da exposição de indivíduos portadores de mutação nos genes *BRCA1/2* à radiação ionizante, ou seja, se estes são mais radiosensíveis quando comparados com indivíduos não portadores. Contudo, é importante considerar que existe variabilidade entre indivíduos, a qual condiciona a resposta à radiação ionizante.

No início do século XX (1906), o radiologista Jean Alban Bergonie e o histologista Louis Tribondeau expuseram testículos de roedores, constituídos por células maduras, os espermatozoides, e por células imaturas, a espermatogônia e espermatócitos, a raios-X com o intuito de avaliar a resposta dos tecidos à radiação. Após a exposição, Bergonie e Tribondeau observaram que as células imaturas eram mais radiosensíveis quando comparadas com as células maduras, ou seja, uma dose de radiação mais baixa era suficiente para causar dano. Assim, mais tarde, propuseram a lei de Bergonie e Tribondeau, a qual afirma que a sensibilidade das células à radiação é diretamente proporcional à sua capacidade de proliferação e inversamente proporcional ao grau de diferenciação, ou seja, as células com um elevado índice mitótico e indiferenciadas são mais radiosensíveis do que os outros tipos celulares (87). Desta forma, de acordo com esta lei, um feto é mais sensível à radiação comparativamente a uma criança ou adulto e, conseqüentemente, mais suscetível aos efeitos nocivos que a mesma pode causar.

Mais tarde, em 1925, Ancel e Vitemberg introduziram a noção de tempo de latência, isto é, o tempo que decorre entre a exposição a radiação e o surgimento de lesões biológicas. Apesar da suscetibilidade de qualquer célula à lesão ser semelhante, o tempo de aparecimento de lesões causadas por radiação varia conforme o tipo de célula, ou seja, conforme a quantidade de stresse biológico que a mesma recebe, assim como as condições pré- e pós-irradiação (88).

Os conceitos apresentados pelos embriologistas foram essenciais para que se pudessem compreender os efeitos da exposição a radiação ionizante em indivíduos portadores de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Como referido, estes genes codificam proteínas que desempenham um papel crucial a nível da reparação de lesões no DNA, as quais podem resultar da exposição a radiação ionizante, conduzindo a estabilidade genómica e supressão tumoral. Assim, a perda de função destas proteínas conduz a instabilidade genómica devido à reparação ineficiente do DNA, a qual, por vezes, culmina em cancro (7,57). Com base nestes conceitos, o presente estudo foi desenhado, com o intuito de avaliar se indivíduos com mutações nos genes *BRCA*, especificamente no gene *BRCA2*, são mais radiosensíveis quando comparados com

indivíduos não portadores. Resultados anteriores deste projeto referentes à exposição única a radiação ionizante, associada a mamografia e a tomografia computadorizada, em amostras de sangue periférico de portadores e não portadores de mutação no gene *BRCA2* demonstraram que não existem diferenças com significado estatístico entre os dois grupos. Contudo, nestas condições, não foi possível realizar estudos e análises mais prolongados devido ao tempo de vida das células sanguíneas (89,90). Desta forma, desenhou-se o presente estudo, com imortalização dos linfócitos B do sangue, para ultrapassar os problemas identificados.

No projeto, a variante fundadora portuguesa (c.156\_157insAlu) foi a que apresentou maior frequência (40%), estando em concordância com o estudo realizado por Peixoto *et al.*, o qual demonstrou que a variante c.156\_157insAlu associada ao gene *BRCA2* é a mais comum em Portugal, sendo responsável por mais de um quarto (27%) das mutações *BRCA1/2* nas regiões norte/centro do país (91).

Uma das grandes limitações associada ao presente estudo prendeu-se ao facto de o mesmo incluir um número total de indivíduos reduzido, assim como um número reduzido de indivíduos do género masculino. De facto, quando se considera o número de homens seguido nas consultas de Risco Familiar no IPOCFG, este é menor quando comparado com o número de mulheres, levantando a questão de se a incidência de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* difere quando consideramos homens e mulheres. Ainda, para a SHCMO, os homens iniciam exames de vigilância que envolvem a exposição a radiação ionizante mais tardiamente comparativamente às mulheres, conduzindo também à questão de se terá impacto no desenvolvimento de uma neoplasia, a qual poderá verificar-se em idades mais avançadas. Estas são questões para as quais ainda não existem dados na literatura, pelo que seria de grande interesse esclarecer a incidência de mutações nos genes *BRCA1/2* no que diz respeito ao género, assim como se o facto de um primeiro exame se realizar mais tardiamente diminui o risco de desenvolvimento de cancro nestes indivíduos.

Adicionalmente, a determinação da dose efetiva cumulativa a que os indivíduos incluídos no estudo haviam sido expostos até ao momento da realização do questionário foi uma aproximação, podendo não corresponder ao valor real. O cálculo baseou-se na informação fornecida pelos participantes através dos inquéritos, os quais poderão não ter mencionado todos os exames a que foram submetidos. Para além disso, a dose é também influenciada pelo equipamento e pelo protocolo utilizados na realização de cada exame, informações essas a que não tivemos acesso. Todavia, enquanto outros estudos presentes na literatura abordaram a

questão da radiosensibilidade de indivíduos portadores de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* quando estes são submetidos apenas a exames de mamografia e radiografia, o presente trabalho inclui outros exames imagiológicos que envolvem a exposição a radiação ionizante, como a tomografia computadorizada, permitindo a realização de uma estimativa mais real da dose efetiva cumulativa.

Neste trabalho, numa fase inicial, procedeu-se ao estabelecimento de linhas celulares linfoblastoides a partir do sangue periférico colhido dos indivíduos incluídos, possibilitando a irradiação cumulativa e a avaliação dos efeitos em tempos mais tardios sem que os linfócitos perdessem as suas características. A taxa de sucesso da formação de LCLs foi de 100%, permitindo o estudo de todas as amostras colhidas e a sua criopreservação para estudos futuros. Contudo, observou-se que o tempo que as LCLs levaram a ser estabelecidas era variável, existindo células para as quais a transformação ocorria mais lentamente. As linhas celulares utilizadas foram obtidas a partir de diferentes indivíduos, os quais têm diferentes antecedentes pessoais e familiares e, dessa forma, por exemplo, a toma de diferentes fármacos pode ter influenciado o procedimento laboratorial. Após a transformação, as células foram mantidas em cultura, procedendo-se à extração de DNA e à determinação do tempo de duplicação da população. Em relação à extração de DNA, de um modo geral, a mesma foi bem-sucedida, permitindo obter DNA de qualidade, tanto em termos qualitativos (grau de pureza), como em termos quantitativos (concentração). A extração teve como objetivo obter o DNA dos diferentes indivíduos incluídos no projeto para possíveis estudos futuros que envolvam a utilização do mesmo, sem que seja necessário fazer uma nova colheita de sangue. Relativamente ao tempo de duplicação, o mesmo possibilitou determinar qual o intervalo de tempo a utilizar entre cada irradiação, dando tempo suficiente às células para que estas se dividissem e, desta forma, para que os mecanismos de reparação celular pudessem atuar. Os resultados obtidos mostraram um DT mais reduzido para amostras do indivíduo não portador de mutações *BRCA1/2* comparativamente às amostras de indivíduos portadores dessas mesmas mutações. Efetivamente, o facto de os indivíduos apresentarem mutação nos genes *BRCA* compromete a reparação de lesões no DNA, podendo provocar respostas a nível celular responsáveis pelo bloqueio da proliferação celular e indução da apoptose (92). Além disso, as células de portadores de mutações no gene *BRCA2* parecem apresentar uma maior taxa de crescimento comparativamente a células de portadores de mutações no gene *BRCA1*. Contudo, futuramente, será necessário aumentar a amostra com o intuito de comprovar os resultados.

De seguida, com o intuito de conhecer as características morfológicas das células em estudo, procedeu-se à análise morfológica das mesmas. Para tal, foi necessário, primeiramente, otimizar o protocolo associado a este ensaio no que diz respeito à coloração das lâminas, verificando-se uma grande melhoria quando se utilizou a água destilada, relativamente ao PBS 1X. Após a otimização do protocolo, as lâminas foram visualizadas ao microscópio. Tal como observado aquando da formação das LCLs, verificou-se a presença de agregados celulares, característicos destas linhas celulares. Adicionalmente, foi possível verificar que as células apresentam morfologia bem definida, esférica, dada pela parede celular da célula, tamanho variado e um grande núcleo, à semelhança dos linfócitos, células que, através da transformação com o EBV, dão origem a linhas celulares linfoblastoides.

Posteriormente, as LCLs foram expostas a doses de raios-X, correspondentes a tomografia computadorizada, num esquema fracional, ou seja, quatro irradiações espaçadas de uma semana (27,19 mSv/semana), com o intuito de se reproduzir o que acontece em ambiente clínico. Ensaio radiobiológicos foram realizados para avaliar a atividade metabólica, a viabilidade celular e o tipo de morte celular e a genotoxicidade.

A atividade metabólica foi avaliada utilizando o ensaio do XTT. O ensaio do XTT é um ensaio colorimétrico baseado na redução do XTT, com formação de um composto de cor laranja, denominado formazano, por enzimas desidrogenases presentes no sistema de transporte de eletrões da mitocôndria. Uma vez que o formazano é solúvel em água, este é facilmente medido em sobrenadantes celulares. Desta forma, este ensaio permite estimar as células com metabolismo ativo, como um indicador da proliferação celular (76).

Relativamente aos resultados obtidos através deste ensaio 7 dias após cada irradiação, verificou-se que as amostras correspondentes ao grupo de portadores não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em termos de atividade metabólica, comparativamente às amostras do indivíduo não portador, qualquer que seja a semana analisada. Estes achados mostram que, apesar do DT ser diferente quando considerados portadores e não portador de mutações *BRCA*, a resposta à radiação ionizante, no que diz respeito à atividade metabólica, parece ser semelhante. Contudo, tal como anteriormente referido, um aumento do tamanho da amostra seria crucial para confirmar os resultados.

A viabilidade e os tipos de morte celular foram avaliados através da citometria de fluxo. A citometria de fluxo é, atualmente, uma ferramenta crucial de biologia molecular e celular que

possibilita a análise multiparamétrica de células individuais (77). Para avaliação da viabilidade, assim como das vias de morte celular, a anexina V é utilizada em conjunto com o iodeto de propídeo, com o intuito de determinar se as células são viáveis, ou se encontram mortas por apoptose ou necrose. Esta distinção é possível através de diferenças na integridade da membrana plasmática e na permeabilidade da membrana (80).

Os resultados obtidos através de citometria mostraram uma redução significativa no número de células viáveis no indivíduo portador de mutação no gene *BRCA2*, tanto para a condição controlo como para a condição irradiada, associado a um aumento paralelo significativo no número de células em apoptose tardia/necrose, comparativamente ao indivíduo não portador. Estes resultados diferem dos resultados obtidos através do ensaio do XTT, no qual não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de portadores e o não portador de mutações nos genes em análise após as 4 exposições a radiação. Não existindo literatura que esclareça este achado, a justificação para estes resultados pode residir no facto de que, tendo em conta que a exposição a radiação ionizante tem como efeito a produção de espécies reativas, estas podem ser capazes de reduzir o XTT e conduzir à formação de formazano. De facto, existem estudos na literatura que mostram que o XTT permite estimar a produção do radical superóxido, uma espécie reativa de oxigénio, sendo também capaz de reduzir o oxigénio singleto, pelo que os resultados obtidos através do ensaio do XTT podem estar a ser interpretados de forma incorreta (93,94). Assim e considerando esta justificação, este ensaio pode não ser adequado para avaliar os efeitos decorrentes da exposição a radiação ionizante. Ademais, uma vez que a citometria de fluxo, por questões de logística, foi realizada 11 dias após a última irradiação, contrariamente ao ensaio do XTT, realizado passados 7 dias, durante o período que separa os dois ensaios podem ocorrer danos celulares que conduzam à morte da célula. Desta forma e com o objetivo de esclarecer, no futuro, deve-se acertar o período de tempo no que diz respeito à realização do ensaio do XTT e da citometria de fluxo para que os resultados possam ser relacionados de forma mais robusta. Para além disso, as células viáveis dos indivíduos portadores de mutação no gene *BRCA2*, apesar de em menor número, podem estar metabolicamente mais ativas, envolvidas na reparação de lesões que possam ter ocorrido, associadas à exposição a radiação ionizante. Assim sendo, apesar de se verificar uma diminuição no número de células viáveis de portadores, comparativamente ao indivíduo não portador, a maior atividade metabólica associada aos primeiros faz com que não se observem diferenças através do ensaio do XTT. Contudo, dado o número reduzido de participantes em cada grupo (1 em cada), serão necessários estudos adicionais, com amostras

maiores, que comprovem os resultados, não se podendo, para já, retirar conclusões definitivas. Ainda, seria importante realizar o ensaio do XTT em paralelo com outro ensaio com o intuito de verificar se os resultados obtidos podem advir do facto de o ensaio do XTT ser inadequado para avaliar os efeitos da radiação. De acordo com a literatura, apesar do ensaio do XTT apresentar um protocolo de grande simplicidade, este é geralmente menos sensível comparativamente a métodos fluorescentes e luminescentes para avaliação da atividade metabólica (95). O ensaio de ATP (do inglês *adenosine triphosphate*) é um ensaio luminescente que se baseia na conversão da luciferina em oxiluciferina, catalisada pela luciferase juntamente com o ATP celular (96).

A genotoxicidade foi avaliada através do ensaio dos cromossomas dicêntricos - aberrações cromossómicas com dois centrómeros. Este ensaio, altamente específico, é frequentemente utilizado para avaliar os efeitos decorrentes da exposição a radiação ionizante. Diferentes estudos da literatura mostram que a exposição a uma dose tão baixa como 0,05 Gy, correspondente a uma dose efetiva de 50 mSv para raios-X, é capaz de ser identificada através do ensaio de cromossomas dicêntricos pela formação destas estruturas (83,97). Contudo, no presente estudo, com a irradiação das células corresponde a uma dose efetiva de 27,19 mSv/semana, não foi possível observar a formação de cromossomas dicêntricos para ambas as condições. Esta ausência de formação pode estar associada a um número reduzido de células que se encontravam em metáfase que, por sua vez, pode estar associado ao facto de o protocolo realizado pelo Laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC não esperar tempo suficiente para que as células se dividissem. Desta forma, futuramente, sugere-se uma alteração ao protocolo com o intuito de avaliar se o mesmo pode, de facto, estar associado à ausência de cromossomas dicêntricos. Adicionalmente, o tempo entre irradiações, assim como o tempo entre a última irradiação e a realização do ensaio, podem ser suficientes para que os mecanismos de reparação celular ocorram. Ainda, as células com mutação no gene *BRCA*, quando irradiadas, podem simplesmente optar por morrer não havendo formação de dicêntricos, ou a dose utilizada pode não ser suficiente para causar a formação deste tipo de cromossomas, no entanto, pode ser suficiente para causar outros danos no genoma. Assim, no futuro, seria interessante realizar a análise por *array* – CGH (do inglês *Comparative Genomic Hybridization*), uma técnica que permite o mapeamento genético, sendo capaz de detetar alterações no DNA.

Para além da exposição de LCLs a raios-X com valores de dose de exposição característicos de diagnóstico, culturas primárias foram também expostas a radiação ionizante correspondente a uma dose efetiva de 2 Sv, através de um equipamento que é utilizado na

realização de tratamentos de radioterapia. Ensaios radiobiológicos foram realizados para avaliar a atividade metabólica, através do ensaio do XTT, e a genotoxicidade, através do ensaio de micronúcleos, com o intuito de reproduzir os resultados obtidos por Baert *et al.* (65).

Relativamente à atividade metabólica, os valores obtidos para o grupo de portadores de mutação no gene *BRCA2* tiveram uma mediana de 94,28%, ou seja, não se verificou uma redução considerável da atividade metabólica, sugerindo que a dose efetiva de 2 Sv não parece também ser suficiente para causar alterações no metabolismo celular. Estes resultados contrariam os esperados uma vez que, de acordo com a literatura, esta dose é capaz de reduzir a atividade metabólica em outras linhas celulares, confirmado através da realização do ensaio do MTT, muito semelhante ao ensaio do XTT, levando, mais uma vez, a crer que este último ensaio pode não adequado para avaliar os efeitos decorrentes da exposição a radiação ionizante em linhas celulares linfoblastoides (98). Contudo, a dose utilizada, apesar de não induzir modificações no metabolismo celular, poderia ser suficiente para causar lesões nas células, realizando-se o ensaio de micronúcleos por bloqueio da citocinese para avaliação da genotoxicidade. Os micronúcleos são fragmentos de DNA não incorporados no núcleo, que resultam da exposição a agentes genotóxicos, nomeadamente a radiação ionizante. Para a visualização destas estruturas ao microscópio, foi utilizada a citocalasina-B, a qual atua através do impedimento da divisão do citoplasma celular (85,86).

Em relação ao ensaio de micronúcleos por bloqueio da citocinese, tal como para a análise morfológica, o protocolo relativo ao mesmo foi otimizado no que diz respeito à coloração das lâminas. Para tal, a coloração com Giemsa a 4% foi realizada com duas abordagens distintas: com PBS 1X e com água destilada, verificando-se que a utilização de água destilada conduziu a melhores resultados. Desta forma, no futuro, aquando da execução do ensaio de micronúcleos, deve-se adotar este método de coloração. Relativamente aos resultados obtidos a partir do ensaio otimizado, realizado após a exposição correspondente uma dose efetiva de 2 Sv, não foi possível obter células com citoplasma bem definido que permitissem realizar a contagem de células binucleadas e, conseqüentemente, de micronúcleos, verificando-se que as células eram suscetíveis à rotura do citoplasma quando expostas a radiação. Desta forma, a irradiação parece estar associada à ausência de observação de citoplasma com boa definição. Esta ausência de definição pode, por um lado, estar associada às próprias linhas celulares que foram utilizadas uma vez que estas são bastante sensíveis, podendo a radiação ionizante, ao atingir as células, afetar o citoplasma. Por outro lado, pode estar associada a humidade das lâminas aquando da coloração. Um estudo desenvolvido por Goh *et al.* avaliou as diferentes razões que podem ser

responsáveis pela ausência de citoplasma na célula, verificando que quando as lâminas entram em contacto com Giemsa a 4% ainda húmidas ocorre rutura do citoplasma (99). Contudo, no projeto, as lâminas foram deixadas a secar de um dia para o outro e para as lâminas relativas à condição não irradiada (controlo), o ensaio realizou-se sem quaisquer condicionantes. Assim, deve-se, no futuro, aumentar o tempo de secagem com o intuito de verificar se, de facto, este pode estar associado a esta falta de condições para a realização do ensaio de micronúcleos para a condição irradiada. Em relação à condição controlo, obtiveram-se células binucleadas com um citoplasma bem definido, todavia, o mesmo não sucedeu com a condição de irradiação, pelo que não foi possível comprovar os resultados obtidos no estudo desenvolvido por Baert *et al.*, no qual se avaliou os efeitos da radiação ionizante diretamente nas células do sangue (65). Desta forma, o ensaio de cromossomas dicêntricos deveria também ter sido empregue para avaliar os efeitos decorrentes da exposição a radiação ionizante correspondente uma dose efetiva de 2 Sv uma vez que os cromossomas dicêntricos são biomarcadores frequentemente utilizados para avaliar a exposição a radiação, não existindo o problema associado à visualização do citoplasma.

Os estudos presentes na literatura relativamente à questão da radiosensibilidade em indivíduos portadores de mutações *BRCA* são contraditórios: enquanto uns afirmam que existe uma associação entre a exposição a radiação em exames de diagnóstico e o aumento do risco de desenvolvimento de cancro, outros não conseguem encontrar qualquer relação. Por um lado, Andrieu *et al.* e Pijpe *et al.* observaram que existe uma relação positiva entre a exposição à radiação após a realização de radiografias ao tórax ou de mamografias, respetivamente, e o desenvolvimento de cancro da mama em indivíduos portadores de variantes causais nos genes *BRCA* (63,64). Contudo, o nosso estudo não suporta estas conclusões uma vez que não foi possível confirmar a existência de associação entre a exposição a radiação ionizante com valores de dose de exposição relativas ao diagnóstico e o aumento do risco de desenvolvimento de cancro em indivíduos portadores. Nos estudos de Narold *et al.* e de Goldfrank *et al.* também não foi encontrada qualquer relação entre a exposição a doses correspondentes a mamografia em portadores e o desenvolvimento de cancro da mama (60,61).

Desta forma, o projeto não conseguiu esclarecer o efeito da radiação ionizante em portadores de mutação no gene *BRCA2*. Na realidade, não é expectável que a realização de um número reduzido de exames imagiológicos que envolvam a exposição a radiação ionizante (quatro) provoque alterações significativas a nível celular, mas sim a exposição cumulativa ao longo de vários anos e considerando um número elevado de exposições. Como perspetiva futura seria interessante proceder a um maior número de irradiações das LCLs, nomeadamente irradiá-

las até que se verifiquem efeitos a nível celular. Estudos adicionais podem ser realizados com o intuito de avaliar a persistência de DSBs após repetidas exposições, através da monitorização da acumulação de proteínas de reparação de DSBs, como as proteínas  $\gamma$ -H2AX (do inglês *H2A histone family member X*) e 53BP1 (do inglês *p53-binding protein 1*). Estas proteínas são biomarcadores utilizados na avaliação da capacidade de reparação de DSBs, crucial para estimar a resposta à exposição a radiação ionizante. Clinicamente, estas análises podem revelar-se ferramentas valiosas na determinação da radiosensibilidade individual (100).



## **6. Conclusão e Perspetivas Futuras**



Nos últimos anos, a questão da radiosensibilidade em indivíduos portadores de mutações nos genes *BRCA1/2* tem suscitado um enorme interesse na comunidade científica. Considerando a maior suscetibilidade de desenvolver cancro, como cancro da mama, cancro do ovário, cancro do pâncreas, cancro da próstata e/ou melanoma primário, em idades precoces, geralmente abaixo dos 50 anos, estes indivíduos são alvo de um seguimento clínico apertado, baseado principalmente em técnicas de diagnóstico por imagem médica que empregam radiação ionizante para a deteção precoce de neoplasias (6–9). Através de um diagnóstico atempado é, muitas vezes, possível proporcionar um tratamento eficaz para o cancro que, quando diagnosticado numa fase mais tardia, é apenas alvo de terapêuticas paliativas, tendo em vista apenas o alívio do sofrimento do doente, associado a uma melhoria do seu bem-estar e da sua qualidade de vida.

Apesar do valor inquestionável destes exames de vigilância que utilizam radiação ionizante, atualmente, ainda existem questões relativas ao risco associado ao seu uso, nomeadamente em pessoas com um risco aumentado de desenvolvimento de cancro, como indivíduos com a síndrome hereditária cancro da mama e ovário.

Desta forma, o objetivo do presente estudo passava por contribuir para o esclarecimento relativo aos possíveis efeitos biológicos decorrentes da exposição de indivíduos diagnosticados com SHCMO a radiação ionizante, comparativamente a indivíduos sem a síndrome, estudando, desta forma, a radiosensibilidade.

No presente estudo e tendo em conta as condições estudadas até ao momento, não foi ainda possível validar se existe, de facto, uma maior radiosensibilidade em portadores de mutação no gene *BRCA2*. Contudo, futuramente, com algumas alterações ao protocolo, as quais foram sugeridas no capítulo anterior, os resultados obtidos poderão ser diferentes, nomeadamente, aumentando a amostra, assim como o número de irradiações a que as linhas celulares linfoblastoides são submetidas, mimetizando o que acontece em contexto clínico.

Assim, apesar de os resultados não permitirem retirar conclusões precisas relativas à radiosensibilidade aumentada em indivíduos com SHCMO, mais estudos devem ser realizados, numa amostra de maiores dimensões, assim como novas técnicas devem ser introduzidas para colmatar as falhas do ensaio do XTT, a fim de confirmar os nossos resultados.



## Referências



1. Ostrow SL, Hershberg R. The Somatic Nature of Cancer Allows It to Affect Highly Constrained Genes. *Genome Biol Evol.* 2016 May;8(5):1614–20.
2. Gonçalves D, Pires AS, Marques IA, Gomes I, Sousa G, Botelho MF, et al. An Overview on Radiation Sensitivity in Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. *Cancers (Basel).* 2022 Jul 2;14(13):3254.
3. Nielsen FC, van Overeem Hansen T, Sørensen CS. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(9).
4. Ricker C. FROM FAMILIES SYNDROMES TO GENES... THE FIRST CLINICAL AND GENETIC CHARACTERIZATIONS OF HEREDITARY SYNDROMES PREDISPOSING TO CANCER: WHAT WAS THE BEGINNING? *Rev Médica Clínica Las Condes.* 2017 Jul;28(4):482–90.
5. Hino O, Kobayashi T. Mourning Dr. Alfred G. Knudson: the two-hit hypothesis, tumor suppressor genes, and the tuberous sclerosis complex. *Cancer Sci.* 2017 Jan;108(1):5–11.
6. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. *BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer.* Seattle (WA): University of Washington: GeneReviews; 1993.
7. Yoshida R. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): review of its molecular characteristics, screening, treatment, and prognosis. *Breast Cancer.* 2021;28(6).
8. Hodgson A, Turashvili G. Pathology of Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Front Oncol.* 2020 Sep 29;10.
9. Hawsawi YM, Al-Numair NS, Sobahy TM, Al-Ajmi AM, Al-Harbi RM, Baghdadi MA, et al. The role of *BRCA1/2* in hereditary and familial breast and ovarian cancers. *Mol Genet Genomic Med.* 2019 Sep 17;7(9).
10. Okano M, Nomizu T, Tachibana K, Nagatsuka M, Matsuzaki M, Katagata N, et al. The relationship between BRCA-associated breast cancer and age factors: an analysis of the Japanese HBOC consortium database. *J Hum Genet.* 2021;66(3).
11. *Understanding Genetics: A New York, Mid-Atlantic Guide for Patients and Health Professionals.* Washington (DC): Genetic Alliance Monographs and Guides; 2009.
12. Elsayegh N, Barrera AMG, Muse KI, Lin H, Kuerer HM, Helm M, et al. Evaluation of BRCAPRO Risk Assessment Model in Patients with Ductal Carcinoma In situ Who Underwent Clinical BRCA Genetic Testing. *Front Genet.* 2016 Apr 27;7.
13. Hart SN, Polley EC, Yussuf A, Yadav S, Goldgar DE, Hu C, et al. Mutation prevalence tables for hereditary cancer derived from multigene panel testing. *Hum Mutat.* 2020 Aug 9;41(8).
14. Daly MB, Pal T, Berry MP, Buys SS, Dickson P, Domchek SM, et al. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice

- Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Cancer Netw*. 2021 Jan 6;19(1):77–102.
15. Guia As mutações BRCA e o cancro. Liga Contra o Cancro. 2019. Available from: <https://www.ligacontracancro.pt/www/uploads/sede/campanha-brca/guia-brca-2019-vf-16.pdf>
  16. Benetou V, Lagiou A, Lagiou P. Chemoprevention of cancer: current evidence and future prospects. 2015 Sep 28;4:916.
  17. Ali S, Rasool M, Chaoudhry H, N Pushparaj P, Jha P, Hafiz A, et al. Molecular mechanisms and mode of tamoxifen resistance in breast cancer. *Bioinformation*. 2016;12(3):135–9.
  18. King M-C. Tamoxifen and Breast Cancer Incidence Among Women With Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2. *JAMA*. 2001 Nov 14;286(18):2251.
  19. Phillips K-A, Milne RL, Rookus MA, Daly MB, Antoniou AC, Peock S, et al. Tamoxifen and Risk of Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *J Clin Oncol*. 2013 Sep 1;31(25):3091–9.
  20. Iodice S, Barile M, Rotmensz N, Feroce I, Bonanni B, Radice P, et al. Oral contraceptive use and breast or ovarian cancer risk in BRCA1/2 carriers: A meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2010 Aug;46(12):2275–84.
  21. Lee EYHP, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Oct;2(10).
  22. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Science* (80- ). 1994 Oct 7;266(5182):66–71.
  23. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995 Dec;378(6559):789–92.
  24. Gorodetska I, Kozeretska I, Dubrovska A. BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. *J Cancer*. 2019;10(9):2109–27.
  25. Clark SL, Rodriguez AM, Snyder RR, Hankins GDV, Boehning D. STRUCTURE-FUNCTION OF THE TUMOR SUPPRESSOR BRCA1. *Comput Struct Biotechnol J*. 2012 Apr;1(1).
  26. National Center for Biotechnology Information. BRCA1 BRCA1 DNA repair associated [ *Homo sapiens* (human) ]. 2022.
  27. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer*. 2012 Jan 23;12(1):68–78.
  28. National Center for Biotechnology Information. BRCA2 BRCA2 DNA repair associated [ *Homo sapiens* (human) ]. 2022.

29. Vidarsson H, Mikaelisdottir E, Eyfjörd J, Ögmundsdóttir H, Rafnar T, Valgeirsdóttir S. BRCA2 interacting proteins. *Breast Cancer Res.* 2000 Mar 12;2(S1):P4.02.
30. Kelsey CA, Heintz PH, Sandoval DJ, Chambers GD, Adolphi NL, Paffett KS. *Radiation Biology of Medical Imaging*. First Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2014. 41 p.
31. Tuieng RJ, Cartmell SH, Kirwan CC, Sherratt MJ. The Effects of Ionising and Non-Ionising Electromagnetic Radiation on Extracellular Matrix Proteins. *Cells.* 2021 Nov 5;10(11):3041.
32. Beyzadeoglu M, Ozyigit G, Ebruli C. Radiation Physics. In: *Basic Radiation Oncology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010.
33. Podgorsak EB. Basic Radiation Physics . In: *Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students*. 2005. p. 1–44.
34. Donya M, Radford M, ElGuindy A, Firmin D, Yacoub MH. Radiation in medicine: Origins, risks and aspirations. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2014 Dec;2014(4):57.
35. Kelsey CA, Heintz PH, Sandoval DJ, Chambers GD, Adolphi NL, Paffett KS. Radiation Interactions with Tissue. In: *Radiation Biology of Medical Imaging*. First Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2014. p. 61–80.
36. Minimum Essential Syllabus for Radiobiology. In: *Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students*. Viena: International Atomic Energy Agency; 2010. p. 13–56.
37. Neshasteh-Riz A, Mahmoud Pashazadeh A, Mahdavi SR. Relative Biological Effectiveness (RBE) of  $(^{131}\text{I})$  Radiation Relative to  $(^{60}\text{Co})$  Gamma Rays. *Cell J.* 2013;15(3).
38. Kelsey CA, Heintz PH, Sandoval DJ, Chambers GD, Adolphi NL, Paffett KS. Cell Survival Curves. In: *Radiation Biology of Medical Imaging*. First Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2014. p. 81–104.
39. Hur W, Yoon S. Molecular Pathogenesis of Radiation-Induced Cell Toxicity in Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2017 Dec 18;18(12):2749.
40. Desouky O, Ding N, Zhou G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *J Radiat Res Appl Sci.* 2015 Apr;8(2).
41. Gonçalo M, Botelho MF. “Radiações e Electricidade.” In: *Fisiopatologia - Fundamentos e Aplicações*. Lisboa: Lidel - Edições Técnicas Lda; 2007. p. 79–102.
42. Bushberg JT, Seibert JA, Leidholdt EM, Boone JM. *The Essential Physics of Medical Imaging*. Third Edition. Philadelphia; 2012.
43. Kelsey CA, Heintz PH, Sandoval DJ, Chambers GD, Adolphi NL, Paffett KS. DNA and Genetics. In: *Radiation Biology of Medical Imaging*. First Edition. New Jersey: John Wiley

- & Sons, Inc; 2014. p. 105–24.
44. Sofińska K, Wilkosz N, Szymoński M, Lipiec E. Molecular Spectroscopic Markers of DNA Damage. *Molecules*. 2020 Jan 28;25(3):561.
  45. Kelsey CA, Heintz PH, Sandoval DJ, Chambers GD, Adolphi NL, Paffett KS. Radiation Damage and Repair of Cells. In: *Radiation Biology of Medical Imaging*. First Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2014. p. 125–44.
  46. Bai Y, Wang W, Wang J. Targeting DNA repair pathways: mechanisms and potential applications in cancer therapy. *Genome Instab Dis*. 2020 Nov 5;1(6):318–38.
  47. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature*. 2003;421:436–40.
  48. Pečina-Šlaus N, Kafka A, Salamon I, Bukovac A. Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. *Front Mol Biosci*. 2020 Jun 26;7.
  49. Charles M. UNSCEAR Report 2000: Sources and Effects of Ionizing Radiation. *J Radiol Prot*. 2001 Mar;21(1):83–5.
  50. Bercovich E, Javitt MC. Medical Imaging: From Roentgen to the Digital Revolution, and Beyond. *Rambam Maimonides Med J*. 2018 Oct 4;9(4).
  51. Berger M, Yang Q, Maier A. X-ray Imaging. In: *Medical Imaging Systems: An Introductory Guide* [Internet]. Springer; 2018. p. 119–45.
  52. Hashem N, Pryor M, Haas D, Hunter J. Design of a Computed Tomography Automation Architecture. *Appl Sci*. 2021 Mar 23;11(6):2858.
  53. Garvey CJ. Computed tomography in clinical practice. *BMJ*. 2002 May 4;324(7345):1077–80.
  54. Bell D, Bashir U. Pitch (CT). In: *Radiopaedia.org* [Internet]. 2012. Available from: <http://radiopaedia.org/articles/18984>
  55. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int J Med Sci*. 2012;9(3):193–9.
  56. Jaffray DA, Gospodarowicz MK. Radiation Therapy for Cancer. In: *Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3): Cancer*. The World Bank; 2015. p. 239–47.
  57. Paul A, Paul S. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014;19.
  58. Drooger JC, Hooning MJ, Seynaeve CM, Baaijens MHA, Obdeijn IM, Sleijfer S, et al. Diagnostic and therapeutic ionizing radiation and the risk of a first and second primary breast cancer, with special attention for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: A critical

- review of the literature. *Cancer Treat Rev.* 2015 Feb 1;41(2).
59. Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U, Lim D-S, Regel E, Dinh C, et al. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking *Brca2*. *Nature.* 1997 Apr 24;386(6627).
  60. Narod SA, Lubinski J, Ghadirian P, Lynch HT, Moller P, Foulkes WD, et al. Screening mammography and risk of breast cancer in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers: a case-control study. *Lancet Oncol.* 2006 May 1;7(5).
  61. Goldfrank D, Chuai S, Bernstein JL, Ramon y Cajal T, Lee JB, Alonso MC, et al. Effect of Mammography on Breast Cancer Risk in Women with Mutations in *BRCA1* or *BRCA2*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(11).
  62. John EM, McGuire V, Thomas D, Haile R, Ozcelik H, Milne RL, et al. Diagnostic Chest X-Rays and Breast Cancer Risk before Age 50 Years for *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013 Sep;22(9).
  63. Andrieu N, Easton DF, Chang-Claude J, Rookus MA, Brohet R, Cardis E, et al. Effect of Chest X-Rays on the Risk of Breast Cancer Among *BRCA1/2* Mutation Carriers in the International *BRCA1/2* Carrier Cohort Study: A Report from the EMBRACE, GENEPSO, GEO-HEBON, and IBCCS Collaborators' Group. *J Clin Oncol.* 2006 Jul 20;24(21).
  64. Pijpe A, Andrieu N, Easton DF, Kesminiene A, Cardis E, Nogues C, et al. Exposure to diagnostic radiation and risk of breast cancer among carriers of *BRCA1/2* mutations: retrospective cohort study (GENE-RAD-RISK). *BMJ.* 2012 Sep 6;345:e5660.
  65. Baert A, Depuydt J, Van Maerken T, Poppe B, Malfait F, Storm K, et al. Increased chromosomal radiosensitivity in asymptomatic carriers of a heterozygous *BRCA1* mutation. *Breast Cancer Res.* 2016 Dec 17;18(1):52.
  66. Baert A, Depuydt J, Van Maerken T, Poppe B, Malfait F, Van Damme T, et al. Analysis of chromosomal radiosensitivity of healthy *BRCA2* mutation carriers and non-carriers in *BRCA* families with the G2 micronucleus assay. *Oncol Rep.* 2017 Mar;37(3).
  67. Santos J, Foley S, Paulo G, McEntee MF, Rainford L. The establishment of computed tomography diagnostic reference levels in Portugal. *Radiat Prot Dosimetry.* 2014 Feb 1;158(3):307–17.
  68. Ryan JL, Kaufmann WK, Raab-Traub N, Oglesbee SE, Carey LA, Gulley ML. Clonal evolution of lymphoblastoid cell lines. *Lab Invest.* 2006;86(11):1193–200.
  69. Hussain T, Mulherkar R. Lymphoblastoid Cell lines: a Continuous in Vitro Source of Cells to Study Carcinogen Sensitivity and DNA Repair. *Int J Mol Cell Med.* 2012;1(2):75–87.
  70. Segeritz C-P, Vallier L. Cell Culture. In: *Basic Science Methods for Clinical Researchers.* Elsevier; 2017. p. 151–72.

71. Scheinfeldt LB, Hodges K, Pevsner J, Berlin D, Turan N, Gerry NP. Genetic and genomic stability across lymphoblastoid cell line expansions. *BMC Res Notes*. 2018 Dec 3;11(1):558.
72. Gupta N. DNA extraction and polymerase chain reaction. *J Cytol*. 2019;36(2):116–7.
73. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *J Biomed Biotechnol*. 2009.
74. Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Ávila JA, López-Guerrero JA, Aguilar-Quesada R. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreserv Biobank*. 2016 Aug;14(4):264–70.
75. Lindström HJG, Friedman R. Inferring time-dependent population growth rates in cell cultures undergoing adaptation. *BMC Bioinformatics*. 2020 Dec 17;21(1):583.
76. Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *J Clin Microbiol*. 2003 Jan;41(1):506–8.
77. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018 Jan 21;120(1).
78. Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CM. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*. 2012 Mar 21;64(2):109–30.
79. Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016 Nov;(11).
80. Pietkiewicz S, Schmidt JH, Lavrik IN. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *J Immunol Methods*. 2015 Aug;423:99–103.
81. Phillips DH, Arlt VM. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. In 2009. p. 87–110.
82. Nikolakopoulou A, Peppas V, Alexiou A, Pissakas G, Terzoudi G, Karaiskos P. Comparison and Evaluation of Different Radiotherapy Techniques Using Biodosimetry Based on Cytogenetics. *Cancers (Basel)*. 2021 Dec 29;14(1):146.
83. Abe Y, Miura T, Yoshida MA, Ujiie R, Kurosu Y, Kato N, et al. Increase in dicentric chromosome formation after a single CT scan in adults. *Sci Rep*. 2015 Nov 9;5(1):13882.
84. Lee Y, Jin YW, Wilkins RC, Jang S. Validation of the dicentric chromosome assay for radiation biological dosimetry in South Korea. *J Radiat Res*. 2019 Oct 23;60(5):555–63.
85. Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and

- Future Directions. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 24;21(4):1534.
86. Sioen S, Cloet K, Vral A, Baeyens A. The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay on Human Isolated Fresh and Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Pers Med.* 2020 Sep 14;10(3):125.
  87. Vogin G, Foray N. The law of Bergonié and Tribondeau: A nice formula for a first approximation. *Int J Radiat Biol.* 2013 Jan 24;89(1):2–8.
  88. Liberal F. Avaliação e Caracterização por Métodos Computacionais de Diferentes Radioisótopos no Contexto da Terapia Paliativa de Metástases Ósseas. Universidade do Porto; 2013.
  89. Gomes I. Estratificação do Risco na resposta à radiação ionizante na Síndrome Hereditária para cancro da mama e do ovário associada aos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Universidade de Coimbra; 2021.
  90. Monteiro L. Sensibilidade à radiação ionizante de portadores de variantes causais nos genes *BRCA1/2*. Universidade de Coimbra; 2021.
  91. Peixoto A, Santos C, Rocha P, Pinheiro M, Príncipe S, Pereira D, et al. The c.156\_157insAlu *BRCA2* rearrangement accounts for more than one-fourth of deleterious *BRCA* mutations in northern/central Portugal. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Mar 25;114(1):31–8.
  92. Deng C-X. *BRCA1*: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res.* 2006 Mar 6;34(5):1416–26.
  93. Able AJ, Guest DI, Sutherland MW. Use of a New Tetrazolium-Based Assay to Study the Production of Superoxide Radicals by Tobacco Cell Cultures Challenged with Avirulent Zoospores of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* 1. *Plant Physiol.* 1998 Jun 1;117(2):491–9.
  94. Vasiljevic ZZ, Dojcinovic MP, Krstic JB, Ribic V, Tadic NB, Ognjanovic M, et al. Synthesis and antibacterial activity of iron manganite ( $\text{FeMnO}_3$ ) particles against the environmental bacterium *Bacillus subtilis*. *RSC Adv.* 2020;10(23):13879–88.
  95. Riss T. Is Your MTT Assay Really the Best Choice? Promega Corporation. Available from: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/is-your-mtt-assay-really-the-best-choice/>
  96. Posimo JM, Unnithan AS, Gleixner AM, Choi HJ, Jiang Y, Pulugulla SH, et al. Viability Assays for Cells in Culture. *J Vis Exp.* 2014 Jan 20;(83).
  97. Services UD of H and H. About Dicentric Chromosome Assays [Internet]. 2022. Available from: <https://remm.hhs.gov/aboutdicentrics.htm>
  98. Bahreyni Toossi MT, Khademi S, Azimian H, Mohebbi S, Soleymanifard S. Assessment of

The Dose-Response Relationship of Radiation-Induced Bystander Effect in Two Cell Lines Exposed to High Doses of Ionizing Radiation (6 and 8 Gy). *Cell J.* 2017 Oct;19(3):434–42.

99. Goh VST, Nakayama R, Blakely WF, Abe Y, Chua CEL, Chew ZH, et al. Improved harvest and fixation methodology for isolated human peripheral blood mononuclear cells in cytokinesis-block micronucleus assay. *Int J Radiat Biol.* 2021 Feb 1;97(2):194–207.
100. Bogdanova N V., Jguburia N, Ramachandran D, Nischik N, Stemwedel K, Stamm G, et al. Persistent DNA Double-Strand Breaks After Repeated Diagnostic CT Scans in Breast Epithelial Cells and Lymphocytes. *Front Oncol.* 2021 Apr 23;11.

Anexo 1



COMISSÃO DE ÉTICA DA FMUC

Of. Ref<sup>o</sup> 103-CE-2019

Data 21 / 10 / 2019

C/conhecimento ao aluno

Exmo. Senhor  
Prof. Doutor António Jorge Correia Gouveia  
Ferreira  
Diretor do Gabinete de Estudos Avançados  
FMUC

**Assunto: Projeto de Investigação no âmbito do Mestrado em Investigação Biomédica (ref<sup>o</sup> CE-103/2019)**

**Candidato(a):** Lúcia de Fátima Mendes Monteiro

**Título do Projeto:** "*Sensibilidade à radiação ionizante em portadores de variantes causais nos genes BRCA1/2*".

A Comissão de Ética da Faculdade de Medicina, após análise do projeto de investigação supra identificado, decidiu emitir o parecer que a seguir se transcreve:

**"Parecer favorável. No entanto, a Comissão sugere a utilização, no texto de Consentimento Informado, de uma linguagem mais acessível à compreensão do doente".**

Queira aceitar os meus melhores cumprimentos.

O Presidente,

Prof. Doutor João Manuel Pedroso de Lima

HC

SERVIÇOS TÉCNICOS DE APOIO À GESTÃO - STAG - COMISSÃO DE ÉTICA

Pólo das Ciências da Saúde - Unidade Central

Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-354 COIMBRA - PORTUGAL  
Tel: +351 239 857 708 (Ext. 542708) | Fax: +351 239 823 236  
E-mail: [comissaoetica@fmed.ucp.pt](mailto:comissaoetica@fmed.ucp.pt) | [www.fmed.ucp.pt](http://www.fmed.ucp.pt)

Anexo 2



**Parecer Final da Comissão de Ética**

Trabalho de Investigação nº: TI 01/2020

Data: 06/02/2020

Apreciado na reunião da Comissão de Ética de 06/02/2020, com parecer positivo condicionado à reformulação do consentimento informado no sentido de incluir informação relativa à colheita de tecidos e à autorização dos Diretores dos serviços envolvidos. ....

PEL'A COMISSÃO DE ÉTICA

António Jo. Freixo, R.

(\*) Indicar o resultado da votação de **aprovação** ou **rejeição** e se por unanimidade ou maioria, assinalando e juntando as declarações de voto que houver.



Anexo 3

Estratificação do risco na resposta à radiação ionizante na síndrome hereditária para cancro da mama e do ovário associada aos genes *BRCA1/2*

Registo de informações

1. Número do processo: \_\_\_\_\_

2. Código de identificação: \_\_\_\_\_

3. Identificação da família: \_\_\_\_\_

4. Idade: \_\_\_\_\_

5. Sexo:

Feminino

Masculino

6. Peso: \_\_\_\_\_

7. Altura: \_\_\_\_\_

8. Profissão: \_\_\_\_\_

9. Residência: \_\_\_\_\_

10. Variante Familiar:

---

11. Gene:

*BRCA1*

*BRCA2*

**12. É portador ou não portador da variante familiar?**

- Portador
- Não portador

**13. Fenótipo:**

- Saudável
- Doente oncológico

**14. Já realizou exames com radiação ionizante?**

- Sim
- Não

**14.1. Se sim, preencha a seguinte tabela:**

Tipo de exame		Nº de vezes
Radiografia do tórax		
Mamografia		
TAC	Cerebral	
	Torácica	
	Abdominal	
Medicina Nuclear	Cintigrafia Óssea	
	Cintigrafia de Perfusão do Miocárdio	
	Angiografia de Radionuclídeos (ARN)	
	Cintigrafia Renal	
	Cintigrafia Pulmonar de Ventilação / Perfusão	
	Cintigrafia cerebral	
	PET/CT com <sup>18</sup> F-FDG	
	PET/CT com <sup>18</sup> F-NaF	
	PET/CT com <sup>68</sup> Ga-Análogos da Somatostatina ( <sup>68</sup> Ga-Dotanoc)	
	PET/CT com <sup>68</sup> Ga-PSMA	

15. Já foi submetido a tratamentos de radioterapia?

- Sim
- Não

15.1. Se sim, a que região/regiões?

\_\_\_\_\_

15.2. Número de sessões: \_\_\_\_\_

16. Já foi submetido a tratamentos de medicina nuclear?

- Sim
- Não

16.1. Se sim, quais?

\_\_\_\_\_

17. Quantidade de água que ingere por dia:

- Menos de um litro
- Aproximadamente 1,5l
- Mais de 1,5l

18. Fumador:

- Sim
- Não

18.1. Se sim, unidades de maço ano: \_\_\_\_\_

19. Pratica exercício físico?

- Sim
- Não

19.1. Se sim, com que frequência?

---

19.2. Que tipo de atividade física pratica?

---

19.3. Com que duração?

---

20. Antecedentes patológicos:

- Diabetes
- Hipertensão arterial
- Dislipidemia
- Outros:

---

---

---

---

