



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Inês Carolina Fernandes Gomes

**ESTRATIFICAÇÃO DO RISCO NA RESPOSTA À
RADIAÇÃO IONIZANTE NA SÍNDROME HEREDITÁRIA
PARA CANCRO DA MAMA E OVÁRIO ASSOCIADA
AOS GENES *BRCA1* E *BRCA2***

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado 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.

Outubro de 2021

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 maior meio para alcançar a felicidade é contribuir para a felicidade dos outros.”

Baden-Powell

Agradecimientos

Muitos foram os que contribuíram de uma forma direta ou indireta para a realização desta dissertação. A todos vós, muito obrigado.

Agradeço à Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, diretora do Serviço de Biofísica e orientadora desta dissertação, por toda a disponibilidade e apoio na partilha do conhecimento científico e na revisão da presente dissertação.

Agradeço à Professora Doutora Margarida Abrantes, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, por ter sido um exemplo de trabalho e dedicação. Obrigada por todo o apoio, orientação e disponibilidade prestados ao longo deste trabalho. Sem si, a realização do mesmo não tinha sido possível. Sem dúvida que é uma fonte de inspiração para mim.

Agradeço à Professora Doutora Ana Salomé Pires, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pelo apoio na análise estatística deste trabalho, por ser um exemplo de dedicação e empenho e pela simpatia e disponibilidade demonstradas.

Agradeço à Mestre Inês Marques, por ser uma pessoa incansável e sempre disponível nas diferentes fases deste projeto. É sem dúvida uma fonte de inspiração.

Agradeço à Professora Doutora Sofia Maia, médica do Serviço de Genética Médica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, e à Dr.^a Gabriela Sousa, diretora do Serviço de Oncologia Médica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, pela colaboração na identificação dos indivíduos deste trabalho.

Agradeço à Professora Joana Santos, Professora Auxiliar da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, pela colaboração na realização da irradiação do presente trabalho e pela cedência dos fantomas utilizados.

Agradeço ao Hospital da Luz Coimbra e, em particular, ao Professor Doutor Filipe Caseiro Alves, Diretor Clínico do Hospital da Luz Coimbra, pela colaboração na irradiação

das amostras do estudo e pela cedência do Serviço de Radiologia do Hospital da Luz Coimbra para a realização das mesmas.

Agradeço aos alunos de Doutoramento do Instituto de Biofísica pelo incentivo, ajuda, preocupação e partilha de conhecimento.

Agradeço aos alunos de Mestrado do Instituto de Biofísica por toda a ajuda, preocupação, amizade e também pelos momentos de descontração.

Agradeço à Lúcia Monteiro por toda a ajuda e colaboração nas diferentes fases deste trabalho. Obrigada pela preocupação, companheirismo e amizade ao longo deste último ano.

Agradeço à Carolina, ao Manuel e ao Miguel, por todo o apoio que me deram ao longo destes 5 anos. Foi uma longa caminhada juntos. Agradeço-vos por todas as palavras amigas que apareceram no momento certo. Por todos aqueles momentos em que me guiaram a bom porto, pelo vosso companheirismo e sobretudo pela amizade. Obrigada por partilharem comigo todas as preocupações, mas também todos os momentos de felicidade que, certamente, continuaremos a partilhar. Vocês tornam indiscutivelmente este mundo num sítio melhor.

Agradeço às Marianas, à Eva, à Sofia, à Beatriz e à Laura por serem o meu maior amparo ao longo destes anos. São sem dúvida das melhores pessoas que levo da faculdade e que estarão para sempre na minha vida. Obrigada pela força que me deram não só neste último ano, mas ao longo destes 5 anos, e pela amizade que demonstraram a cada ano que passou.

Agradeço à Rita, a minha melhor amiga e colega de casa, por ter tornado estes 5 anos mais fáceis. Obrigada por todo o teu apoio, paciência, companheirismo e amizade.

Agradeço às Filipas, por partilharem comigo o meu dia-a-dia. Não tenho palavras para descrever tudo aquilo que vocês representam para mim. Por serem um dos meus maiores orgulhos e exemplos a seguir na vida. Vocês coloriram a minha vida e espero ter colorido a vossa.

Agradeço ao Prata, por todo o apoio e segurança que me deu na escrita desta dissertação. Ambos sabemos que não foi fácil, mas obrigada por nunca me teres deixado cair e me teres levantado sempre que precisei. Sabes o que significas para mim e que não consigo descrever o quanto agradecida estou por teres entrado na minha vida.

Agradeço ao meu irmão Tiago e à Raquel por toda a paciência que tiveram comigo ao longo destes anos. Sabem que são o meu maior orgulho e o meu maior exemplo. O vosso amor demonstrou-me que a vida tem coisas tão bonitas! Obrigada por tudo.

Por fim, mas se calhar o agradecimento mais importante, agradeço aos meus pais, Armindo e Marcelina, por terem sido os maiores impulsionadores da pessoa que me tenho vindo a tornar. A vocês, pela vossa paciência, amor, apoio e dedicação, o meu muito obrigada. Sabem que vos amo para todo o sempre e que sem vocês por trás a apoiarem-me nada disto seria possível. Obrigada por me deixarem realizar todos os meus sonhos e suportarem todas as minhas escolhas.

Índice

Agradecimentos	I
Índice	VII
Resumo	XI
Abstract	XV
Lista de abreviaturas.....	XIX
Lista de Figuras e Tabelas.....	XXV
Lista de figuras.....	XXVII
Lista de tabelas	XXIX
1. Introdução	1
1.1 Síndrome Hereditária do Cancro da Mama e do Ovário	3
1.1.1 Diagnóstico e Prevenção	6
1.1.2 Genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	10
1.2 Radiação	13
1.2.1 Efeitos biológicos da Radiação Ionizante	13
1.2.2 A radiação ionizante e o ADN.....	17
1.2.3 Aplicações da radiação ionizante	20
1.3 Impacto da radiação ionizante em pessoas portadoras de variantes causais de BRCA1 e BRCA2	25
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	37
3.2 Irradiação	37
3.2.1 Mamografia.....	37
3.2.2 Tomografia Computorizada.....	39
3.3 Cultura Celular.....	40
3.4 Isolamento das células monucleares de sangue periférico	40
3.5 Ensaio de microcultura de fluoresceína diacetato	42

3.6	Análise do stresse oxidativo.....	43
3.6.1	Avaliação da produção de peróxidos intracelulares.....	44
3.6.2	Avaliação da produção do radical superóxido.....	44
3.6.3	Avaliação da produção da glutatona reduzida	45
3.7	Ensaio de micronúcleos em sangue total.....	45
3.8	Análise Estatística	48
4.	Resultados	49
4.1	Caracterização dos participantes	51
4.2	Avaliação da viabilidade celular	59
4.3	Avaliação do stresse oxidativo	62
4.3.1	Avaliação da produção de peróxidos intracelulares.....	63
4.3.2	Avaliação da produção do radical superóxido.....	65
4.3.3	Avaliação da produção da glutatona reduzida	67
4.4	Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio de micronúcleos	68
5.	Discussão.....	73
6.	Conclusão	87
7.	Referências.....	91
	Anexo 1.....	101
	Anexo 2.....	102
	Anexo 3.....	103
	Anexo 4.....	104

Resumo

Introdução: Os indivíduos portadores de mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, que codificam para a Síndrome Hereditária do Cancro da Mama e do Ovário (SHCMO), são conhecidos por se associarem a um maior risco de desenvolvimento de neoplasias do que a população em geral. De facto, estes indivíduos são seguidos em programas de rastreio rigorosos que utilizam métodos complementares de diagnóstico com radiação ionizante. Apesar do benefício indiscutível destes exames, têm sido levantadas algumas questões relativamente ao seu benefício em pessoas com suscetibilidade genética para o desenvolvimento de neoplasias. Assim, este estudo surgiu com o objetivo de contribuir para o esclarecimento acerca do aumento do risco neoplásico quando estes indivíduos são expostos à radiação ionizante usada nos exames de rastreio.

Materiais e Métodos: Colheu-se uma amostra de sangue periférico de indivíduos portadores e não portadores de variantes causais da SHCMO com mutação no gene *BRCA2*. Após a colheita, algumas amostras foram submetidas a uma mamografia e as restantes a TC lombar. De seguida, avaliou-se a viabilidade celular recorrendo ao ensaio do FMCA às 24h e às 72h após a irradiação, realizou-se a análise do stresse oxidativo avaliando as ROS com recurso as sondas DHE e DCF, e as defesas antioxidantes, utilizando a sonda alaranjando de mercúrio. Avaliou-se ainda a genotoxicidade às 2h e 4h após a irradiação através do ensaio dos micronúcleos.

Resultados: No ensaio de FMCA, não houve diferenças de viabilidade entre grupos (portadores e não portadores) ou entre doses de exposição diferentes (mamografia e TC) e a mediana dos valores de viabilidade celular foi cerca de 100%. Acerca da produção de ROS, observou-se que quando comparadas as concentrações de peróxidos intracelulares para o grupo de portadores e o grupo de não portadores das amostras que tinham sido sujeitas a TC, obtiveram-se diferenças com significado estatístico. Todavia, não observamos diferenças com significado estatístico para mais nenhuma comparação, ou seja, entre grupos (portadores e não portadores) para a dose de mamografia ou entre diferentes doses de exposição, seja para a outra espécie reativa ou para a defesa antioxidante. Por fim, não foi possível avaliar a genotoxicidade porque não foi possível obter células binucleadas suficientes com citoplasma bem definido que nos permitissem realizar a contagem dos micronúcleos.

Discussão: Estes resultados contrariam os resultados esperados, nomeadamente em relação às amostras submetidas a TC, que foram irradiadas com uma dose elevada e, por isso, seria expectável que se observasse uma menor viabilidade e um aumento das espécies reativas de oxigénio. Em ambos os protocolos de fluorescência (FMCA e ROS) seria interessante fazer as respetivas avaliações com recurso a citometria de fluxo porque a fluorescência faz uma medição total da amostra e não célula a célula. Em relação ao ensaio dos micronúcleos, não foram obtidas células com citoplasma definido porque as lâminas poderiam não estar totalmente secas aquando da coloração com Giemsa.

Conclusão: No presente trabalho e tendo em conta as condições estudadas não conseguimos provar que existe um aumento da radiosensibilidade de portadores de mutação no gene *BRCA2*, pelo que são sugeridas alterações ao protocolo nomeadamente em relação ao estudo do efeito da dose cumulativa, como é o caso da imortalização de uma linha de linfócitos portadores da mutação fundadora portuguesa. o que poderá condicionar os resultados.

Abstract

Introduction: *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers are known to have a higher risk of developing cancer than the general population. Indeed, these individuals are followed in screening programs that use diagnostic imaging exams with ionizing radiation. Despite the benefit of these exams, some questions have been raised regarding their benefit in people with genetic susceptibility to the development of neoplasms. Therefore, this study emerged with the aim of contributing to the clarification of whether there is an increased neoplastic risk in these individuals due to the ionizing radiation used in the screening exams.

Methods: A peripheral blood sample was collected from carriers and non-carriers of causal variants of HBOC with mutation in the *BRCA2* gene. After collection, some samples were submitted to mammography and the rest to lumbar CT. The cell viability was measured using the FMCA assay at 24h and 72h after irradiation, the oxidative stress measured through the evaluation of the ROS using DHE and DCF probes and the antioxidant defenses using the orange mercury probe at 2h and 4h after the irradiation. The genotoxicity was measured at 72h after the irradiation using the micronucleus assay.

Results: In the FMCA assay, there was no viability differences between the groups (carriers and no carriers) or between different exposure doses (mammography and TC) and the median cell viability values were about 100%. Concerning ROS production, it was observed that when comparing the intracellular peroxide concentrations for the group of carriers and the group of non-carriers that had been subjected to CT, differences with statistical significance were obtained. However, we did not observe statistically significant differences for any further comparison, that is, between groups (carriers and non-carriers) for the mammography dose or between different exposure doses, either for the other reactive species or for the antioxidant defense. Finally, it was not possible to measure genotoxicity because it was not possible to obtain enough binucleated cells with well-defined cytoplasm to allow us to perform the micronucleus count.

Discussion: These results contradict the expected results, namely in relation to the samples submitted to CT, which were irradiated with a high dose and, therefore it would be expected to observe a lower viability and an increase of reactive oxygen species. In both fluorescence assay's (FMCA and ROS), it would be interesting to perform the measurement using flow cytometry because the fluorescence takes a full measurement of the sample and not cell by cell. In relation to micronucleus assay, cells with defined cytoplasm were not obtained because the slides might not be fully dry when stained with Giemsa.

Conclusion: In this work and considering the conditions studied, we were unable to prove that there is an increase in the radiosensitivity of mutation carriers in the *BRCA2* gene. Therefore, changes to the protocol are suggested, namely in relation to the study of the effect of the cumulative dose, as is the case of the immortalization of a line of lymphocytes carrying the Portuguese founding mutation which may affect the results.

Lista de abreviaturas

ABRAXAS	<i>BRCA1 A Complex Subunit</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
BARD1	<i>BRCA1 Associated RING Domain protein 1</i>
BER	<i>Base excision repair</i>
BRCA1	<i>BReast CAncer gene 1</i>
BRCA2	<i>BReast CAncer gene 2</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>
CC	Crânio caudal
CDK	<i>Cyclin-depend kinase</i>
CHUC	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
CHK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
CTDI _{vol}	<i>Computed tomography dose index (volume)</i>
CtIP	<i>C-terminal binding protein 1 interacting protein</i>
DCF	2', 7'-diclorofloresceína
DCFH	2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DCFH ₂ -DA	2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
D _G	Dose glandular média
DDR	<i>DNA damage response</i>
DHE	Dihidroxietídeo
DLP	<i>Dose-length product</i>
DSB	<i>Double strand breaks</i>
e ⁻	Elétrão
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	<i>Fluorescein diacetate</i>
FMCA	<i>Fluorometric microculture cytotoxicity assay</i>
FMUC	Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
GSH	Glutathiona reduzida
Gy	Gray
h	Horas
H [•]	Radical de hidrogénio
H ₂ O	Molécula de água
H ₂ O ⁺	Radical da molécula de água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio

HCl	Ácido clorídrico
HO ₂ *	Radical hidroperoxilo
HR	<i>Homologous Recombination</i>
IMC	Índice de massa corporal
IPO	Instituto Português de Oncologia
k	Fator de conversão
KCl	Cloreto de potássio
kg	Quilograma
kV	Quilovolt
LET	<i>Linear energy transfer</i>
mAs	Miliamperes
mGy	miligray
mGy.cm	Miligray-centímetro
mGy.cm ²	Miligray-centímetro quadrado
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mSv	Milisievert
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MRN	MRE11-RAD50-NBS1
N	Newtons
NaCl	Cloreto de sódio
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end-joining</i>
NLS	<i>Nuclear localization signals</i>
nm	Nanómetro
O ₂	Molécula de oxigénio
OER	<i>Oxygen Enhancement Ratio</i>
OH ⁻	Íão hidroxilo
OH*	Radical hidroxilo
PALB2	<i>Partner And Localizer Of BRCA2</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PET	<i>Positron emission tomography</i>
PHA	<i>Phytohaemagglutinin</i>
PKcs	<i>Protein kinase catalytic subunit)</i>
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i>
RBE	<i>Relative Biological Effectiveness</i>
RI	Radiação ionizante

RNA	Ácido ribonucleico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
SHCMO	<i>Síndrome Hereditária do Cancro da Mama e do Ovário</i>
SSB	<i>Single Strand Breaks</i>
Sv	Sievert
TAD	<i>Transcriptional activation domain</i>
TAC	Tomografia axial computadorizada
TC	Tomografia computadorizada
V	Volt
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μg	Microgramas
μL	Microlitro
μM	Micramolar

Lista de Figuras e Tabelas

Lista de figuras

Figura 1: Esquema representativo da proteína BRCA1.....	11
Figura 2: Esquema representativo da proteína BRCA2.....	12
Figura 3: Imagem representativa de uma radiografia.	21
Figura 4: Primeira radiografia pelo físico Wilhelm Roentgen à mão da sua mulher.....	22
Figura 5: Imagem de um aparelho de mamografia.	24
Figura 6: Fotografia que exemplifica como foram colocados os microtubos no fantoma utilizado para a mamografia.	38
Figura 7: Fotografia que exemplifica a posição do fantoma na mesa da tomografia computadorizada alinhado com o centro da gantry.....	39
Figura 8: Exemplificação das camadas criadas quando colocado o sangue periférico por cima do Ficoll-Paque™.	41
Figura 9: Exemplificação da distribuição dos diferentes constituintes da diluição do sangue após a centrifugação.	41
Figura 10: Figura exemplificativa do ensaio de citotoxicidade em microcultura por fluorescência.....	43
Figura 11: Figura exemplificativa do ensaio de micronúcleos em sangue total.	47
Figura 12: Gráfico representativo da distribuição das idades dos indivíduos por grupos.	52
Figura 13: Gráfico representativo da distribuição do IMC dos indivíduos por grupos..	54
Figura 14: Gráfico representativo da distribuição da ingestão de água dos indivíduos por grupos.	55

Figura 15: Gráfico representativo da distribuição da dose cumulativa efetiva dos indivíduos do grupo de não portadores e portadores.....	59
Figura 16: Percentagem de viabilidade celular determinada por fluorescência pelo ensaio FMCA.	61
Figura 17: Níveis de peróxidos intracelulares medidos por fluorescência usando DCFH ₂ -DA.	64
Figura 18: Níveis intracelulares do radical superóxido medidos por fluorescência usando a DHE.	66
Figura 19: Níveis intracelulares da expressão de GSH medidos por fluorescência usando o alaranjado de mercúrio.....	68
Figura 20: Em A uma imagem da condição não irradiada de duas células binucleadas, mas que não apresentam citoplasma bem definido.....	69
Figura 21: As 3 imagens são da coloração realizada 10 h depois do final do procedimento..	71
Figura 22: Na imagem da esquerda verificamos a condição de controlo de um individuo com o citoplasma bem definido.	72

Lista de tabelas

Tabela 1: Síntese do risco de desenvolvimento de cancro na população em geral e em indivíduos portadores de variantes germinativas causais nos genes BRCA1 e BRCA2. ...	5
Tabela 2: Tabela auxiliar para interpretação do coeficiente de correlação.....	48
Tabela 3: Variantes causais identificadas nas famílias dos indivíduos incluídos no estudo.	51
Tabela 4: Distribuição da população do estudo, por grupo, tendo em conta o género.	52
Tabela 5: Distribuição da população do estudo, por grupo, tendo em conta o fenótipo.	56
Tabela 6: Distribuição da população do estudo, por grupo, tendo em conta o conjunto de antecedentes pessoais.....	57
Tabela 7: Comparação entre os 3 protocolos utilizados para otimização do ensaio dos micronúcleos.	70

1. Introdução

1.1 Síndrome Hereditária do Cancro da Mama e do Ovário

Durante o século XIX, percebeu-se que as mulheres de determinadas famílias tinham uma maior probabilidade de desenvolver cancro da mama. O primeiro relato de uma família, com esta predisposição familiar foi atribuído ao médico francês Pierre Paul Broca, ainda no século XIX. Contudo, só em 1971, após Knudson ter proposto o modelo genético “two-hit” para a carcinogénese, é que a estrutura do cancro hereditário e o papel dos genes supressores tumorais foram estabelecidos.(1) O modelo proposto por Knudson demonstra que o cancro é o resultado de mutações acumuladas no material genético de uma célula. Desta forma, foi possível perceber o papel fundamental dos genes supressores tumorais, tais como o *BReast CAncer gene 1 (BRCA1)* e o *BReast CAncer gene 2 (BRCA2)*.(2)

Nos anos 90, os genes *BRCA1* e *BRCA2* foram associados à síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário (SHCMO), permitindo assim aplicar o teste genético preditivo a esta patologia.(1)

A SHCMO é uma síndrome genética autossómica dominante de penetrância incompleta caracterizada por um aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias da mama, dos ovários (inclui cancro nas trompas de Falópio e cancro peritoneal primário), do pâncreas, da próstata e do melanoma primário especialmente abaixo dos 50 anos. Associa-se também a um risco aumentado de desenvolvimento de uma segunda neoplasia mamária e/ou pancreática.(3–6)

Mutações nos genes supressores tumorais condicionam o desenvolvimento de proteínas disfuncionais, incapazes de cumprir a função reparadora do ácido desoxirribonucleico (ADN), ou seja, geram alterações a nível do ciclo celular e também a nível da morte celular, em especial a apoptose. Consequentemente, o material genético torna-se suscetível ao aparecimento de mutações que acarretam um aumento do risco de transformação maligna.(4)

A SHCMO é causada maioritariamente por variantes germinativas causais, patogénicas e provavelmente patogénicas, dos genes *BRCA1* e *BRCA2*.(4)

Em mulheres não portadoras da mutação, o risco de desenvolvimento de cancro da mama, do ovário e das trompas de Falópio, é respetivamente, de 10-15% e de 1-2%. No caso de portadoras da mutação no *BRCA1*, o risco aumenta para aproximadamente 72% para o desenvolvimento de cancro da mama e para 44% para o cancro do ovário e das trompas de Falópio. A mutação no gene *BRCA2* confere um risco de 69% para desenvolvimento de cancro da mama e de 17% para o cancro do ovário e das trompas de Falópio.(5)

Em homens portadores, o risco de vir a desenvolver cancro da mama é de 1,2% relativamente à mutação no gene *BRCA1* e de 6,8% para a mutação no gene *BRCA2*.(5)

Menos frequentemente, esta síndrome pode associar-se a outros tipos de neoplasias malignas, como é o caso do cancro da próstata, do pâncreas e do melanoma, sendo este último principalmente em indivíduos portadores de mutação no gene *BRCA2*, tal como descrito na tabela 1.(5)

Tabela 1: Síntese do risco de desenvolvimento de cancro na população em geral e em indivíduos portadores de variantes germinativas causais nos genes BRCA1 e BRCA2. Tabela adaptada de [Petrucci N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. Adam M, Ardinger H, Pagon R, editors. GeneReviews®. Seattle: Seattle (WA): University of Washington; 2021.]

Tipo de Cancro	População Geral	Portadores de	Portadores de Mutação
		Mutação BRCA1 (%)	BRCA2 (%)
Mama unilateral (mulher)	12%	46-87%	38-84%
Segundo cancro da mama primário (mulher)	2% até aos 5 anos após o diagnóstico do primeiro cancro da mama	21,1% até aos 10 anos após o diagnóstico do primeiro cancro da mama; 83% até aos 70 anos	10,8% até aos 10 anos após o diagnóstico do primeiro cancro da mama; 62% até aos 70 anos.
Mama (homem)	0,1%	1,2%	8,9%
Ovário	1-2%	39-63%	16,5-27%
Próstata	6% até aos 69 anos	8,6% até aos 65 anos	15% até aos 65 anos; 20% ao longo da vida
Pâncreas	0,5%	1-3%	2-7
Melanoma (cutâneo e ocular)	1,6%	Sem dados	Risco elevado

Apesar dos genes *BRCA1* e *BRCA2* serem os principais responsáveis pela SHCMO, apenas 25% dos casos desta patologia são associados a estes genes. A técnica de sequenciamento do exoma permitiu descobrir uma heterogeneidade substancial de loci entre famílias afetadas que não são portadoras de mutação no gene *BRCA1* ou no gene *BRCA2*. Atualmente, já foram identificados mais de 25 genes que estão associados. A maioria dos genes identificados codificam proteínas com ação nas vias de manutenção do genoma, em conjunto com os genes *BRCA1* e *BRCA2*. Destacam-se a ATM (do inglês, *Ataxia-telangiectasia mutated serine/threonine kinase*) e a PALB2 (do inglês, *Partner and Localizer of BRCA2*).⁽¹⁾

As mutações causais nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são a principal causa da elevada penetrância na SHCMO, correspondendo a 25% dos casos diagnosticados da SHCMO. A SHCMO afeta todos os grupos étnicos e raças. Na população geral, estima-se que as mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* tenham uma frequência entre 1/400 e 1/500. Contudo, na subpopulação dos judeus Ashkenazy, a frequência das variantes causais é de 1/40.⁽⁷⁾

1.1.1. Diagnóstico e Prevenção

Deve-se suspeitar a existência de mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2* em indivíduos com uma história pessoal ou familiar de primeiro, segundo ou terceiro grau que possuam uma das seguintes características: cancro da mama diagnosticado antes dos 50 anos (inclusive); cancro do ovário; múltiplos cancros da mama primários numa ou em ambas as mamas; cancro da mama no homem; cancro da mama triplo negativo diagnosticado antes dos 60 anos; combinação de cancro do pâncreas com cancro da mama e/ou do ovário; combinação de cancro da próstata com cancro da mama; cancro da mama diagnosticado em qualquer idade, em indivíduos de ascendência judaica Ashkenazy; dois ou mais familiares de primeiro, segundo ou terceiro grau com cancro da mama, um deles com idade inferior a 50 anos; três ou mais familiares com cancro da mama em qualquer idade, se tiver sido identificada uma variante patogénica dos genes *BRCA1* ou *BRCA2* anteriormente na família. (5,8,9)

Em indivíduos que não cumpram os critérios anteriores, podem utilizar-se modelos matemáticos preditivos. Estes modelos matemáticos permitem estimar a probabilidade de ser portador de uma variante num dos dois genes (*BRCA1* e *BRCA2*) e, mediante um resultado acima de um determinado limiar (normalmente 10%), é realizado o teste genético. Destes modelos destaca-se o modelo BRCAPRO.(9) Este modelo BRCAPRO consiste numa ferramenta de avaliação de risco associada à identificação de mutações patogénicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* utilizando a análise de Mendel. Este *software* incorpora a história pessoal e familiar do doente, incluindo o número de tumores do doente e dos familiares de primeiro, segundo e terceiro graus.(9)

Um indivíduo é diagnosticado com a síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário após a identificação de uma variante patogénica da linha germinativa heterozigótica nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, através de testes genéticos moleculares. O candidato ideal para realizar teste molecular deve ter pelo menos uma das características já acima mencionadas. Só depois, deve ser realizado nos familiares. Se não for possível realizar o teste molecular em indivíduos com antecedentes pessoais de neoplasia, então o teste pode ser realizado num familiar sem antecedentes de cancro. Contudo, é necessário perceber que um resultado negativo, não elimina a possibilidade de haver uma variante patogénica nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* na família.(9)

Os testes genéticos identificam alterações nos cromossomas, nos genes ou nas proteínas e dividem-se em testes moleculares, cromossómicos e bioquímicos.(10)

Os testes genéticos moleculares avaliam apenas um gene ou vários genes (painel) para identificar variações ou mutações responsáveis por doenças genéticas. Os testes cromossómicos avaliam todos os cromossomas ou fragmentos de ADN para verificar a presença de alterações, nomeadamente deleções cromossómicas, responsáveis por patologias genéticas. Os testes genéticos bioquímicos estudam a quantidade de proteínas ou a sua atividade.(10)

Os testes genéticos habitualmente utilizados para a identificação de variantes causais dos genes *BRCA1* e *BRCA2* são testes genéticos moleculares. Este tipo de teste genético inclui testes de genes único, o uso de um painel de genes ou sequenciamento

do genoma.(10) Até agora, a sequenciação de Sanger era o método mais utilizado para diagnóstico. Este método exige uma validação por laboratórios individuais, considerando a variabilidade de métodos de preparação existentes, de químicos utilizados para o sequenciamento, de algoritmos de bioinformática usados no alinhamento, as variantes que se pretendem investigar e a filtragem das variantes disponíveis.(11)

Com a evolução tecnológica, surgiu a tecnologia de *next generation sequencing* (NGS). Esta metodologia permite não só analisar os genes *BRCA1* e *BRCA2*, mas também, outros genes, como o *PALB2*, que conferem um aumento do risco de desenvolvimento da SHCMO.(11) A técnica de NGS é cada vez mais usada nos laboratórios de diagnóstico pelo seu maior rendimento, resposta mais rápida e a possibilidade de expandir o diagnóstico molecular a mutações causais mais raras, isto tudo sem acarretar aumento no custo de análise quando comparado com as metodologias convencionais.(11)

Quando não é identificada qualquer alteração genética no teste do indivíduo em estudo, é importante esclarecer o doente de que o risco de desenvolver um tumor ao longo da sua vida é igual ao da população geral. Pelo contrário, se o resultado do teste for positivo, é importante testar os familiares para essa mutação específica, de forma a proporcionar um acompanhamento adequado.(9)

O diagnóstico atempado em portadores de variantes patogénicas dos genes *BRCA1* e *BRCA2* é fundamental para que se apliquem medidas de vigilância e de profilaxia eficazes. O objetivo final será a prevenção ou, quando não for possível, o diagnóstico precoce das neoplasias malignas.

Os programas de vigilância e de prevenção praticados em indivíduos diagnosticados com SHCMO são adaptados ao tipo de variante identificada. As medidas de prevenção e de vigilância dependem das opções de cada indivíduo. De acordo com as *National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines Version 2.2021* (12), é recomendado que todos os portadores de variantes patogénicas dos genes *BRCA1* e *BRCA2* sejam seguidos na consulta de risco familiar uma a duas vezes por ano.(12) Assim, em mulheres portadoras de mutações *BRCA* saudáveis, o rastreio destas neoplasias difere das

medidas de rastreio do programa de rastreio de cancro da mama e do rastreio do cancro do ovário existente em Portugal para a população geral. De facto, as mulheres portadoras de variantes patogénicas dos genes *BRCA* começam o rastreio mais cedo do que a população em geral, seguindo os seguintes pontos: a partir dos 25 anos ou a partir de uma idade 10 anos inferior àquela em que o familiar mais jovem desenvolveu cancro da mama, aconselha-se a realização de exame clínico anual ou bianual associado a ressonância magnética mamária com contraste anual; entre os 30 a 75 anos de idade está recomendado uma vigilância anual feita em associação com uma mamografia, uma ecografia mamária e uma ressonância magnética mamária com contraste; após os 35 anos de idade, aconselha-se uma vigilância anual ou bianual com ecografia pélvica endovaginal e doseamento do marcador tumoral CA-125; a partir dos 50 anos de idade, é indicado a realização anual de uma ecoendoscopia ao aparelho digestivo superior e uma ressonância magnética abdominal; indivíduos com histórico familiar de melanoma devem realizar uma consulta de dermatologia anual para avaliação cutânea.(12)

Deve oferecer-se às mulheres portadoras de mutação a possibilidade de realizarem cirurgias profiláticas, nomeadamente a mastectomia bilateral e a salpingo-ooforectomia bilateral, cirurgia a ponderar entre os 35-40 anos de idade, sendo esta última a única forma eficaz de prevenir o cancro do ovário.(5,8)

No caso dos homens com SHCMO, a vigilância deve começar por volta dos 35 anos e recomenda-se (5,8): consulta anual de urologia e análise anual do PSA (do inglês, *Prostate Specific Antigen*), principalmente em portadores de mutação do gene *BRCA2*; vigilância clínica mamária anual, associada a autoexame mamário; a partir dos 50 anos de idade é recomendado a vigilância anual feita em associação com uma mamografia, ecografia mamária, ressonância magnética e ecoendoscopia ao aparelho digestivo superior; indivíduos com histórico familiar de melanoma devem realizar uma consulta de dermatologia anual para avaliação cutânea.(5,8)

1.1.2 Genes *BRCA1* e *BRCA2*

Os genes supressores tumorais são essenciais para o normal funcionamento e desenvolvimento do organismo, constituindo a chave da regulação e da inibição do crescimento e proliferação celulares.(4) A partir destes genes são codificadas proteínas específicas com funções variadas na reparação do ADN, indução da apoptose, bloqueio da adesão de células tumorais e prevenção do aparecimento de metástases.(4)

Breast-Cancer gene 1 (BRCA1) e *2 (BRCA2)* são genes supressores tumorais que atuam na reparação do ADN e na regulação da expressão génica.(13) Estes genes codificam proteínas, as proteínas BRCA, que estão envolvidas em diversos processos celulares essenciais como na estabilidade cromossómica protegendo o genoma do dano, participam no ciclo celular e na apoptose e estão relacionadas com fenómenos de fosforilação.(13)

O gene *BRCA1* está localizado na região 21.31 do braço longo do cromossoma 17 (cromossoma 17q21.31). É composto por 24 exões, 22 dos quais codificantes, distribuídos por 100kb de ADN genómico. Encontram-se descritas mais de 200 mutações germinativas associadas à suscetibilidade tumoral do gene *BRCA1*.(13,14)

A proteína BRCA1 é constituída por um terminal amino (N-terminal), uma parte central e um terminal carboxilo (C-terminal), tal como representado na figura 1.(15) O N-terminal contém o domínio *Really Interesting New Gene finger (RING-finger)*, rico em cisteínas, que se associa com a proteína *BRCA1 Associated RING Domain protein 1 (BARD1)* e é essencial para formação do complexo do *BRCA1* com a ubiquitina ligase E3. A região central da proteína BRCA1 contém uma sequência de localização nuclear (NLS) e o local de fosforilação da *Checkpoint kinase 2 (CHK2)*. (3,16) Por fim, o C-terminal é constituído por o domínio *coiled-coil*, que se associa com a PALB2 e o domínio BRCT que medeia a interação com proteínas importantes como *BRCA1-A Complex Subunit ABRAXAS*, *BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1 (BRIP1/FACJ)* e *binding protein 1 interacting protein (CtIP)*. (3,15,16)

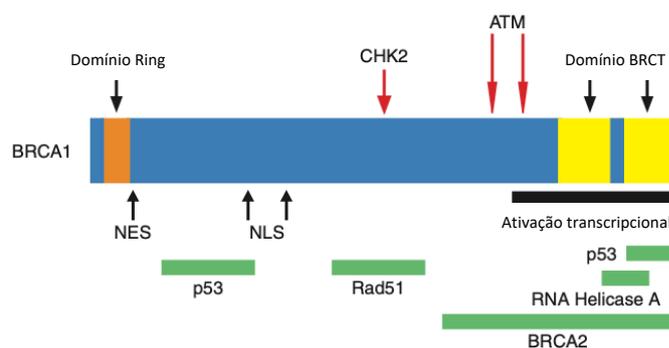


Figura 1: Esquema representativo da proteína BRCA1. Esta contém o domínio RING, NLS e dois domínios BRCT. Encontram-se representadas a verde as proteínas que se vão ligar aos respetivos locais acima da sua localização. As setas vermelhas representam os locais de fosforilação do ATM e da CHK2. [Adaptado de Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science*. 2004 Nov;95(11):866–71.]

O gene *BRCA2* está localizado no braço longo do cromossoma 13 na região 12.3. É composto por 27 exões, dos quais 26 são codificantes e distribuídos por 384 kDa. Estão descritas mais de 1800 mutações associadas a este gene.(13,15,17)

À semelhança da proteína BRCA1, a BRCA2 é constituída por dois terminais, o terminal amino (N-terminal) e o terminal carboxilo (C-terminal), e por uma região central, tal como representado na figura 2. O terminal amino contém o domínio TAD (do inglês, *transcriptional activation domain*) que permite a interação BRCA2-P53. Contém também aminoácidos responsáveis pela ligação da PALB2, permitindo assim, a reparação do ADN através da localização das alterações.(3,16) A parte central da proteína BRCA2 é codificada pelo exão 11 e contém 8 repetições BRC que se ligam à RAD51.(16) No C-terminal está localizado o domínio de ligação ao ADN que possui um domínio helicoidal, um domínio *tower* e três domínios de ligação oligonucléotídicos que facilitam a ligação do BRCA2 aos danos do ADN de cadeia simples e duplos. Este terminal contém também um NLS e um local de fosforilação da *cyclin-depend kinase* (CDK).(3,15,17)

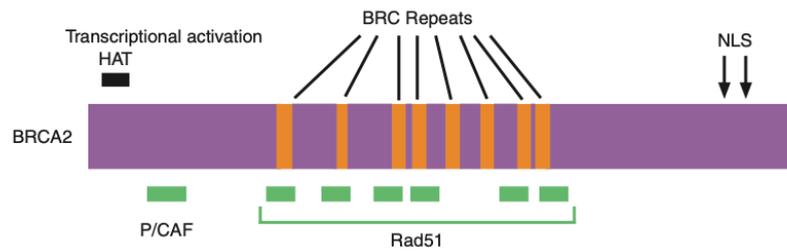


Figura 2: Esquema representativo da proteína BRCA2. Este contém oito repetições BRC (laranja). O Rad51 liga-se a 6 destas repetições (mostrado a verde). [Adaptado de Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science*. 2004 Nov;95(11):866–71.]

Em suma, os *BRCA1* e *BRCA2* codificam proteínas com um papel fundamental na reparação dos danos de ADN, muitos devidos à radiação ionizante, e na regulação do ciclo celular, levando a uma estabilidade genómica e supressão tumoral. Assim, uma perda de função numa destas proteínas leva a um aumento da instabilidade genómica, culminando em muitos casos em cancro.(13)

1.2 Radiação

A radiação, no que diz respeito à quantidade de energia cedida durante a interação com a matéria, pode ser distinguida entre radiação ionizante e não ionizante.(18,19) A radiação ionizante tem a capacidade de remover elétrons de átomos ou moléculas, constituindo iões, ao contrário da radiação não ionizante que não tem a capacidade de gerar iões.(18,19)

A radiação pode ser na forma de partículas ou ondas. A radiação sobre a forma de ondas é chamada de radiação eletromagnética que, por sua vez, também se pode dividir em radiação ionizante e não ionizante. A radiação não ionizante é constituída por comprimentos de onda maior que 10^{-7} m, tem energia menor que 12 eV e inclui as ondas rádio, as micro-ondas, a luz infravermelha, a luz visível e a luz ultravioleta. A radiação eletromagnética ionizante é constituída por raios-X e por raios- γ . A radiação ionizante particulada é constituída por partículas alfa (α), partículas beta (β), prótons, iões pesados, entre outros.(18,19)

1.2.1 Efeitos biológicos da Radiação Ionizante

Ao atravessar o meio, a radiação ionizante cede energia ao longo do seu percurso, podendo causar dano biológico nos tecidos que atravessa. Quando uma célula é irradiada, podem ocorrer três situações: diminuição da velocidade de divisão celular, morte interfásica ou morte celular. Se a irradiação é feita com doses baixas, ocorre a diminuição da velocidade de divisão, mas os motivos que condicionam esta diminuição são ainda desconhecidos. A morte interfásica, que traduz a morte da célula antes de entrar em mitose, depende das células que são irradiadas. As células com elevada capacidade mitótica entram em morte interfásica com doses mais baixas do que as células com menor capacidade mitótica. Por fim, a morte celular no contexto de radiobiologia é geralmente equiparada a qualquer processo que leva à perda da capacidade clonogénica. Este é um critério bastante amplo para morte celular e não se

aplica a todas as células. No caso das células nervosas e musculares, que são células que não se dividem, a morte celular pode ser considerada a destruição da célula.(20)

De facto, quando a radiação ionizante atravessa a matéria, vai perdendo energia gradualmente devido à interação durante o seu percurso. Para um determinado meio, a taxa de perda de energia depende não só da energia e do tipo de radiação, mas também da densidade, número de átomos por unidade de volume, do material irradiado. Assim, a transferência linear de energia, LET (do inglês, *Linear Energy Transfer*), é definida como a energia transferida por unidade de comprimento de percurso. A LET aumenta à medida que a radiação vai percorrendo o seu caminho, de tal forma, que existe um pico de deposição no fim do seu percurso, o pico de Bragg.(18,19,21) A transferência linear de energia é um dos importantes fatores que influencia o efeito biológico da radiação. Na verdade, quanto maior LET, maior será o efeito biológico. As partículas carregadas, de uma forma geral, têm uma maior LET que os raios-X e os raios- γ .(19)

Além da transferência linear de energia, existem outros dois fatores que afetam a resposta celular à radiação ionizante. São eles a eficiência biológica relativa, RBE (do inglês, *Relative Biological Effectiveness*), e a relação do enriquecimento em oxigénio, OER (do inglês, *Oxygen Enhancement Ratio*).(21) De facto, o efeito relativo da LET é descrito pela eficiência biológica relativa, sob a forma de comparação com uma dose de raios-X de 250 keV que produz a mesma resposta biológica.(19,21) A OER traduz a razão entre a dose de radiação que produz uma dada resposta sem a presença de oxigénio e a dose de radiação que produz o mesmo efeito na presença de oxigénio. Efetivamente, os efeitos biológicos da radiação são maiores quando estamos numa situação aeróbica porque nestas condições ocorre muito maior produção de espécies radicalares durante a radiólise da água e posterior recombinação.(18,19,21)

Para além de se dividir em partículas e ondas, a radiação ionizante provoca efeitos biológicos que se podem classificar consoante a sua ação em direta ou indireta.(19) Os efeitos diretos são provocados por radiação com energia cinética suficiente para destruírem a estrutura atómica do meio por onde passam, provocando danos químicos

e biológicos às moléculas.(19) Por exemplo, uma partícula alfa pode induzir diretamente quebras de uma molécula de ADN. Geralmente, a ação direta é proveniente predominantemente de radiação de elevada LET. Este tipo de ação está associada a efeitos sem limiar de dose (estocásticos), podendo, se em células da linha germinativa, gerar efeitos genéticos que podem ser transmitidos a gerações futuras.(22)

Em oposição, os efeitos indiretos da radiação ionizante são sobretudo causados pela radiação ionizante eletromagnética (raios-X e raios- γ), ou seja, radiação de baixa LET. Este tipo de efeitos não produz danos químicos ou biológicos por si só, mas origina espécies radicalares no meio no qual é absorvida.(18,19) São estas espécies radicalares que se vão difundir e causar dano celular.(22)

Quando a radiação ioniza um átomo, forma-se um ião que pode simplesmente recombinar-se ou podem reagir quimicamente e danificar moléculas das células.

Por outro lado, os danos da radiação podem levar à formação de radicais livres que podem levar a reações químicas prejudiciais. Um radical livre é um átomo ou molécula que tem um eletrão orbital desemparelhado na camada de valência. Este tipo de partículas tem uma elevada reatividade química que conduz a uma elevada interação com biomoléculas e, conseqüentemente, possibilidade de danificá-las. A ação indireta acontece através do efeito do oxigénio ou de processos de radiólise da água.(22)

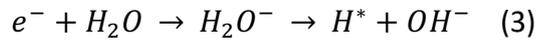
De facto, quando a radiação interage com uma molécula de água, esta é ionizada formando numa primeira instância uma molécula com carga positiva (H_2O^+) e um eletrão livre (e^-) (1):



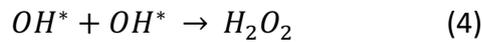
A molécula de água carregada positivamente, por ser muito instável, sofre a reação em baixo descrita (2):



Já o eletrão livre interage com outra molécula de água e origina o radical livre de hidrogénio (H^*) e ião hidróxido (3):



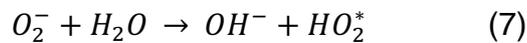
Assim, no final, cada molécula de água produz um par de iões (H^+ e OH^-) e dois radicais livres (OH^* e H^*). Estes radicais livres, por terem um tempo de vida muito curto ($10^{-10}s$), interagem entre si dando origem ao peróxido de hidrogénio (4) e a moléculas de hidrogénio (5):



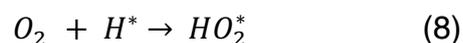
Por outro lado, a radiação pode interagir de uma forma indireta com as moléculas de oxigénio (O_2). Após a formação do eletrão livre da radiólise da água, este pode interagir com as moléculas de oxigénio formando o anião superóxido (6):



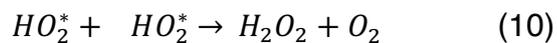
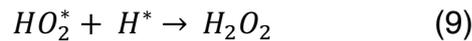
O anião superóxido, de seguida, pode reagir com uma molécula de água, dando origem ao ião hidroxilo e ao radical livre hidroperóxido (7)



Por outro lado, a molécula de oxigénio pode interagir com o radical livre de hidrogénio (H^*) formado na radiólise da água, originando novamente o radical livre hidroperóxido (8):



Este radical livre formado na reação anterior pode ainda reagir com o radical livre de hidrogénio, formando peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (9) ou reagir com outro radical livre de hidroperóxido (HO_2^*), dando origem a mais peróxido de hidrogénio e oxigénio. (10)



O peróxido de hidrogénio e o radical livre hidroxilo são responsáveis por aproximadamente dois terços de todas as lesões por radiação derivadas da radiólise da água. Os radicais livres são capazes de inativar mecanismos celulares e provocar alterações nos mecanismos genéticos das células consequência de lesões no ADN, nas proteínas e ou nos lípidos.(23)

1.2.2 A radiação ionizante e o ADN

Apesar de a radiação poder danificar a membrana celular, os organelos e outros constituintes da célula, é o dano no ADN nuclear, parte mais radiosensível da célula, que pode condicionar a divisão celular, originando mutações e cancro. São vários os efeitos induzidos pela radiação na molécula do ADN, como as alterações nas ligações entre as bases (substituição, adição ou remoção de bases), substituição cruzada, *single strand breaks* (SSB) e *double strand breaks* (DSB).(18,19,23)

As alterações de ligações entre as bases numa única ou em ambas as cadeias mudam a sequência e assim afetam o armazenamento e a transmissão da informação do genoma.(19) As SSB são quebras que envolvem apenas uma cadeia da molécula de ADN, sendo produzidos essencialmente por radiação de baixa LET. Os danos de cadeia simples são relativamente fáceis de reparar porque as componentes unitárias do ADN são

complementares e servem como molde para a reparação.(23) As DSB ocorrem habitualmente por radiação de elevada LET e são quebras em ambas as cadeias numa localização igual ou muito próxima. Estas alterações induzem a perda do modelo orientador da reparação e, conseqüentemente, resulta numa reparação errónia. A maior parte dos DSB são letais porque no ciclo celular os fragmentos gerados são detetados nos *checkpoints* da replicação celular, não permitindo que a célula progrida no ciclo celular. São o tipo de lesão de ADN mais perigoso porque pode condicionar a perda de uma grande região cromossómica.(19,24,25)

Estes efeitos podem levar a uma inibição temporária ou permanente de síntese de ADN, síntese de ADN incorreto com conseqüente síntese de proteínas incorretas e inibição ou prevenção da mitose. (23)

Assim, é importante perceber a diferença entre dano no ADN e mutação. No passado, estes termos eram usados como sinónimos. Hoje em dia, é possível perceber a diferença.(23) O dano no ADN é uma aberração na sequência do ADN, como por exemplo, os efeitos acima descritos. O dano no ADN é reconhecido pelas enzimas de reparação que estão constantemente a monitorizar a integridade do ADN durante o processo de replicação. A maior parte dos danos reconhecidos são reparados. No entanto, quando um determinado dano não é reconhecido ou não é reparado corretamente, resulta na morte celular ou em mutação.(23)

Mutação define uma mudança na sequência do ADN não reconhecida pelas enzimas de reparação. Desta forma, ao não ser reparada, a mutação pode ser replicada. As células mutadas podem aparentar ter a capacidade reprodutiva normal, mas têm informações alteradas noutras partes do genoma. As mutações do ADN em células com elevada capacidade proliferativa são mais prováveis de originar cancro.(23)

1.2.2.1 Reparação das lesões do ADN

A célula responde ao dano do ADN através de uma resposta das vias DDR (do inglês, *DNA damage response*) que permite que as vias de reparação removam o dano numa forma dependente do substrato. (26)

Destacam-se cinco vias de reparação do ADN: a reparação por excisão de base (BER, do inglês, *base excision repair*), reparação por excisão de nucleótidos (NER do inglês, *nucleotide excision repair*), *mismatch repair* (MMR), recombinação homóloga (HR, do inglês, *homologous recombination*), e a união da extremidade não homóloga (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*). Estas vias são ativadas em diferentes fases do ciclo celular permitindo que a célula repare o ADN. (26)

A via de BER encontra-se ativa maioritariamente na fase G1 do ciclo celular e é utilizada para corrigir danos de oxidação, desaminação, alquilação, e *abasic single base*, que não são percebidos como alterações significativas da hélice do ADN.(26)

A NER é a via usada para remover lesões extensas originadas geralmente pela radiação ultravioleta e para corrigir bases que distorcem a dupla hélice do ADN. Neste tipo de reparação, os nucleotídeos danificados são removidos. (26)

A MMR é a via utilizada para substituir bases mal emparelhadas e é realizada logo após a formação do novo ADN. Além disso, este tipo de reparação é utilizado para detetar e corrigir inserções e deleções provocadas pelas polimerases que perdem o seu local de inserção na cadeia que serve de molde.(26)

A HR é essencial para aceder a informação genética que existe nas cromátides irmãs ou nos cromossomas homólogos quando ambas as cadeias do ADN estão comprometidas. A HR tem um papel fundamental na reparação das DSB e atua nas fases S e G2 do ciclo celular uma vez que nestas fases existe maior número de cromátides irmãs.(24,27)

A HR inicia-se com a ligação do complexo MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) às extremidades do ADN danificado, que também ativa a proteína ATM. A proteína ATM,

por sua vez, ativa e fosforila a proteína BRCA1 que é responsável por regular o complexo MRN. A endonuclease MRE11 corta a fita da DSB, que possui um terminal 5', até 300 nucleótidos. Para que a remoção das DSBs seja eficiente, é necessária a interação da proteína MRE11 com a proteína *CtBP-interacting*. (24,25,27)

Também a NHEJ é utilizada para a reparação das DSB e atua majoritariamente na fase G1 do ciclo celular. A maioria das DSB têm as extremidades do ADN incompatíveis devido a modificações químicas ou saliências incompatíveis. Na NHEJ, essas pequenas regiões na extremidade 5' ou na extremidade 3' são degradadas. Por sua vez, as exonucleases e das endonucleases geram pequenas regiões de microhomologia (menos de 4 nucleótidos) entre as cadeias.(24,25) A NHEJ baseia-se na ação do complexo ADN-PKcs/Ku. A via de reparação NHEJ começa com a ligação do heteródimo Ku70-Ku80 às extremidades dos DSB, que recruta as restantes proteínas que interagem na NHEJ. Entre estas, estão incluídas a DNA-PKcs (do inglês, *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*), a DNA ligase IV e as proteínas XRCC4 e XLF (do inglês *XRCC4-like factor*). (25)

Comparativamente com a HR, a NHEJ não é tão eficiente na reparação dos DSB porque utiliza poucos ou nenhuns cromossomas homólogos ou cromátides irmãs para a reparação. (27)

1.2.3 Aplicações da radiação ionizante

A radiação ionizante veio proporcionar um avanço na medicina, permitindo o desenvolvimento de várias aplicações nas áreas de diagnóstico e terapêutica. Praticamente todos os procedimentos de imagem médica surgem de um dos seis principais procedimentos de diagnóstico radiológico: planar, fluoroscopia, mamografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética ou ecografia. A radiografia convencional, fluoroscopia, tomografia computadorizada e mamografia utilizam raios-X, a ressonância magnética usa ondas de rádio e a ecografia utiliza ondas sonoras de elevada frequência. (28)

De facto, os métodos atualmente mais utilizados no diagnóstico continuam a ser os métodos de radiologia, que incluem métodos que usam radiação ionizante e métodos

que não usam radiação ionizante, como é o caso da ecografia e da ressonância magnética. (28)

A radiografia planar foi a primeira tecnologia de imagem médica. O físico Wilhelm Roentgen descobriu os raios-X em 1895, o que possibilitou o surgimento da radiografia convencional. Roentgen foi também responsável pela primeira radiografia do corpo humano (figura 4). (21)

A radiografia necessita de uma fonte de raios-X de um dos lados do doente e com o detetor do lado oposto (figura 3). Um pulso de pequena duração (tipicamente meio segundo) é emitido por um tubo de raios-X, do qual uma grande fração interage no doente (cerca de 98%) e apenas uma pequena parte atinge o detetor onde a imagem radiográfica é formada (menos de 2%). (21,28) Essa porção absorvida pelo doente é responsável pela produção de efeitos biológicos no seu organismo. Assim, a dose para um doente depende de vários fatores, como por exemplo, da distância da fonte ao doente, do tipo de procedimento, a massa do doente, do tamanho do feixe de raios-X, entre outros. (28)

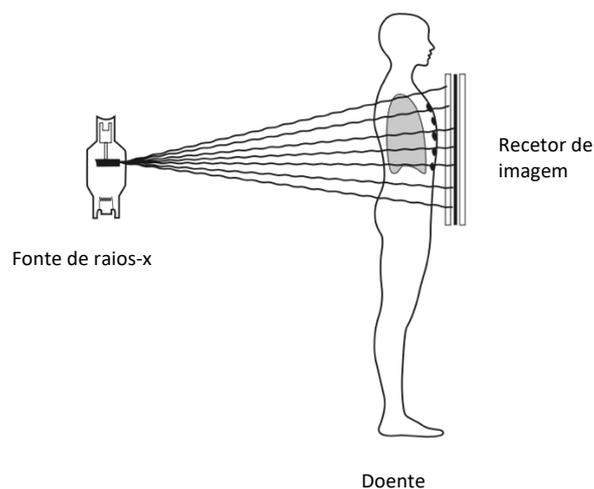


Figura 3: Imagem representativa de uma radiografia. Adaptado de [Kelsey CA, Heintz PH, Sandoval DJ, Chambers GD, Adolphi NL, Paffett KS, editors. *Radiation Biology of Diagnostic Imaging*. In: *Radiation Biology of Medical Imaging*. First Edit. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2014. p. 213–8.]

A imagem radiográfica (figura 4) é obtida consoante o grau de atenuação que o feixe de raios-X é sujeito. De facto, as propriedades de atenuação dos diferentes tecidos do corpo humano como, por exemplo, o osso, os tecidos moles e o ar, são bastante distintos. O detetor utilizado em radiografia pode ser um filme fotográfico ou detetor eletrónico.(28)



Figura 4: Primeira radiografia pelo físico Wilhelm Roentgen à mão da sua mulher. Retirado de [Forshier S. Radiobiology History. In: Forshier S, editor. Essentials of Radiation Biology and Protection. Second Edi. New York: Delmar; 2009. p. 3–9.]

1.2.3.1 Tomografia Computorizada

A tomografia computadorizada (TC) tornou-se clinicamente disponível em 1970 e foi a primeira tecnologia de imagem médica a ser realizada através de um computador. As imagens de TC são produzidas pela passagem de raios-X à medida que a fonte de radiação gira em torno do corpo. Utiliza-se um conjunto de detetores, oposto à fonte de raios-X, que recebe os dados da projeção da transmissão.(28)

As vantagens da TC em relação à radiografia convencional é a possibilidade de realizar cortes tridimensionais da região de interesse, eliminando a sobreposição de estruturas anatómicas e apresentando assim uma visão desobstruída da anatomia detalhada.(28)

O facto de ser um exame complementar de diagnóstico facilmente acessível nas instituições de saúde, associado a uma aquisição rápida e com elevada qualidade da imagem, tornaram a TC num dos exames auxiliares de diagnóstico mais frequentes.(28)

1.2.3.2 Mamografia e Rastreamento do cancro da mama em Portugal

A mamografia é um dos exames mais realizados em mulheres, sendo um método auxiliar de diagnóstico essencial no cancro da mama (figura 5). (28)

A mama é composta principalmente por tecidos moles com uma estrutura relativamente uniforme. A mamografia deteta depósitos de cálcio, quistos e neoplasias que tenham uma densidade semelhante à do tecido mamário normal.(28)

Durante a mamografia, a mama é comprimida de forma a criar uma camada mais fina e mais uniforme. Desta forma, a radiação necessária é de baixa energia porque não é necessário ter uma capacidade elevada de penetrância dos tecidos.(28)

Como a mamografia utiliza uma dose muito menor de radiação do que a radiografia convencional, a fonte e os detetores de raios-X têm de ser desenhados especificamente para obter a imagem da mama.(21) A imagem obtida numa mamografia convencional é uma imagem em 2D, o que provoca, muitas vezes, uma difícil visualização de algumas estruturas devido a sobreposição de tecidos que cria sinais desordenados. Atualmente, já existem alguns sistemas de mamografia capazes de realizar uma tomossíntese (imagem mamográfica obtida em 3D), onde a fonte de raios-X se movimenta num arco de 7 a 40 graus à volta da mama. Este método tomográfico tem um ângulo limitado que leva à reconstrução das imagens de tomossíntese. Estas imagens são obtidas num plano paralelo ao plano do detetor e podem reduzir a sobreposição de imagens acima e abaixo do plano em foco.(21)



Figura 5: Imagem de um aparelho de mamografia. Retirado de [Kelsey CA, Heintz PH, Sandoval DJ, Chambers GD, Adolphi NL, Paffett KS, editors. Radiation Biology of Diagnostic Imaging. In: Radiation Biology of Medical Imaging. First Edit. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2014. p. 213–8.]

O exame com mamografia faz parte dos programas de rastreio do cancro da mama. Em Portugal, dos 50 aos 69 anos está recomendado que a mulher faça uma mamografia de dois em dois anos. Todavia, consoante a sua história familiar, pode estar recomendado a realização de mamografias antes dos 50 ou depois dos 69 anos.(29)

Como foi referido anteriormente, no caso da Síndrome Hereditária do Cancro da Mama e do Ovário é recomendado que as mulheres comecem a realizar mamografias a partir dos 25 anos. (8)

1.3 Impacto da radiação ionizante em pessoas portadoras de variantes causais de BRCA1 e BRCA2

O diagnóstico precoce do cancro da mama é uma etapa fundamental na abordagem desta neoplasia. Contudo, é necessário perceber qual a relação entre as doses de radiação dos métodos de diagnóstico e a possível indução do cancro.

Tal como já foi referido anteriormente, a radiação ionizante, seja de forma direta, seja de forma indireta, lesa o ADN. Quando estes danos não são reconhecidos pelas enzimas de reparação, evoluem para mutações que por sua vez podem originar cancro.(20)

Como os genes *BRCA1* e *BRCA2* são genes supressores tumorais que participam na reparação das DSB através da recombinação homóloga, torna-se importante perceber qual é o papel das doses de diagnóstico em indivíduos com a SHCMO. Existe uma diferença na capacidade de reparação de danos em portadores e não portadores de mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Com o objetivo de esclarecer se os indivíduos portadores são mais radiosensíveis, têm sido realizados diversos estudos ao longo dos anos.(30)

Os estudos de Narold *et al.* e de Goldfrank *et al.*, analisaram a exposição de portadoras de mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* à mamografia. (31,32) O primeiro grupo estudou 1600 portadoras das variantes causais nos genes *BRCA* que desenvolveram cancro da mama, diagnosticadas entre de Janeiro de 1952 a junho de 2005, e 1600 portadoras saudáveis que foram o grupo de controlo. Este estudo incluiu mulheres de 44 centros de 6 países diferentes da Europa, da América do Norte e de Israel.(31) Os autores avaliaram se as portadoras já tinham realizado alguma mamografia e, em caso afirmativo, o número de mamografias realizadas e a idade do primeiro exame. Os resultados obtidos não mostraram associação entre a realização de mamografias e o risco de vir a desenvolver cancro.(31,33)

No estudo de Goldfrank *et al.*, os autores realizaram um estudo de coorte retrospectivo que incluiu 213 mulheres previamente diagnosticadas com variantes

causais dos genes *BRCA1* e *BRCA2* e que iniciaram o rastreio com mamografia entre os 25 e os 30 anos. Destas, 85 tinham sido diagnosticadas com cancro da mama há, pelo menos, um ano.(32) No início do estudo, as portadoras deram informação sobre o número de mamografias realizadas ao longo da sua vida e, mais especificamente, durante os 12 meses prévios. No caso das que tinham sido diagnosticadas com cancro da mama há menos de um ano, a exposição foi calculada subtraindo ao número total de mamografias a que tinham sido submetidas ao longo da sua vida, o número de mamografias recebidas no ano anterior ao diagnóstico de cancro da mama.(32) Os autores obtiveram um risco relativo de 0,94, não encontrando associação entre o desenvolvimento de cancro e a exposição à dose de mamografia.(32)

Outro estudo de coorte retrospectivo estudou a influência das radiografias torácicas no desenvolvimento de cancro da mama. Foram incluídas 454 portadoras de mutação no gene *BRCA1* e 273 portadoras de mutação no gene *BRCA2* com menos de 50 anos, sendo que 261 tinham história pessoal de cancro da mama. Os autores não encontraram qualquer relação entre a realização de radiografias torácicas e o desenvolvimento de cancro da mama.(35)

Em contraste, com os resultados destes estudos apresentados, o estudo de coorte retrospectivo por Andrieu *et al.* incluiu 1601 portadoras (1187 portadoras de mutação no gene *BRCA1* e 414 portadoras de mutação no gene *BRCA2*) e analisou a relação entre a realização de radiografias torácicas e o risco de vir a desenvolver cancro da mama, excluindo mamografias. Das 1601 mulheres, 853 tinham sido diagnosticadas com cancro da mama. Os autores concluíram que qualquer exposição à dose de radiação X ao tórax, levava a um aumento da probabilidade de vir a desenvolver cancro da mama com HR (do inglês, *Hazard ratio*) de 1,54. Concluíram também que em mulheres que realizaram este exame com menos de 20 anos, o risco de desenvolvimento de cancro da mama primário aumenta ainda mais (HR de 5,21). (36)

O estudo mais detalhado realizado foi o estudo de coorte retrospectivo GENE-RAD-RISK Project de Pijpe *et al.*. Estes autores estudaram 1993 portadoras de variantes causais nos genes *BRCA1* e *BRCA2* com mais de 18 anos, que já tinham sido incluídas em

três grandes estudos – GENEPSO (França), EMBRANCE (Reino Unido) e HEBON (Países Baixos). (37) Os autores observaram uma relação dose-efeito entre qualquer exposição de radiação de um exame de diagnóstico antes dos 30 anos e o risco de desenvolvimento de cancro da mama (HR de 1,90). Concluíram assim que o risco de desenvolvimento de cancro da mama aumenta consoante o aumento da realização de radiografias torácicas, abaixo dos 20 e dos 30 anos, assim como a realização de mamografias antes dos 30 anos. Todavia, não foi encontrada qualquer relação entre a realização de exames de diagnóstico entre os 30 e os 39 anos e o desenvolvimento de cancro da mama.(37)

Um outro grupo estudou amostras de sangue de portadores e não portadores de variantes causais dos genes *BRCA1* e *BRCA2* (amostra de 18 participantes), irradiando as amostras com radiação γ com a dose de 2 Gy e de 4 Gy com origem no cobalto-60. De seguida, foi realizado o ensaio de micronúcleos para avaliar a radiosensibilidade das células do sangue dos vários indivíduos, concluindo que os portadores de variantes causais nos genes *BRCA1* e *BRCA2* eram mais radiosensíveis que os não portadores.(38)

Assim, com o objetivo de continuar a estudar a influência da dose de radiação ionizante, usada nos métodos auxiliares de diagnóstico, e de clarificar o comportamento de indivíduos com a SHCMO quando exposto a essas doses, planificou-se o presente estudo que pretende avaliar e comparar a radiosensibilidade em portadores e não portadores de variantes causais nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

2. Objetivo

Nos últimos anos, tem sido estudada a questão da radiosensibilidade em portadores de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* que codificam para a Síndrome Hereditária do Cancro da Mama e Ovário. Este trabalho surge com o objetivo de contribuir para o esclarecimento acerca do aumento do risco de exposição à radiação ionizante quando estes indivíduos são expostos a exames de diagnóstico com radiação ionizante usados como métodos de rastreio.

Assim, para estratificar o risco pretende-se estudar indivíduos portadores e não portadores de famílias com a SHCMO, através da recolha de amostras de sangue periférico destes indivíduos e avaliar o stresse oxidativo, a viabilidade celular e a genotoxicidade após exposição das amostras a exames imagiológicos com radiação ionizante.

3. Materiais e Métodos

Para esclarecer a influência da realização de exames de diagnóstico com radiação ionizante em portadores de variantes causais dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, que codificam para a SHCMO, realizou-se o presente projeto de investigação.

Este estudo resulta da colaboração entre o Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC) e dois serviços de hospitais do Sistema Nacional de Saúde de Coimbra: o Serviço de Oncologia Médica do Instituto Português de Oncologia (IPO) e o Serviço de Genética Médica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). O projeto foi submetido às comissões de ética das três instituições (FMUC, IPO e CHUC) das quais obteve um parecer favorável (anexos 1, 2 e 3).

3.1 Amostra

Foram incluídas amostras de sangue de portadores e não portadores de variantes causais no gene *BRCA2*. Consideraram-se elegíveis para participar no estudo, todos os indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos, testados para as mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, por pertencerem a famílias portadoras das referidas mutações. Foram excluídos portadores de variantes com significado clínico desconhecido.

Os indivíduos que cumpriram os critérios acima descritos foram recrutados na consulta de Risco Familiar do Serviço de Oncologia Médica do IPO Coimbra e na consulta de Aconselhamento Genético do Serviço de Genética Médica do CHUC. A inclusão dos participantes do IPO de Coimbra passou pela seleção dos indivíduos observados em consulta entre o dia 1 de dezembro de 2020 e 15 de julho de 2021. Os indivíduos do Serviço de Genética Médica do CHUC foram inicialmente selecionados a partir da base de dados do serviço e, após um parecer favorável do indivíduo, foram convocados para consulta presencial para colheita da amostra. Foram recolhidas amostras de um total de 23 indivíduos, 6 dos quais do Serviço de Oncologia Médica do IPO Coimbra e 17 do Serviço de Genética Médica do CHUC. De forma a garantir a anonimato dos indivíduos ao longo do processo, atribuiu-se um número a cada amostra (1 a 23), de acordo com a ordem em que foi realizada a colheita, que foi utilizado para identificar as informações e as amostras colhidas.

Os participantes foram divididos em grupo controlo, constituído pelos indivíduos não portadores com teste genético anteriormente realizado pertencentes a famílias portadoras de mutações no gene *BRCA2*, e em grupo de portadores, onde foram integrados os portadores de mutação no gene *BRCA2*.

3.1.1 Caracterização da amostra

Foi pedido a todos os indivíduos da amostra a realização de um inquérito (anexo 4) onde foram recolhidos dados sociodemográficos, dados antropométricos (massa e altura, para cálculo do IMC ($\frac{massa}{altura^2}$)), hábitos pessoais (hábitos tabágicos, ingestão diária de água e prática de exercício físico), antecedentes patológicos médicos (oncológicos relacionados com a síndrome, oncológicos não relacionados com a síndrome, cardiovasculares, respiratórios, neuropsiquiátricos e outros, onde se incluem a anemia, a doença de Behçet, a hepatite e o glaucoma) e antecedentes patológicos cirúrgicos.

A dose efetiva cumulativa para cada doente foi calculada através de uma soma da dose correspondente a cada exame com radiação ionizante realizado e, nos doentes com história prévia de doença oncológica, foi também adicionada a dose de radioterapia a que o doente terá sido submetido. (38)

Consideraram-se os valores de Dose Datamed II (40) como os valores de referência dos exames de radiologia em Portugal. Usou-se o coeficiente de conversão do mesmo documento, que foi multiplicado pelo valor máximo ou de referência apresentado nas recomendações da Associação Europeia de Medicina Nuclear correspondente ao estudo em questão. Atendendo à ausência de informação relativa à TC no estudo de Teles *et al.*(40), os valores da dose efetiva foram calculados pela multiplicação do valor de *Dose-Length Product* (DLP) relatados para Portugal existente no estudo de Santos *et al.*(41) pelos coeficientes k. Por fim, nos exames com radiação ionizante, para os quais não existiam dados portugueses, utilizou-se a estimativa de dose internacional.

3.1.2 Colheita da Amostra Sanguínea

Cada doente foi submetido a punção venosa periférica na flexura cubital, para colheita de uma amostra de cerca de 20 mL de sangue periférico, realizada nos serviços de Patologia Clínica do IPO Coimbra e no Serviço de Consultas Externas do Hospital Pediátrico de Coimbra do CHUC. A amostra de cada doente foi distribuída por 3 tubos de colheita: um tubo com heparina (Heparin Tubes, BD Vacutainer®, United Kingdom) e dois tubos com ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA, do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*) (K₂EDTA tubes, BD Vacutainer®, United Kingdom).

3.2 Irradiação

Após a colheita, todas as amostras foram divididas em grupo de portadores e grupo de não portadores. O sangue foi transferido para sete microtubos, previamente identificados com o código de identificação do doente, com o tipo de anticoagulante presente no tubo de colheita e com a condição a que se incluía, controlo (não sujeitos a irradiação) ou irradiado (sujeitos a irradiação), tendo sido colocado em todos eles o mesmo volume de sangue periférico (2,2 mL). Todos os microtubos foram sujeitos às mesmas condições de irradiação.

A irradiação foi realizada no serviço de Imagiologia do Hospital da Luz de Coimbra com o auxílio de dois fantasmas. As amostras foram submetidas à dose correspondente a uma mamografia de duas incidências (amostra 1 a 18) e à dose correspondente a uma TC lombar (amostra 19 a 23).

3.2.1 Mamografia

A exposição correspondente à mamografia foi realizada recorrendo ao mamógrafo da Siemens Healthineers, o MAMMOMAT Revelation, com o auxílio de um fantoma antropomórfico, o *tissue equivalente phantom for mammography, model 011A (CIRS, Virginia, USA)* para simular a mama dos participantes. Os microtubos foram

posicionados nas laterais exteriores do fantoma, como mostra a figura 6 e a sua posição foi marcada para ser reproduzível para os restantes microtubos.

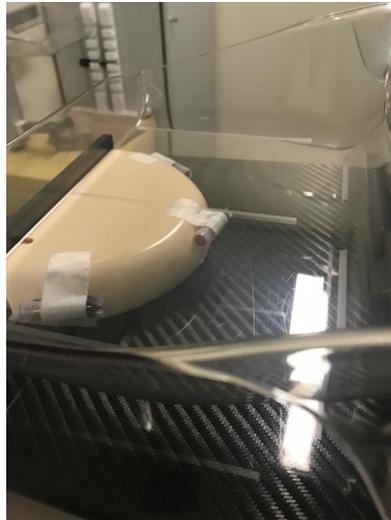


Figura 6: Fotografia que exemplifica como foram colocados os microtubos no fantoma utilizado para a mamografia.

As aquisições foram feitas para o posicionamento craniocaudal (CC), tendo-se submetido as amostras (1 a 18) a duas incidências neste posicionamento. Os parâmetros de exposição aplicados foram seleccionados considerando uma mama constituída por 50% de tecido glandular e 50% de tecido adiposo, com a pá de compressão adjacente ao fantoma com uma força de 39 N e controlo automático de exposição ativo no modo *standard*.

Os parâmetros de exposição utilizados foram uma tensão da ampola de 28 kV e produto corrente-tensão de 67,7 mAs, com uma dose à entrada na pele de 2,5 mGy e a dose glandular média (D_G) por aquisição de 0,79 mGy. Portanto, utilizando 0,12 como fator de ponderação tecidual da mama (w_T) (39), obtém-se uma dose efetiva 0,19 mSv com as 2 incidências.

3.2.2 Tomografia Computorizada

As amostras 19 a 23 foram submetidas a TC lombar. Para simular a exposição à TC, usou-se *Computed Tomography Dose Index (CTDI) body phantom* de polimetilmetacrilato (PMMA), um fantoma de controlo de qualidade de TC. Este fantoma possui cinco orifícios que permitiram a colocação dos microtubos no seu interior para serem irradiados. Para simular a TC 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, como podemos visualizar na figura 7.

Antes das irradiações, realizou-se um topograma usando uma tensão da ampola de 120 kV e uma corrente de 35 mA. No caso da TC lombar utilizou-se uma tensão da ampola 140 kV e corrente 689 mAs, pitch de 0,8 mm e dimensão de *array* de 203 mm. A $CTDI_{vol}$ foi então de 67,67 mGy e a DLP de 1215,5 mGy.cm. Utilizando 0,015 com fator de conversão (k) (42), obtém-se uma dose efetiva de TC lombar de 18,23 mSv.



Figura 7: Fotografia que exemplifica a posição do fantoma na mesa da tomografia computadorizada alinhado com o centro da gantry.

3.3 Cultura Celular

Após a irradiação, as amostras foram transferidas para tubos de cultura de fundo redondo de 15 mL (TubeSpin® Bioreactor 15, TPP, Switzerland).

De seguida, o sangue total foi colocado em meio de cultura celular *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), suplementado com 100 µM de piruvato de sódio (Gibco 11360), 15% ou 20% de soro bovino fetal (Sigma F7524) (20% no ensaio de citotoxicidade em microcultura por fluorescência e 15% no ensaio de micronúcleos) e 1% de antibiótico (Sigma A5955), deixando-se a incubar, até ao início de cada ensaio (2h e 4h no ensaio de ROS, 24h e 72h no ensaio de FMCA e 72h no ensaio de micronúcleos), numa incubadora Binder (Binder, Germany), com uma atmosfera húmida a 37º com 95% de ar e 5% de oxigénio.

3.4 Isolamento das células monucleares de sangue periférico

Para realizar os diversos ensaios necessário para este trabalho, isolaram-se as células monucleares do sangue periférico (PBMC). Este procedimento foi realizado usando os diferentes gradientes de densidade de Ficoll através da centrifugação do sangue periférico em Ficoll-Paque™ (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

Numa primeira fase, adicionou-se num Falcon® um volume de Ficoll-Paque™ aproximadamente igual ao volume de diluição do sangue que se pretendia isolar. Posteriormente, colocou-se cuidadosamente o sangue periférico diluído por cima do Ficoll Paque™, criando duas camadas distintas, como está representado na figura 8.

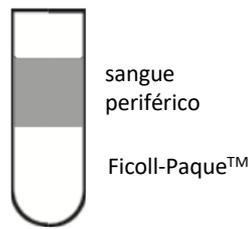


Figura 8: Exemplificação das camadas criadas quando colocado o sangue periférico por cima do Ficoll-Paque™. Adaptado de GE Healthcare. Ficoll-Paque PLUS: Instructions 71-7167-00 AG, Uppsala, Sweden.

De seguida, centrifugou-se a mistura a 800 xG durante 30 minutos a 20°C, temperatura ótima para atuação do Ficoll-Paque™, com redução da velocidade gradual no período final da centrifugação para evitar a destruição do anel das PBMC. A figura 9 representa a distribuição dos diferentes constituintes da diluição do sangue após a centrifugação.

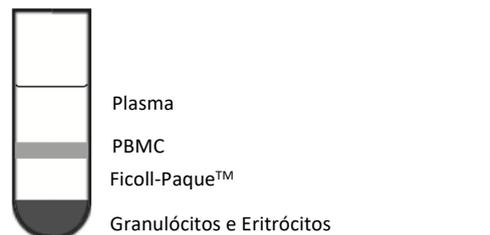


Figura 9: Exemplificação da distribuição dos diferentes constituintes da diluição do sangue após a centrifugação. O plasma, sendo a camada mais leve, fica no topo, imediatamente abaixo localiza-se o anel das PBMC seguido do Ficoll-Paque™ e, por fim, a camada mais pesada constituída pelos granulócitos e eritrócitos. Adaptado de GE Healthcare. Ficoll-Paque PLUS: Instructions 71-7167-00 AG, Uppsala, Sweden.

Seguidamente, com o auxílio de uma micropipeta, o anel das PBMC foi aspirado para um novo Falcon® para ser sujeito a uma lavagem. Para a realização da lavagem, adicionou-se o dobro do volume aspirado de solução salina de tampão fosfato (PBS) às PBMC aspiradas e centrifugou-se novamente durante 10 minutos a 500 xG.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* que corresponde às PBMC foi ressuscitado em 1 mL de PBS, ficando as PBMC prontas para a utilização nos ensaios seguintes.

3.5 Ensaio de microcultura de fluoresceína diacetato

O ensaio de citotoxicidade em microcultura por fluorescência (FMCA) mede a atividade das esterases das células com membrana citoplasmática intacta. Esta atividade é medida pela fluorescência gerada quando a sonda, não fluorescente, diacetato de fluoresceína (FDA, do inglês *fluorescein diacetate*) é hidrolisada. (42,43)

O ensaio de citotoxicidade em microcultura de fluorescência foi realizado 24h e 72h após a irradiação. Em ambos os tempos foi necessário realizar o isolamento das PBMC descrito na secção 3.4, uma vez que, após a irradiação o sangue periférico ficou a incubar com RPMI-1640 suplementado a 20% com FBS até completar as 24h e as 72h.

Foi necessário preparar previamente a sonda FDA através da diluição do FDA da solução stock (Sigma), com uma concentração de 10 mg/mL, em tampão de FDA (NaCl 125, Hepes, água ultrapura, com ajuste de pH a 7,4), numa proporção de 1 µL da solução stock para 1 mL de tampão com proteção da luz. (44)

Depois de realizar o isolamento, a suspensão celular com PBS foi centrifugada durante 5 minutos, a 1500 rpm. No fim da centrifugação, o sobrenadante foi aspirado e o *pellet* foi ressuscitado em 500 µL da sonda FDA.

Posteriormente, incubou-se durante 40 minutos a 37°C numa placa preta de 96 poços, de 100 µL da suspensão celular em triplicado. No final da incubação a fluorescência foi lida num leitor de microplacas (Enspire 2300, Perkin Elmer®) com um filtro de excitação de 485 nm, um filtro de emissão de 520 nm e com uma sensibilidade de 15%. A leitura da placa realizou-se três vezes.

O protocolo está esquematizado na figura 10:

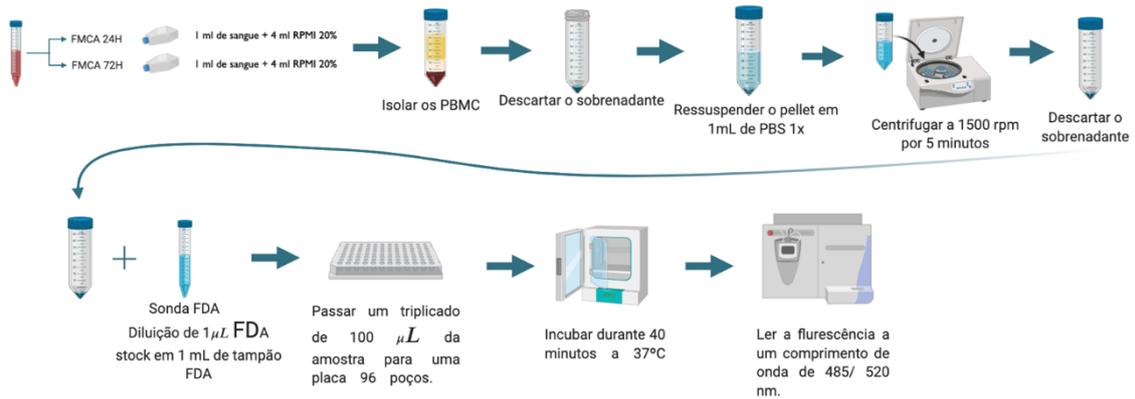


Figura 10: Figura exemplificativa do ensaio de citotoxicidade em microcultura por fluorescência. Figura criada com recurso ao Biorender.

3.6 Análise do stresse oxidativo

As espécies reativas de oxigénio (ROS) estão envolvidas em diversas funções biológicas essenciais para a vida. Contudo, quando o organismo recebe um estímulo externo como, por exemplo, a radiação ionizante que estimula a produção exacerbada de ROS, pode levar ao stresse oxidativo e, conseqüentemente, ao dano celular. O stresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes. (45)

As sondas de fluorescência são excelentes sensores de ROS devido à sua elevada sensibilidade, simplicidade na aquisição de dados e elevada resolução espacial. (45)

Neste projeto a avaliação do stresse oxidativo foi realizado 2h e 4h após a irradiação. Foram utilizadas duas sondas de fluorescência: uma para determinar os níveis de peróxidos intracelulares e outra para determinar os níveis do radical superóxido. Em algumas amostras, foi ainda utilizado uma sonda de fluorescência para avaliar as defesas antioxidantes.

3.6.1 Avaliação da produção de peróxidos intracelulares

A 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) na forma de diacetato pode ser utilizada em estudos celulares devido à sua capacidade de se difundir desde a membrana celular até ao citoplasma, onde é hidrolisada por esterases. (45)

A oxidação do 2,7-diclorodihidrofluoresceína na presença de peróxidos intracelulares origina um composto fluorescente, o 2,7-diclorofluoresceína (DCF). A intensidade da fluorescência é proporcional à concentração de peróxido de hidrogénio intracelular. (45,46)

O protocolo da sonda DCF iniciou-se com a preparação da diluição do sangue total em PBS, na proporção 1:20 (sangue total: PBS). De seguida, incubaram-se durante 45 minutos a 37°C protegido da luz, 800 µL do sangue diluído com 2 µL de DCFH₂-DA (Invitrogen) com uma concentração final de 125 µM Posteriormente, passou-se em triplicado 200 µL por poço da diluição para uma placa preta de 96 poços. No final, a fluorescência foi lida num leitor de microplacas (Enspire 2300, Perkin Elmer®) com um filtro de comprimento de onda de 485 nm com deteção dos picos de emissão no comprimento de onda de 528 nm.

3.6.2 Avaliação da produção do radical superóxido

O dihidroxiétilo (DHE) foi usado como uma sonda de fluorescência para detetar o radical superóxido. Quando a sonda é hidrolisada pelo superóxido, origina o composto fluorescente etídeo que é capaz de se misturar com o ADN, aumentando a fluorescência.(45,46)

O protocolo da sonda DHE iniciou-se com a preparação da diluição do sangue total em PBS, na proporção 1:20 (sangue total: PBS). De seguida, incubaram-se durante 15 minutos a 37°C protegido da luz, 800 µL do sangue diluído com 10 µL de DHE (Sigma) com uma concentração final de 12,5 µM. Posteriormente, passou-se, em triplicado, 200 µL por poço da diluição para uma placa preta de 96 poços. No final, a fluorescência foi

lida num leitor de microplacas (Enspire 2300, Perkin Elmer®) com um filtro com comprimento de onda de 530nm com detecção dos picos de emissão no comprimento de onda de 645nm. (46)

3.6.3 Avaliação da produção da glutathiona reduzida

O alaranjado de mercúrio foi usado como sonda de fluorescência para detetar a defesa antioxidante, glutathiona reduzida (GSH).

O protocolo da avaliação da produção de GSH inicia-se com a preparação da diluição do sangue total em PBS, na proporção 1:20 (sangue total: PBS). De seguida, incubou-se, durante 15 minutos a 37°C protegido da luz, 800µL do sangue diluído com 2µL de alaranjado de mercúrio (Sigma) com uma concentração final de 125µM. Posteriormente, passou-se em triplicado 200 µL por poço da diluição para uma placa preta de 96 poços. No final, a fluorescência foi lida num leitor de microplacas (Enspire 2300, Perkin Elmer®) com um filtro com comprimento de onda de 485nm com detecção dos picos de emissão no comprimento de onda de 590 nm.

3.7 Ensaio de micronúcleos em sangue total

Os micronúcleos são um dos métodos mais utilizados para avaliar a genotoxicidade. O micronúcleo é uma pequena porção redonda de cromatina com uma coloração aproximadamente igual à do núcleo, visível no citoplasma das células. (47)

Os micronúcleos são causados pelo dano do ADN ou devido à instabilidade genómica. Podem ter origem em fragmentos de cromossomas acêntricos, numa segregação incompleta dos cromossomas, em quebras de cromossomas dicêntricos e na instabilidade genómica. (48)

Existem vários tipos de ensaio de micronúcleos, sendo o ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese o mais utilizado em células humanas. Como os micronúcleos só

são visíveis após a divisão celular, utiliza-se a citocalasina-B para parar a citocinese, inibindo a polimerização dos filamentos de actina e a formação dos microfilamentos contrácteis. (47)

Após a irradiação, foram colocados em cultura celular 0,5 mL de sangue total e 4,5 mL de RPMI-1640 suplementado com 15% com FBS. O protocolo de micronúcleos tem início com a adição da 100 μ L de fitohemaglutinina (Gibco, USA) com uma concentração final de 20 μ g/mL, após a irradiação, deixando-se a incubar 24h a 37°C. A fitohemaglutinina foi utilizada para estimular a mitose das células.

Após 24h, foi adicionada 15 μ L citocalasina-B, com uma concentração final de 6 μ g/mL, para parar citocinese e obtermos células binucleadas. De seguida, colocou-se novamente a incubar até perfazer 72h após a estimulação mitótica.

Após as 72h, a cultura celular foi levada a centrifugar para remover o meio de cultura a 1000 rpm durante 10 minutos. De seguida, descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se, lentamente, 4 mL de cloreto de potássio (KCl) frio, na concentração de 0,075 M, para realizar o tratamento hipotónico, levando-se imediatamente a centrifugar novamente a 1000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e adicionaram-se 4 mL da primeira solução fixadora, uma solução de metanol/ácido acético/NaCl 0,9% na proporção 4:1:5 em volume, levando-se novamente a centrifugar por 10 minutos a 1000 rpm. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* 2 a 3 vezes com a segunda solução de fixação, uma solução de metanol/ácido acético na proporção 3:1 em volume, até o sobrenadante ficar praticamente transparente. Por fim, descartou-se o sobrenadante e colocaram-se, com o auxílio de uma micropipeta, 3 gotas de 10 μ L em lâminas (Normax, Portugal) previamente lavadas com água destilada e metanol, deixando-se a secar durante a noite. Na manhã seguinte, procedeu-se à coloração das lâminas com Giemsa (Merck, Germany) a 4% em PBS durante 15 minutos.

Por fim, foi utilizado o microscópio ótico *Nikon Eclipse 80i*, equipado com *Nikon Digital Camera DXM 1200F*, para proceder à contagem dos micronúcleos.

O protocolo está esquematizado na figura 11:

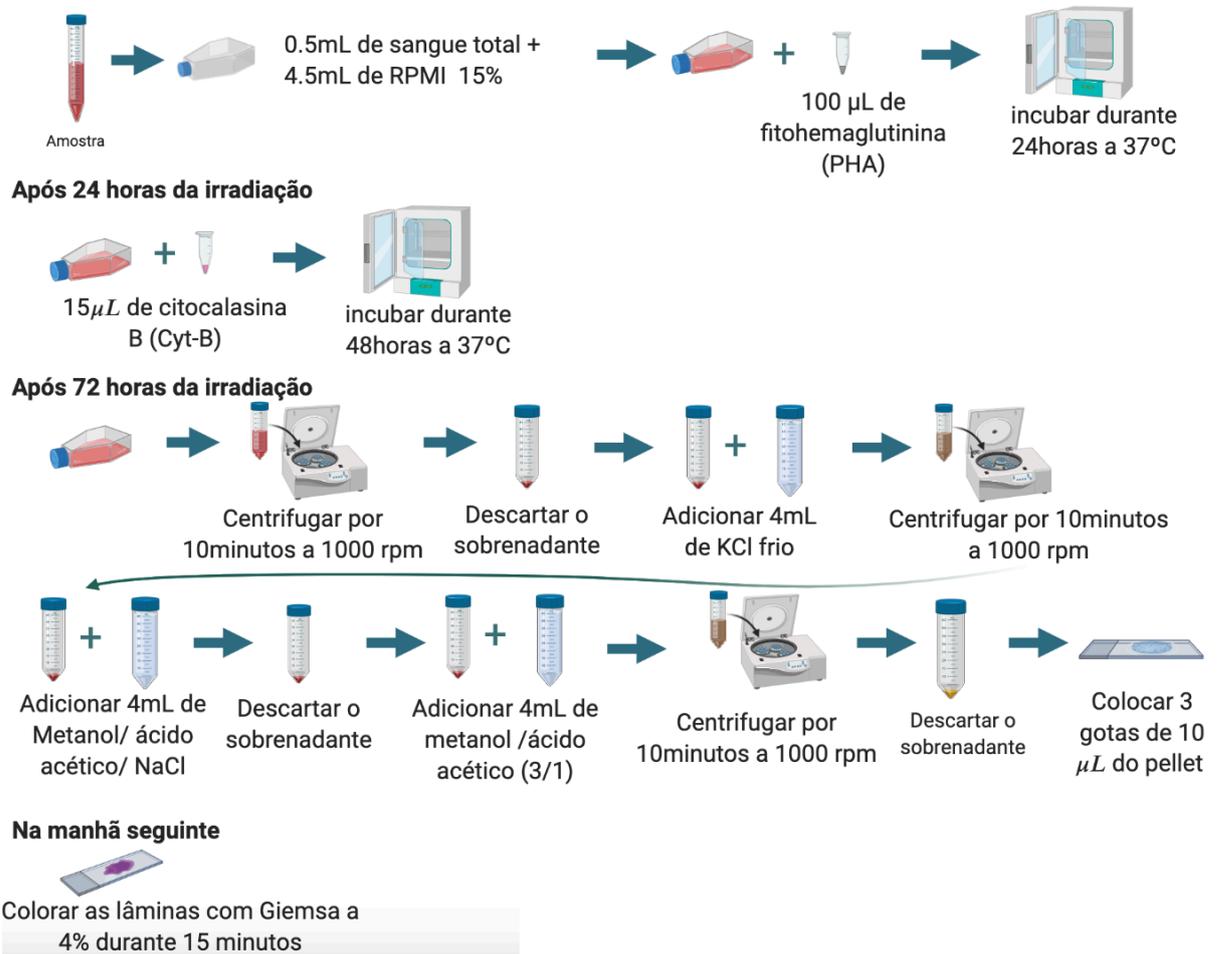


Figura 11: Figura exemplificativa do ensaio de micronúcleos em sangue total. Figura criada com recurso ao programa Biorender.

3.8 Análise Estatística

No presente trabalho foi realizada a análise estatística dos resultados obtidos. Para tal, recorreu-se ao software IBM® SPSS® 27.0 (IBM Corporation, Armonk, Nova Iorque, EUA) e ao software GraphPad Prism® 7.00. Foram consideradas diferenças com significado estatístico quando $p < 0,05$.

Em primeiro lugar, na comparação de variáveis quantitativas foi avaliada a normalidade e a homogeneidade das variâncias usando os testes de *Shapiro-Wilk* e o teste de *Levene*, respetivamente. Para condições com $n < 10$ ou ausência de normalidade foram utilizados testes t não paramétricos. Em casos, em que se pretendia fazer a comparação de valores emparelhados como, por exemplo, comparação entre os dois tempos nos ROS (2h e 4h) para a mesma condição (controlo e irradiado), utilizamos o teste de *Wilcoxon*. Para comparar duas amostras independentes como, por exemplo, a comparação entre o grupo de portadores e não portadores, utilizamos o teste Mann-Whitney. Para condições com $n > 10$ e que seguem uma distribuição normal, foram utilizados testes t paramétricos (teste t student) para comparar entre amostras independentes. Para comparações múltiplas recorreu-se ao teste de *Games-Howell* quando as variâncias eram não presumidas ou ao teste de *Tukey*, caso contrário.

Por outro lado, na comparação de variáveis qualitativas para avaliar a existência de correlação entre variáveis, calculou-se o coeficiente de correlação de *Spearman* (ρ) e respetiva significância. O coeficiente de correlação foi interpretado segundo a tabela 2:

Tabela 2: Tabela auxiliar para interpretação do coeficiente de correlação

Coeficiente de Correlação	Força de Correlação
]0; 0,2[Muito Fraca
[0,2; 0,4[Fraca
[0,4; 0,6[Moderada
[0,6; 0,8[Forte
[0,8; 1[Muito Forte
1	Excelente

4. Resultados

Neste capítulo, serão apresentados os dados de caracterização dos participantes e os resultados obtidos nos estudos de avaliação do stresse oxidativo, da viabilidade celular e dos micronúcleos.

4.1 Caracterização dos participantes

Foram incluídos no projeto 23 indivíduos pertencentes a famílias com variantes patogénicas no gene *BRCA2*. Cerca de metade dos indivíduos (57%; n=13) eram portadores de uma variante familiar. Foram identificadas 3 variantes familiares no gene *BRCA2*, que se encontram discriminadas na tabela 3. A variante fundadora portuguesa c.156_157insAlu foi a variante causal familiar mais frequente, representando mais de metade (52%, n=12) da amostra. A segunda variante mais frequente foi a c.4380_4381del, com uma frequência de 39% (n=9). Por fim, a variante c.5595_5596del esteve presente em 9% (n=2).

Tabela 3: Variantes causais identificadas nas famílias dos indivíduos incluídos no estudo.

Gene	Variante	Não portadores de variantes causais (n)	Portadores de variantes causais (n)	Nº de Famílias (n)
BRCA2 (NM_000059)	c.156_157insAlu, p.(?)	5	7	5
	c.4380_4381del, p.(Ser1461fs)	4	5	3
	c.5595_5596del, p.(F1866fs)	1	1	1
Total		10	13	9

Em relação aos dados sociodemográficos da nossa amostra, todos os indivíduos do grupo de não portadores eram do género feminino (100%, n=10), enquanto que, no grupo de portadores, 77% (n=10) eram do género feminino e 23% (n=3) eram do género masculino. A distribuição do género está representada na tabela 4.

Tabela 4: Distribuição da população do estudo, por grupo, tendo em conta o género.

Género	Não portadores, n (%)	Portadores, n (%)
Feminino	10 (100%)	10 (77%)
Masculino	0 (0%)	3 (23%)

Em relação às idades, no grupo de não portadores a média de idades foi de 62 anos e a mediana de 68 anos, tendo o indivíduo mais novo 24 anos e o mais velho 77 anos. No grupo dos portadores, os indivíduos apresentaram uma média de idades de 49 anos e uma mediana de 51 anos. Neste grupo, o indivíduo mais novo apresentava 23 anos e o mais velho 73 anos. Na figura 12, está representada a distribuição das idades dos dois grupos.

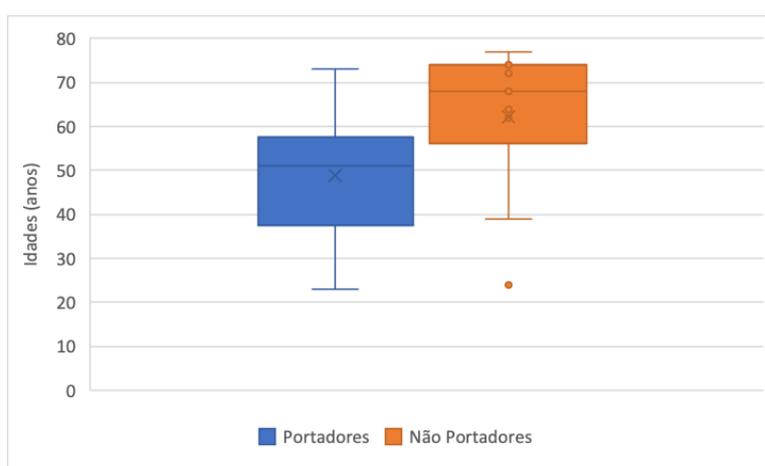


Figura 12: Gráfico representativo da distribuição das idades dos indivíduos por grupos tendo em conta a mediana de idades e os valores mínimos e máximos.

Sob ponto de vista profissional, no grupo dos não portadores, 60% (n=6) eram reformados, 20% (n=2) operários fabris e os restantes 20% (n=2) correspondiam a 1 desempregado e 1 costureira. Relativamente aos indivíduos portadores, 23% (n=3) eram reformados, 15% (n=2) professores, 15% (n=2) estudantes e os restantes 47% (n=6) assistentes operacionais, enfermeiras, operários fabris, empregadas de limpezas, engenheiros civis e pedreiros (1 cada).

Em relação ao local de residência, no grupo de não portadores, metade dos indivíduos (50%, n=5) reside no distrito de Coimbra (3 em Miranda do Corvo, 1 em Coimbra e 1 em Soure). Na restante metade, 30% (n=3) residiam no distrito de Leiria (2 em Fátima e 1 na Batalha) e 20% (n=2) ao distrito de Viseu (2 em Mangualde). Os indivíduos portadores eram, na maioria (46%, n=6), residentes no distrito de Coimbra (4 em Miranda do Corvo e 2 em Coimbra), 31% (n=4) residiam no distrito de Leiria (3 em Fátima e 1 na Batalha) e 23% (n=3) residiam no distrito de Viseu (3 em Viseu).

Relativamente aos dados antropométricos do grupo de não portadores, a mediana da massa foi de 62,5 kg, com uma massa mínima de 45 kg e máxima de 72 kg, e a mediana da altura foi de 1,60 m, com uma altura mínima de 1,49 m e máxima de 1,69 m. Nos indivíduos portadores, a mediana da massa foi de 63 kg, com uma massa mínima de 46 kg e máximo de 96 kg, e a mediana da altura foi de 1,60 m, com uma altura mínima de 1,49 m e máxima de 1,73 m. Na figura 13, estão representados os gráficos da distribuição do IMC. No grupo dos não portadores (gráfico I) 1 indivíduo (10%) apresentava baixo IMC, 50% (n=5) apresentavam IMC considerado normal, 3 (30%) estavam em situação de pré-obesidade e 1 (10%) apresentava obesidade de grau I. No gráfico II, observou-se 1 indivíduo em situação de baixo IMC (8%), 39% (n=5) dos indivíduos estavam em situação de IMC dentro dos valores normais, 39% (n=5) em situação de pré-obesidade e 14% (n=2) com obesidade de grau I.

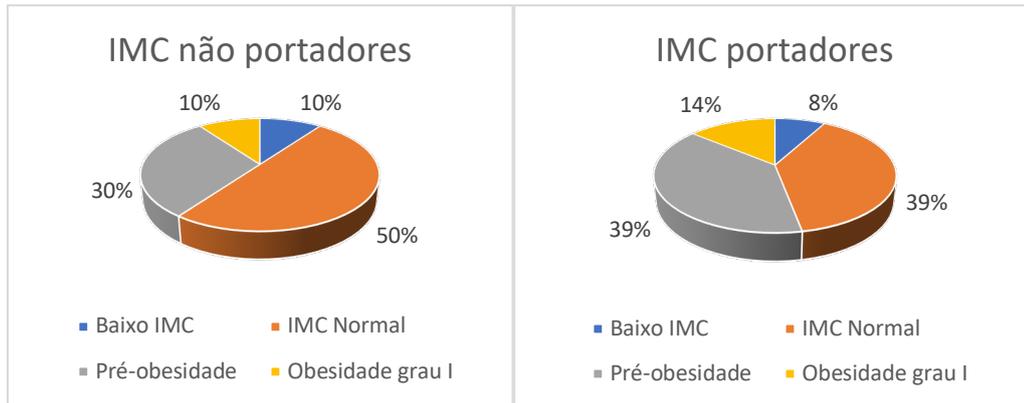


Figura 13: Gráfico representativo da distribuição do IMC dos indivíduos por grupos. À esquerda está a distribuição do IMC dos indivíduos não portadores. À direita está a distribuição nos indivíduos portadores.

Relativamente a hábitos tabágicos, apenas um indivíduo em cada grupo era fumador. O indivíduo não portador (10%) referiu fumar 1 maço de tabaco por dia, enquanto o indivíduo portador (8%) referiu fumar meio maço de tabaco por dia.

Em termos de atividade física, apenas um indivíduo (10%) no grupo de não portadores não praticava qualquer tipo de atividade física. No grupo dos portadores, 23% (n=3) não praticava qualquer atividade física. Em ambos os grupos, o tipo de atividade física mais reportada foi a caminhada, correspondendo a 80% (n=8) no grupo dos não portadores e a 62% (n=8) no grupo de portadores. Nos dois grupos, a duração da caminhada variava de 30 a 90 minutos.

Na figura 14 está representada a distribuição da quantidade de volume de água ingerida. Metade (n=5) dos indivíduos não portadores ingerem menos de 1L de água por dia, 40% (n=4) ingerem aproximadamente 1,5 L de água por dia e 10% (n=1) mais de 1,5L. No caso do grupo dos portadores, mais de metade (62%, n=8) ingerem menos 1 L, 30% (n=4) ingerem aproximadamente 1,5 L e 8% (n=1) ingere mais de 1,5 L.

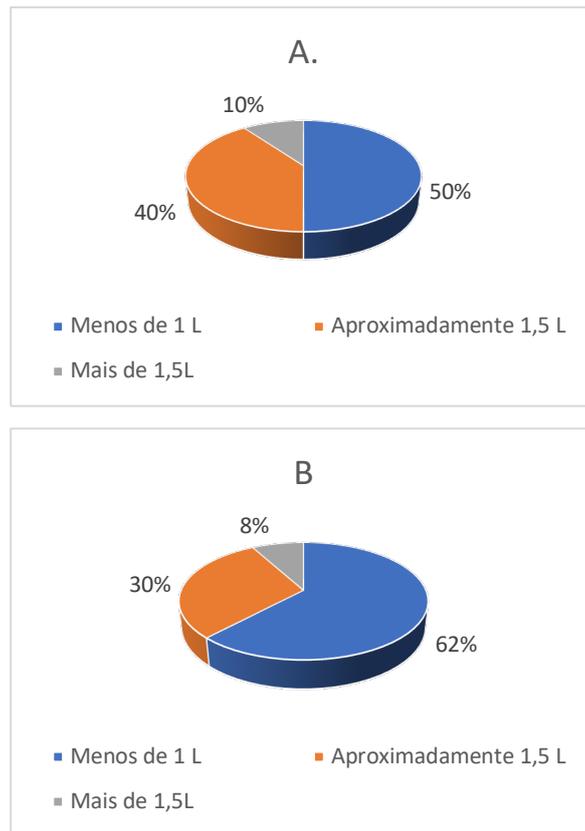


Figura 14: Gráfico representativo da distribuição da ingestão de água dos indivíduos por grupos. No gráfico A está a distribuição da ingestão de água do grupo dos não portadores. No gráfico B está a distribuição da ingestão de água do grupo dos portadores.

Apenas 1 indivíduo (10%) no grupo de não portadores tinha antecedentes de doença oncológica prévia (carcinoma da mama) (tabela 3). No grupo de portadores, 4 indivíduos (31%) tinham antecedentes de doença oncológica e 9 (69%) não apresentaram qualquer diagnóstico de doença oncológica (tabela 5).

Tabela 5: Distribuição da população do estudo, por grupo, tendo em conta o fenótipo.

Característica	Não portadores, n (%)	Portadores, n (%)
Fenótipo		
Doença oncológica	1 (10%)	4 (31%)
Cancro da mama	1 (10%)	4 (31%)
Cancro da Tiroide	0	1 (8%)
Sem doença oncológica	9 (90%)	9 (69%)

Na tabela 6 encontram-se descritos os antecedentes patológicos dos indivíduos em estudo. No grupo dos não portadores, metade (50%, n=5) negaram qualquer antecedente patológico, enquanto os restantes 5 indivíduos reportaram ter pelo menos um dos antecedentes pessoais referidos na tabela. As doenças e os fatores de risco cardiovasculares (acidente vascular cerebral, doença coronária, dislipidemia e hipertensão arterial) foram o grupo de doenças mais frequentemente encontrado no grupo dos não portadores (50%, n=5), seguidos pelos antecedentes cirúrgicos, neuropsiquiátricos, respiratórios e outros antecedentes, cada um dos quais reportado por 1 indivíduo (10%). No grupo dos portadores, 4 indivíduos (31%) apresentaram antecedentes oncológicos associados à síndrome e apenas 1 (8%) indivíduo relatou ter antecedentes oncológicos não associados à síndrome (tumor da tiroide). Quanto aos antecedentes não oncológicos, os mais frequentes foram outros antecedentes (anemia, doença de Behçet e hepatite) com 23% (n=3), assim como os antecedentes cardiovasculares e respiratórios (asma e COVID-19). No grupo dos portadores, 23% (n=3) não tinha qualquer antecedente pessoal.

Tabela 6: Distribuição da população do estudo, por grupo, tendo em conta o conjunto de antecedentes pessoais.

Antecedentes pessoais	Não portadores, n (%)	Portadores, n (%)
Oncológicos		
Associados à síndrome	1 (10%)	4 (31%)
Não associados à síndrome	0 (0%)	1 (8%)
Não oncológicos		
Cardiovasculares ou fatores de risco cardiovasculares	5 (50%)	3 (23%)
Hipertensão Arterial	3 (30%)	2 (15%)
Doença Coronária	1 (10%)	
Dislipidémia	2 (20%)	
Diabetes		1 (8%)
Acidente Vascular Cerebral	1 (10%)	
Cirúrgicos	1 (10%)	0 (0%)
Hérnia inguinal	1 (10%)	
Neuropsiquiátricos	1 (10%)	1 (8%)
Depressão	1 (10%)	
Doença de Parkinson		1 (8%)
Respiratórios	0 (0%)	5 (40%)
Covid-19		3 (23%)
Asma		1 (8%)
Apneia do sono		1 (8%)
Outros antecedentes	1 (10%)	3 (23%)
Anemia		1 (8%)
Doença de Behçet		1 (8%)
Hepatite		1 (8%)
Glaucoma	1 (10%)	
Sem antecedentes	5 (50%)	3 (23%)

Todos os indivíduos da amostra já tinham realizado previamente exames de diagnóstico com radiação ionizante. No grupo de não portadores observou-se uma média de 15 procedimentos de imagem por indivíduo, sendo que o número máximo de procedimentos por indivíduo foi de 47. Os procedimentos de diagnóstico mais frequentemente realizados por este grupo foram a radiografia torácica e a mamografia, ambos realizados por 80% (n=8) dos indivíduos. Em relação aos portadores, observou-se uma média de 12 estudos imagiológicos por indivíduo. O número máximo de procedimentos de diagnóstico realizados individualmente foi de 32. Tal como aconteceu no grupo de não portadores, o exame de diagnóstico mais realizado foi a radiografia ao tórax (92%, n=12), seguida pela mamografia (68%, n=9).

Tal como foi dito anteriormente, foi calculada uma estimativa da dose efetiva cumulativa a que os indivíduos de ambos os grupos tinham sido expostos. No grupo de não portadores, os indivíduos foram expostos, em média, a 4,65 mSv com uma mediana de 2,26 mSv (máximo de 11,96 mSv e mínimo de 0,83 mSv). No grupo de portadores, os indivíduos foram expostos, em média, a uma dose efetiva cumulativa de 6,84 mSv com mediana de 4,84 mSv (valor máximo de 29,22 mSv e valor mínimo de 0,26 mSv).

A figura 15 representa a distribuição da dose efetiva cumulativa em cada grupo. Verificamos que 80% (n=8) dos indivíduos não portadores foram expostos a uma dose efetiva cumulativa entre 1 mSv e 20 mSv e que 20% (n=2) foram expostos a menos 1 mSv, que corresponde ao limite de dose anual para a população em geral ao longo da sua vida. Nenhum indivíduo não portador tinha sido exposto a doses superiores a 20 mSv. No caso dos indivíduos portadores, 31% (n=4) tinham sido expostos a dose inferiores a 1 mSv, 61% (n=8) estiveram expostos a doses cumulativas entre 1 mSv e 20 mSv e 8% (n=2) foram expostos a doses superiores a 20 mSv e iguais ou inferiores a 50 mSv. Nenhum indivíduo foi submetido a doses de diagnóstico superiores a 50 mSv.

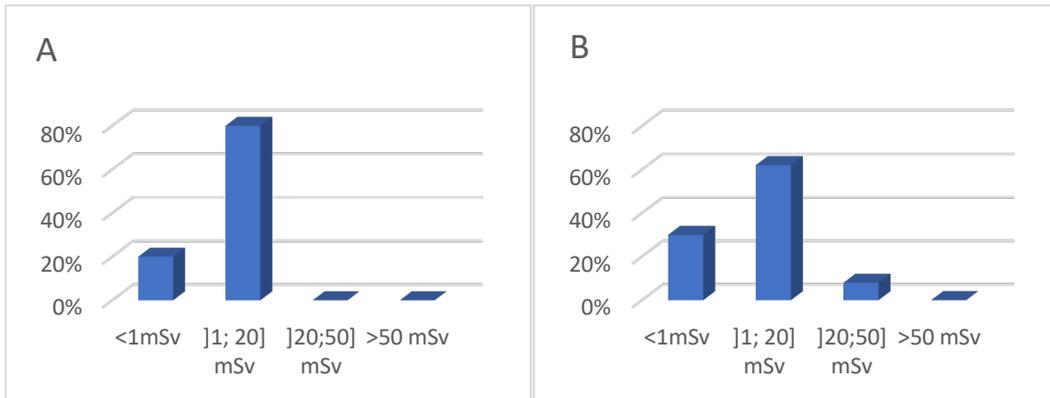


Figura 15: Gráfico representativo da distribuição da dose cumulativa efetiva dos indivíduos do grupo de não portadores (A) e portadores (B).

No grupo dos não portadores, apenas um indivíduo tinha sido submetido a tratamentos de radioterapia, com exposição a uma dosimetria de 66 Gy. No grupo de portadores, 30% (n=4) tinham sido submetidos a tratamentos de radioterapia para tratar uma neoplasia mamária. Apenas foi possível saber os valores dosimétricos de 2 destes doentes, sendo o valor médio de dose exposição dos tratamentos de radioterapia de 55 Gy.

4.2 Avaliação da viabilidade celular

Das 23 amostras, 18 foram submetidas a mamografia e 5 foram submetidas a TC lombar. No grupo das amostras submetidas a mamografia, 9 eram de não portadores e 9 de portadores, enquanto que nas amostras submetidas a TC, 1 era proveniente do grupo de não portadores e 4 do grupos de portadores.

O ensaio de FMCA foi realizado nas amostras que tinham sido sujeitas a mamografia de 2 incidências (amostras 1 a 18), correspondendo a uma dose efetiva de 0,19 mSv. As restantes foram submetidas a TC, correspondendo a uma dose efetiva de 18,23 mSv. Estes valores foram comparados relativamente à informação genética, ao fenótipo, aos antecedentes pessoais, às faixas etárias, ao valor do IMC à prática de atividade física, aos hábitos tabágicos à ingestão de água ingerida, ao número de procedimentos com radiação ionizante, à dose efetiva cumulativa e aos tratamentos de radioterapia.

Neste ensaio, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de portadores e de não portadores para o mesmo tempo após irradiação e o para a mesma dose de exposição, assim como também entre diferentes doses de exposição para o mesmo tempo após irradiação, entre os diferentes tempos para a mesma dose de exposição e entre os diferentes tempos pós irradiação para o mesmo grupo e mesma dose de exposição. Na figura 16 é possível observar as percentagens de viabilidade celular das condições irradiadas normalizadas à condição controlo (não irradiada). O gráfico A representa os dados obtidos 24h após a exposição à dose efetiva de 0,19 mSv. Para o tempo e dose descrita, as amostras do grupo de não portadores exibiu uma mediana de viabilidade celular de 95,91% (mínimo de 54,82%; máximo de 186,9%) enquanto que o grupo de portadores tem uma mediana de 102,2% (mínimo de 76,76%; máximo de 145,7%). No gráfico B, podemos observar a percentagem de viabilidade celular às 72h após a irradiação das amostras que foram submetidas à dose efetiva de 0,19 mSv. O grupo de não portadores apresentou uma mediana de viabilidade celular de 96,50% (mínimo de 81,89%; máximo de 187,9%) e o grupo de portadores uma viabilidade de 101,3% (mínimo de 88,69%; máximo de 147,2%). O gráfico C corresponde à percentagem de viabilidade celular das amostras que tinham sido submetidas 24h antes a TC. Neste caso, a viabilidade do grupo de não portadores foi de 90,30% e a mediana do grupo de portadores 95,05% (mínimo de 80,70; máximo de 100,9). O gráfico D corresponde à percentagem de viabilidade celular das amostras que tinham sido submetidas a TC 72h antes. Neste caso, a viabilidade do grupo de não portadores foi de 101,1% e a mediana do grupo de portadores 101,3% (mínimo de 100,5%; máximo de 101,6%).

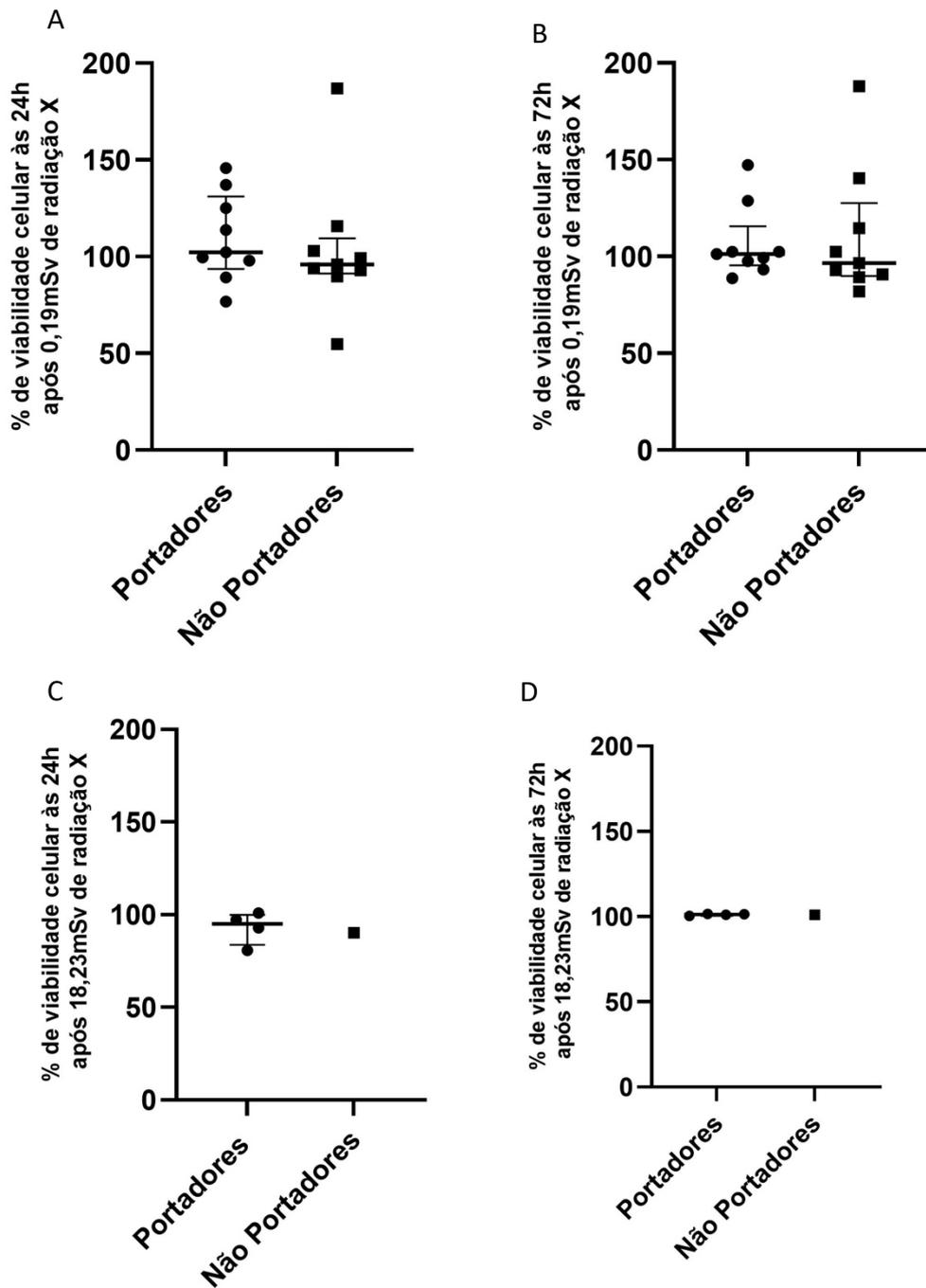


Figura 16: Percentagem de viabilidade celular determinada por fluorescência pelo ensaio FMCA, usando a sonda FDA, 24h (gráfico A e C) e 72h (gráfico B e D) após a exposição a radiação X da mamografia e da TC. As amostras foram submetidas a duas doses diferentes: 0,19 mSv (gráficos A e B), correspondendo a uma 2 incidência de mamografia, e 18,23 mSv (gráficos C e D), correspondendo a uma TC lombar. Os resultados estão apresentados sobre a forma de intensidades de fluorescência, com a normalização da condição irradiada à condição não irradiada.

Os valores de viabilidade celular foram relacionados com as variáveis descritas anteriormente, tendo sido encontradas diferenças com significado estatístico entre os valores de viabilidade celular e a quantidade de água ingerida por dia. Neste caso, os valores de viabilidade celular são mais elevados nos portadores que ingeriram uma quantidade de água por dia superior ($p=0,020$). Da mesma forma, foi encontrada uma diferença com significado estatístico entre os valores de viabilidade celular e a presença de antecedentes cardiovasculares. Neste caso, os valores de viabilidade celular são superiores em indivíduos não portadores com antecedentes cardiovasculares ($p=0,014$).

4.3 Avaliação do stresse oxidativo

Dada a importância que as ROS poderão ter nos mecanismos de citotoxicidade da célula após ter sido irradiada, foi determinada a presença de peróxidos intracelulares e de radical superóxido nas amostras de sangue periférico dos indivíduos, usando as sondas DCFH₂-DA e a DHE, respetivamente.(49) A avaliação das ROS foi realizada em 18 amostras sujeitas previamente a mamografia e em 5 amostras submetidas a TC, 2h e 4h após a irradiação. As defesas antioxidantes foram determinadas apenas em algumas amostras (5 a 9) que tinham sido submetidas a mamografia. Nesta avaliação, determinou-se o valor normalizado de cada ROS e da defesa antioxidante. Assim, para cada indivíduo, calculou-se o quociente entre a concentração de peróxidos intracelulares da condição controlo e irradiado, entre a concentração do radical superóxido da condição controlo e irradiado, e da glutathiona reduzida da condição de controlo e irradiado.

Os resultados foram obtidos para o grupo de não portadores e grupo de portadores para ambas as espécies reativas referidas e para a defesa antioxidante GSH. Estes valores foram comparados relativamente à informação genética, ao fenótipo, aos antecedentes pessoais, às faixas etárias, ao IMC, à prática de atividade física, aos hábitos tabágicos, à quantidade de água ingerida, ao número de procedimentos com radiação ionizante, à dose efetiva cumulativa e aos tratamentos de radioterapia.

4.3.1 Avaliação da produção de peróxidos intracelulares

Na figura 17, estão representadas as concentrações de peróxidos intracelulares quando as amostras foram submetidas a uma dose efetiva de 0,19 mSv, medidos 2h e 4h após a irradiação (gráficos A e B) e quando foram submetidas a uma dose efetiva de 18,23 mSv, medidos novamente 2h e 4h após a irradiação (gráficos C e D). Duas horas após as amostras terem sido submetidas a 0,19 mSv de radiação X, a mediana do valor normalizado de peróxidos intracelulares no grupo de não portadores foi de 0,89 (mínimo de 0,72; máximo de 1,22) e a do grupo de portadores foi de 1,0 (mínimo de 0,77; máximo de 6,09) (gráfico A), não se verificando diferenças com significado estatístico. Quatro horas após as amostras terem sido submetidas a 0,19 mSv de radiação X, a mediana do valor normalizado de peróxidos intracelulares no grupo de não portadores foi de 0,97 (mínimo de 0,77; máximo de 1,96) e a do grupo de portadores 0,95 (mínimo de 0,75; máximo de 1,05) (gráfico B), não se verificando também diferenças com significado estatístico. Em relação às amostras que tinham sido submetidas à dose efetiva de 18,23 mSv de radiação X, 2h após a irradiação a mediana do valor normalizado de peróxidos intracelulares no grupo de não portadores foi de 0,56 e a do grupo de portadores 0,90 (mínimo de 0,86; máximo de 1,01) (gráfico C), observando-se diferença com significado estatístico ($p=0,021$). Neste caso, o valor normalizado de peróxidos intracelulares foi superior no grupo de portadores do que no grupo de não portadores. No gráfico D, que representa os valores obtidos 4h após a irradiação (18,23 mSv de radiação X), observou-se que a mediana do valor normalizado de peróxidos intracelulares no grupo de não portadores foi de 1,05 e a do grupo de portadores 0,98 (mínimo de 0,81; máximo de 1,13), não se verificando diferenças com significado estatístico. Nas restantes comparações entre os diferentes tempos (2h e 4h) e entre as diferentes doses efetivas (0,19 mSv e 18,23 mSv) não se encontraram diferenças com significado estatístico.

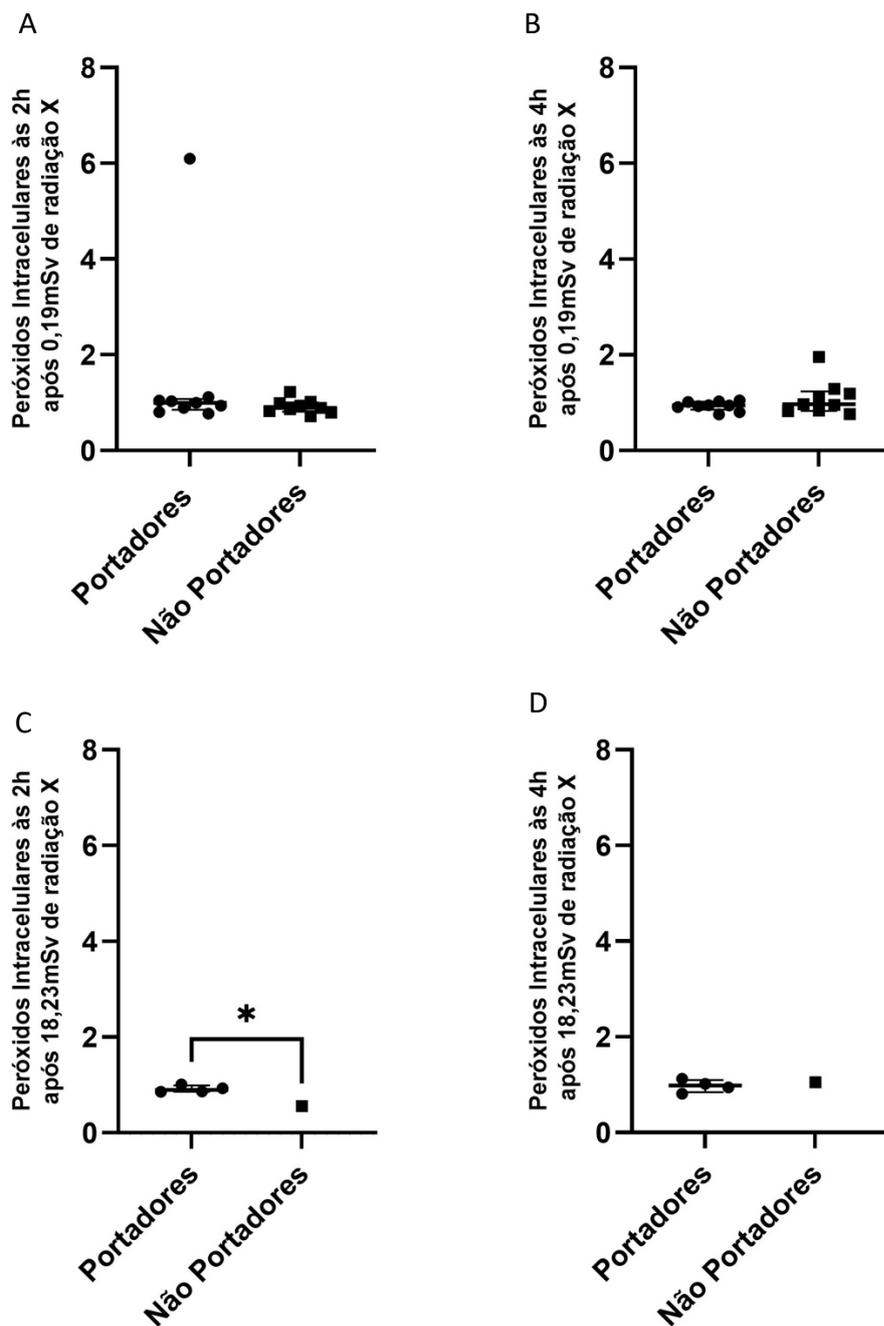


Figura 17: Níveis de peróxidos intracelulares medidos por fluorescência usando DCFH₂-DA quando as amostras foram submetidas a radiação X da mamografia às 2h (gráfico A) e às 4h (gráfico B) e quando as amostras foram submetidas a radiação X da TC às 2h (gráfico C) e às 4h (gráfico B). Os resultados estão apresentados sobre a forma de média de intensidades de fluorescência, com a normalização da condição irradiada à condição não irradiada.

Os resultados dos valores normalizados de peróxidos intracelulares foram comparados com as variáveis mencionadas em 4.3., não tendo sido encontradas diferenças nem correlações com significado estatístico.

4.3.2 Avaliação da produção do radical superóxido

No ensaio de avaliação da produção do radical superóxido, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de portadores e não portadores para o mesmo tempo após irradiação e para a mesma dose de exposição, assim como também entre diferentes doses de exposição para o mesmo tempo pós irradiação, entre diferentes tempos pós irradiação para a mesma dose de exposição e entre diferentes tempos pós irradiação para o mesmo grupo e mesma dose de exposição.

Na figura 18 estão representadas as concentrações intracelulares do radical superóxido quando as amostras foram submetidas a uma dose efetiva de 0,19 mSv, medidos 2h e 4h após a irradiação (gráficos A e B) e quando foram submetidas a uma dose efetiva de 18,23 mSv, medidos novamente 2h e 4h após a irradiação. Duas horas após as amostras terem sido submetidas a 0,19 mSv de radiação X (gráfico A), a mediana do valor normalizado do radical superóxido no grupo de não portadores foi de 0,95 (mínimo de 0,84; máximo de 1,12) e no grupo de portadores foi de 0,95 (mínimo de 0,85; máximo de 1,19). Quatro horas após as amostras terem sido submetidas a uma dose de exposição de 0,19 mSv de radiação X (gráfico B), obteve-se a mediana do valor normalizado do radical superóxido no grupo de não portadores foi de 0,99 (mínimo de 0,95; máximo de 1,00) e a do grupo de portadores 1,04 (mínimo de 1,00; máximo de 1,17). Duas horas após exposição a 18,23 mSv de radiação X (gráfico C), a mediana do valor normalizado do radical superóxido no grupo de não portadores foi de 0,97 e no grupo de portadores foi de 0,98 (mínimo de 0,91; máximo de 1,03). Quatro horas após as amostras terem sido submetidas a 18,23 mSv de radiação X (gráfico D), a mediana do valor normalizado do radical superóxido no grupo de não portadores foi de 0,97 e a do grupo de portadores de 1,05 (mínimo de 1,00; máximo de 1,06).

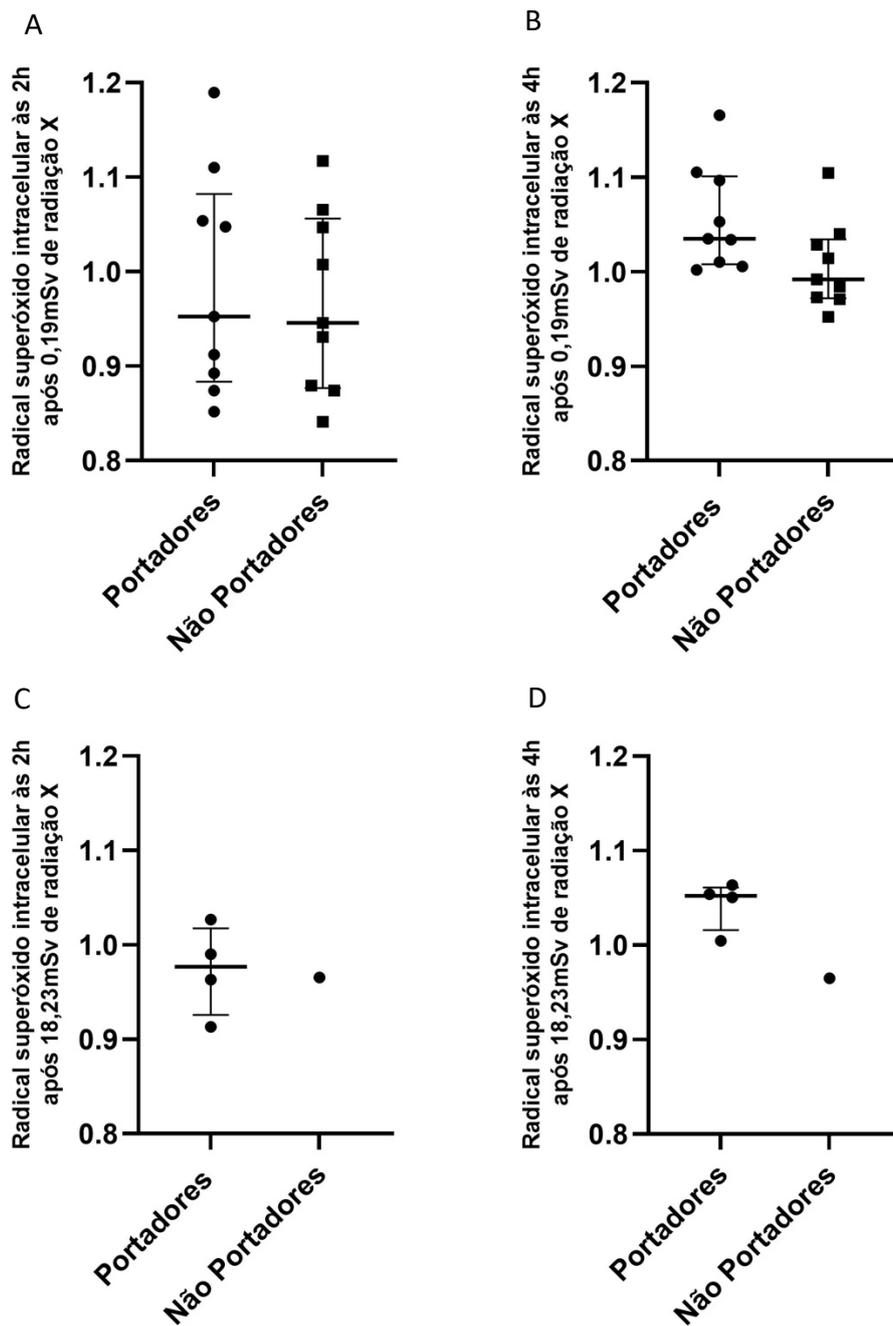


Figura 18: Níveis intracelulares do radical superóxido medidos por fluorescência usando a DHE quando as amostras foram submetidas a radiação X da mamografia às 2h (gráfico A) e às 4h (gráfico B) e quando as amostras foram submetidas a radiação X da TC às 2h (gráfico C) e às 4h (gráfico D). Os resultados estão apresentados sobre a forma de média de intensidades de fluorescência, com a normalização da condição irradiada à condição não irradiada.

Os resultados do valor normalizado do radical superóxido foram comparados com as variáveis mencionadas em 4.3., tendo sido encontradas apenas diferenças estatisticamente significativas entre a concentração do radical superóxido às 4h para a dose de 0,19 mSv e a presença de antecedentes cardiovasculares. Neste caso, a concentração do radical superóxido foi superior no grupo de não portadores com antecedentes cardiovasculares ($p=0,050$).

4.3.3 Avaliação da produção da glutathiona reduzida

O ensaio da glutathiona reduzida foi realizado 2h e 4h após a irradiação em algumas amostras que tinham sido submetidas a mamografia de duas incidências (dose efetiva de 0,19 mSv). Não foi possível determinar a concentração das defesas antioxidantes em todas as amostras para ambas as doses, pela descontinuação comercial do alaranjado de mercúrio.

Neste ensaio, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de portadores e não portadores para o mesmo tempo após irradiação e o para a mesma dose de exposição, assim como entre diferentes tempos pós irradiação para o mesmo grupo e mesma dose de exposição. Na figura 19, estão representados os valores normalizados de GSH quando as amostras foram submetidas a uma dose efetiva de 0,19 mSv, medidos 2h e 4h após a irradiação (gráficos A e B). Duas horas após terem sido submetidos a 0,19 mSv de radiação X (gráfico A), a mediana do valor normalizado de GSH no grupo de não portadores foi de 0,99 (mínimo de 0,92; máximo de 1,05) e a do grupo de portadores 1,00 (mínimo de 0,96; máximo de 1,10). Quatro horas após as amostras terem sido submetidas a uma dose de exposição de 0,19 mSv de radiação X (gráfico B), observou-se que a mediana do valor normalizado de GSH no grupo de não portadores foi de 1,08 (mínimo de 1,07; máximo de 1,09) e a do grupo de portadores de 1,00 (mínimo de 0,99; máximo de 1,06).

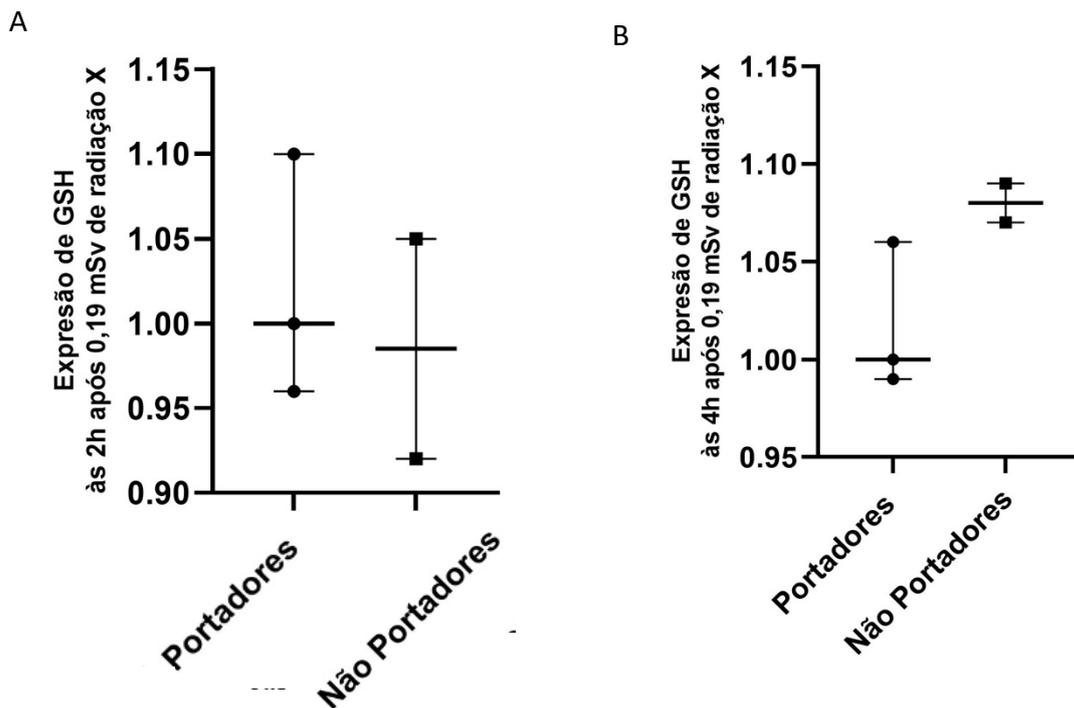


Figura 19: Níveis intracelulares da expressão de GSH medidos por fluorescência usando o alaranjado de mercúrio. A avaliação foi realizada às 2h (gráfico A) e 4h (gráfico B) após a exposição a 0,19 mSv. Os resultados estão apresentados sobre a forma de média de intensidades de fluorescência, com a normalização da condição irradiada à condição não irradiada.

Os resultados do valor normalizado de glutathiona reduzida foram comparados com as variáveis mencionados em 4.3., não tendo sido encontradas diferenças nem correlações com significado estatístico.

4.4 Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio de micronúcleos

A avaliação da genotoxicidade pelo ensaio de micronúcleos foi realizada nas 18 amostras sujeitas à dose correspondente a uma mamografia com 2 incidências e nas 5 amostras sujeitas à dose correspondente a uma TC lombar.

Para se proceder à contagem dos micronúcleos no protocolo utilizado, InterRad 2020 (51), foi necessário que as células tenham o citoplasma bem definido, o que não foi possível obter neste trabalho. Na figura 20, verificamos essa falta de condições para prosseguir com a contagem dos micronúcleos.

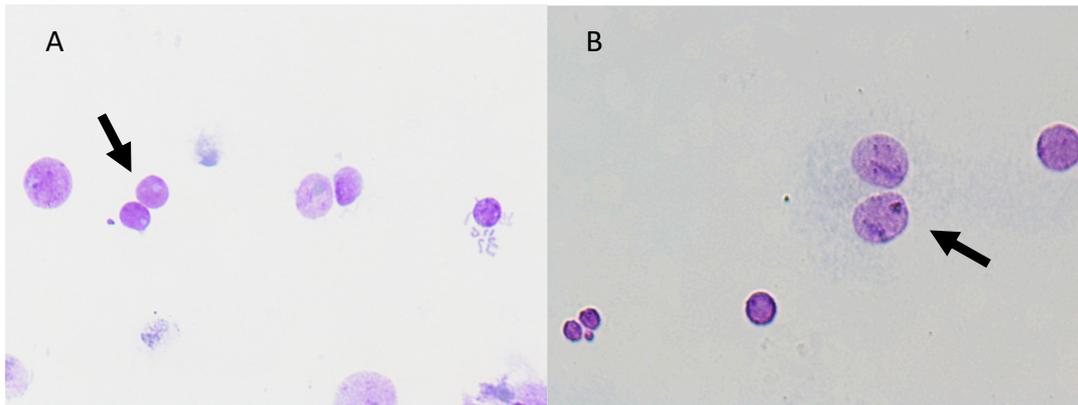


Figura 20: Em A uma imagem da condição não irradiada de duas células binucleadas, mas que não apresentam citoplasma bem definido. Em B aparentemente duas células binucleadas, também da condição não irradiada, mas sem definição de citoplasma. As setas pretas representam duas possíveis células binucleadas sem citoplasma bem definido. Imagens obtidas com o microscópio Nikon Eclipse 80i, equipado com Nikon Digital Camera DXM 1200F, a partir de duas lâminas de duas condições diferentes do mesmo indivíduo (Giemsa 4%, 500x).

Assim, como não conseguimos obter células com citoplasma definido foi realizado uma avaliação da *performance* de 3 protocolos com amostras de um voluntário saudável: InterRad 2020 (51) (protocolo utilizado), IAEA 2011(52) e o descrito por Tanaka *et al.*(53). Todos os protocolos foram realizados com sangue total de um indivíduo não pertencente ao estudo. Na tabela 7, estão sintetizadas as principais diferenças.

Tabela 7: Comparação entre os 3 protocolos utilizados para otimização do ensaio dos micronúcleos.

Protocolo	Cultura Celular	Tratamento Hipotónico	Solução de Fixação I	Solução de Fixação II
InterRad 2020	Sangue Total	0,075M KCl	4:1:5 metanol: ácido acético: NaCl	3:1 metanol: ácido acético
IAEA 2011	Sangue Total	0,075M KCl	1:1 Solução de Ringer (NaCl, KCl, CaCl ₂) e 10:1 metanol: ácido acético	10:1 metanol: ácido acético
Tanaka <i>et al.</i>, 2009	Sangue Total	0,075M KCl	3:1 metanol: ácido acético + 3 gotas de formaldeído a 37%	3:1 metanol: ácido acético

A coloração das lâminas com Giemsa, foi realizada em dois tempos distintos, um imediatamente após a finalização do protocolo e outro 10 h depois. Verificou-se que no 2º tempo, o citoplasma se mantinha bem definido e visível, ao contrário do que acontecia no primeiro tempo. Esta situação foi transversal aos 3 protocolos. Na figura 21, pode-se observar os resultados de cada protocolo com coloração realizada 10 h após a finalização do protocolo.

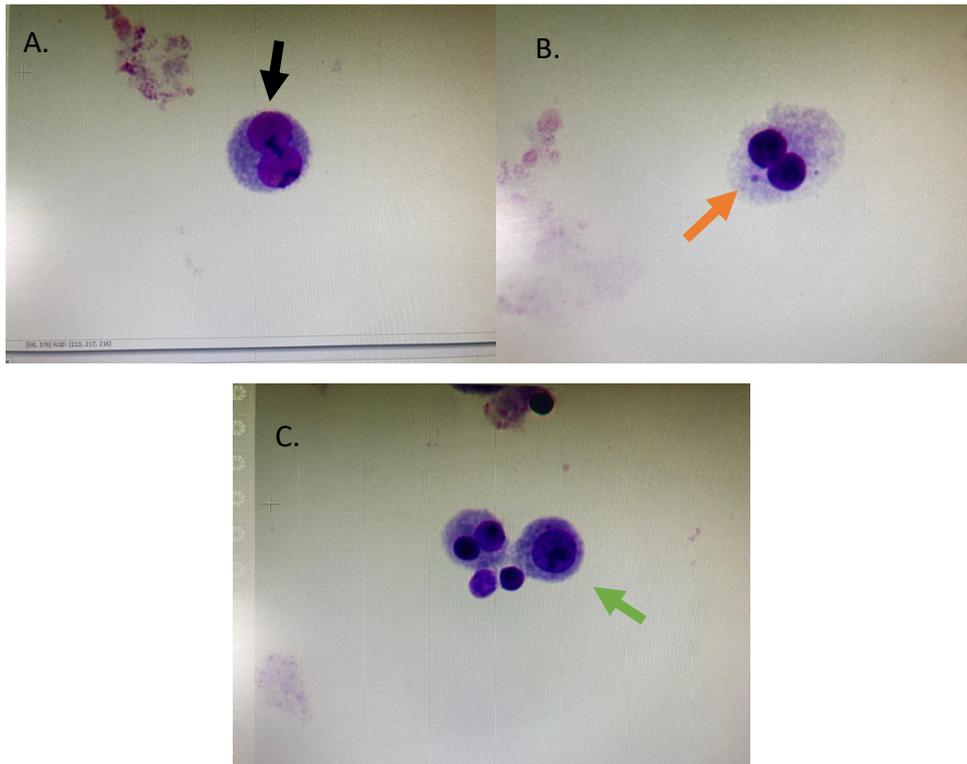


Figura 21: As 3 imagens são da coloração realizada 10 h depois do final do procedimento. A imagem A foi obtida utilizando o protocolo (InterRad, 2020) e a seta preta representa uma célula binucleada com o citoplasma bem definido. A imagem B foi obtida utilizando o protocolo (Tanaka et al., 2009) e a seta a laranja representa uma célula binucleada com citoplasma bem definido com um micronúcleo. A imagem C foi obtida utilizando o protocolo (IAEA, 2011) e a seta verde representa uma célula mononucleada. Imagens obtidas com o microscópio Nikon Eclipse 80i, equipado com Nikon Digital Camera DXM 1200F, a partir de três lâminas de três protocolos diferentes do mesmo indivíduo (Giemsa 4%, 500x).

Devido a estes resultados, decidiu-se continuar a usar o protocolo utilizado anteriormente, InterRad 2020 (51), mudando o tempo de coloração das lâminas. Contudo, posteriormente verificou-se que as lâminas correspondentes às condições irradiadas, não apresentavam novamente o citoplasma bem definido. Este resultado pode ser visualizado na figura 22.

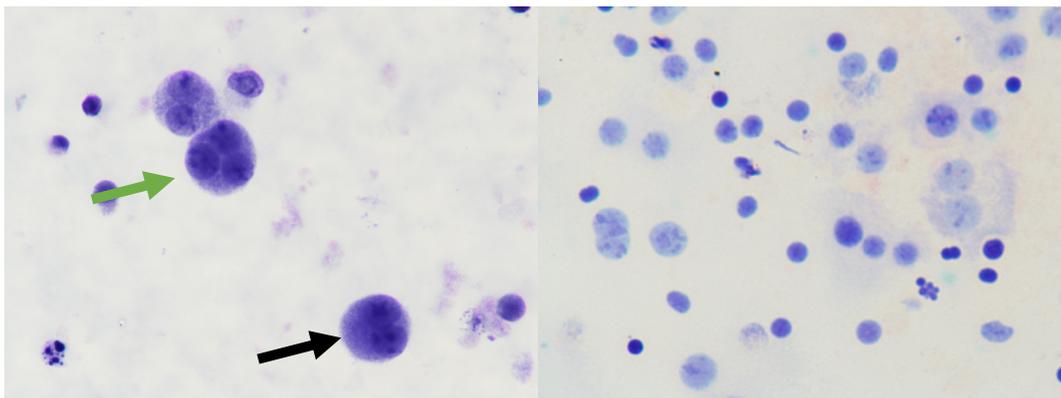


Figura 22: Na imagem da esquerda verificamos a condição de controlo de um indivíduo com o citoplasma bem definido. A seta preta exemplifica uma célula binucleada com o citoplasma bem definido e a seta verde exemplifica uma célula trinucleada com o citoplasma bem definido. A imagem da direita é a condição irradiada do mesmo indivíduo. Podemos observar que não existe nenhuma célula com o citoplasma bem definido. Imagens obtidas com o microscópio Nikon Eclipse 80i, equipado com Nikon Digital Camera DXM 1200F, a partir de duas lâminas de duas condições diferentes do mesmo indivíduo (Giemsa 4%, 500x).

Assim, como foram poucos os indivíduos em que o citoplasma estava definido em ambas as condições (irradiado e controlo), não foi possível realizar a análise dos micronúcleos.

5. Discussão

A radiação ionizante tem vindo a ser implicada no aumento do risco de desenvolvimento dos diversos cancros associados à SCHMO. Nos últimos anos têm sido realizados vários estudos com o objetivo de esclarecer se os indivíduos portadores de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são mais radiosensíveis do que indivíduos não portadores. No entanto, é importante ter em conta que a radiosensibilidade varia de indivíduo para indivíduo. (30-35)

A resposta dos tecidos à radiação foi pela primeira vez descrita em 1906, quando o radiologista Jean Bergonie e o histologista Louis Tribondeau expuseram testículos de roedores a raios-X. A escolha dos testículos residiu no facto de estes conterem quer células maduras (espermatozóides), quer células imaturas (espermatogónia e espermatócitos).(19,20) Após irradiarem os testículos, Bergonie e Tribondeau observaram que as células imaturas eram agredidas com uma dose de radiação mais baixa do que as células maduras. Assim, propuseram a lei que descreve a sensibilidade dos tecidos à radiação. Segundo a lei de Bergonie e Tribondeau (21): as células estaminais ou imaturas são mais radiosensíveis que as células maduras; tecidos e órgãos jovens são mais radiosensíveis do que tecidos e órgãos mais velhos; quanto maior a atividade metabólica da célula, maior a radiosensibilidade; quanto maior a taxa de proliferação e de crescimentos dos tecidos, maior a radiosensibilidade.

De acordo com esta lei, quando comparamos uma criança ou um adulto com um feto, o feto é mais radiosensível e, conseqüentemente, mais suscetível aos efeitos nocivos da radiação.

Em 1925, os embriologistas Ancel e Vitemberger introduziram um novo conceito à lei de Bergonie e Tribondeau ao sugerir que a suscetibilidade intrínseca de qualquer célula ao dano causado pela radiação ionizante é semelhante, mas o tempo de aparecimento das lesões provocadas pela radiação varia de acordo com o tipo de célula. A este período de tempo chamaram tempo de latência.(20,21) As experiências, em que Ancel e Vietemberger irradiaram mamíferos com doses letais de radiação, demonstraram que existem dois fatores responsáveis pelo dano provocado pela radiação: a quantidade de stresse biológico que a célula recebe e as condições de pré e

pós-irradiação a que a célula é exposta.(20,21) O maior stresse biológico de uma célula é a necessidade de divisão. Ancel e Vietemberger determinaram que, apesar de uma determinada dose de radiação causar o mesmo dano em todas as células, as lesões só são demonstradas quando estas se dividem.(20,21)

Estes conceitos apresentados em 1925 são essenciais para a compreensão dos efeitos da radiação nos indivíduos com mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Estes genes codificam proteínas com um papel fundamental não só na reparação dos danos do ADN, muitos devidos à radiação ionizante, mas também na regulação do ciclo celular, levando a uma estabilidade genómica e supressão tumoral. Uma perda de função numa destas proteínas pode levar a um aumento da radiosensibilidade, isto é, um aumento da instabilidade genómica e do risco mutagénico e, conseqüentemente, maior risco de cancro. Foi com base nestes conceitos que foi desenhado o presente estudo com o objetivo de avaliar se as mutações nos genes *BRCA* aumentam a radiosensibilidade nestes indivíduos.(13)

O desenho ideal para este estudo seria um estudo de coorte prospetivo, onde seriam incluídos participantes saudáveis portadores de mutação, em que o objetivo seria comparar indivíduos que seriam expostos à radiação ionizante usada nos exames de diagnóstico, com indivíduos não expostos a essa radiação. Não obstante a necessidade de um período de investigação muito longo para avaliar os efeitos da radiação ionizante, este desenho experimental não seria ético porque os indivíduos portadores destas mutações são seguidos em planos de rastreio oncológico, nos quais são submetidos a exames imagiológicos que usam radiação ionizante. Um desenho alternativo seria um estudo retrospectivo onde se investigaria a associação entre os portadores que desenvolveram cancro da mama e a dose de radiação a que estiveram expostos, tenha sido proveniente de exames de diagnóstico, de tratamentos de radioterapia ou outros. Esta metodologia já foi utilizada em diversos estudos, não demonstrando resultados consistentes.(30)

Considerando as dificuldades referidas, no presente trabalho procurou-se investigar a influência da mutação no gene *BRCA2* na sensibilidade à radiação ionizante. No

presente estudo, a variante c.156_157insAlu foi a variante mais frequente nos indivíduos da amostra de 23 indivíduos (57%). Estes dados estão em concordância com o estudo de Peixoto *et al.*, que demonstrou que a variante c.156_157insAlu é a variante do gene *BRCA2* mais comum em Portugal, com uma prevalência de 27% nas regiões Centro/Norte.(54)

Uma das limitações do nosso estudo traduziu-se no reduzido número de indivíduos do género masculino incluídos. De facto, a quantidade de população masculina seguida em consulta de risco familiar em ambos os hospitais (IPO e CHUC) é muito menor quando comparada com a população feminina. Este facto leva a colocar algumas questões: será que a incidência das mutações entre homens e mulheres é diferente? Será que o facto de os homens realizarem o primeiro exame de rastreio com radiação ionizante aos 50 anos, neste caso a mamografia, tem impacto no desenvolvimento de cancro? Será que os homens têm um desenvolvimento de cancro mais tardio e, por isso, não cumprem os critérios para teste genético? Na literatura, não existem ainda dados sobre estas questões. Seria interessante esclarecer a incidência destas mutações e o género e esclarecer se a realização mais tardia de um primeiro exame de diagnóstico diminui o risco de desenvolvimento de cancro.

O cálculo da dose efetiva cumulativa a que os indivíduos do estudo já teriam sido expostos foi uma aproximação e, por isso, pode não corresponder à realidade. Este cálculo teve por base a informação referida pelos indivíduos, que poderão não ter mencionado todos os exames de diagnóstico realizados. O cálculo da dose também é influenciado pelo equipamento e protocolo utilizado, informações essas a que não conseguimos ter acesso. Contudo, enquanto outros estudos se limitaram ao número de exames de mamografia e de radiografia a que os indivíduos são submetidos, o nosso trabalho incluiu também outros exames de imagiologia médica, como é o caso da TC e da PET/TC, fazendo uma estimativa mais real da dose efetiva cumulativa.(37) No nosso estudo não se conseguiu encontrar correlação positiva entre a exposição a exames de diagnóstico com radiação ionizante em indivíduos portadores de mutação e o aumento do risco de desenvolvimento de cancro.

Neste trabalho, para uma melhor aproximação à realidade, submeteram-se inicialmente amostras de sangue de portadores da mutação a doses de radiação correspondentes a uma mamografia com duas incidências. No caso dos indivíduos masculinos, apesar da radiografia torácica ser o exame de diagnóstico mais realizado, devido a limitações logísticas e ao reduzido número de indivíduos masculinos no estudo, optou-se apenas por submeter as amostras às doses da mamografia. A irradiação das amostras foi realizada apenas uma vez. Como a mamografia é um exame que emprega uma dose de radiação relativamente baixa, resolveu-se, numa segunda fase, submeterem-se as amostras a uma TC lombar com uma dose efetiva de 18,23 mSv, para se perceber melhor o que acontece quando a dose efetiva é superior.

Decidiu-se irradiar o sangue total para se reproduzirem os efeitos da radiação ionizante na corrente sanguínea. Quando um indivíduo realiza um exame de diagnóstico, todos os elementos da corrente sanguínea são expostos a essa radiação, havendo interação entre eles.(46) No nosso estudo, usou-se sangue total para as irradiações, mas fizeram-se culturas celulares para o ensaio do FMCA e para o ensaio de micronúcleos. O uso de sangue periférico no estudo implicou a necessidade de realizar todos os ensaios durante um curto período de tempo, imediatamente após a irradiação da amostra (máximo 72h), em que se considerou que o sangue manteria as suas propriedades.

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio FMCA. O FMCA é um procedimento não clonogénico que é usado para avaliar a citostase e a citotoxicidade de diferentes compostos *in vitro* através da densidade de células vivas. O FMCA mede a atividade das esterasas das células com membrana plasmática intacta, através da medição da fluorescência gerada pela sonda FDA quando é hidrolisada.(44)

Um dos problemas que tem vindo a ser descrito na literatura com a sonda FDA, é a sua hidrolisação para um composto fluorescente na presença de algumas soluções, mesmo na ausência de células vivas. Uma das soluções capaz de hidrolisar a sonda é o PBS, utilizado durante o protocolo de isolamento. De facto, o isolamento das PBMC termina com a lavagem do *pellet* com PBS, que se não for bem removido, pode interferir

com a fluorescência lida no final do ensaio. (55) Também o próprio isolamento pode interferir com os resultados obtidos neste ensaio, visto que está muito dependente da manipulação da amostra, da temperatura ótima de atuação do Ficoll-Paque™ e da qualidade da amostra. (56) Assim, se isolado um menor número de PBMC por causa de uma das questões acima descritas, o valor da viabilidade vai ser comprometido.

Relativamente aos resultados do FMCA, verificámos que as amostras submetidas à dose de radiação correspondentes a uma mamografia de duas incidências têm uma grande variabilidade de resultados tanto 24h, como 72h, após irradiação, quando comparadas com as amostras dos indivíduos que tinham sido submetidos a TC. Afastámos desde logo a hipótese de que a pequena variabilidade dos resultados das amostras sujeitas à dose correspondente a uma TC lombar se pudesse dever ao ensaio do FMCA se ter realizado no mesmo dia, uma vez que as amostras foram colhidas em semanas diferentes. Apesar disto, a mediana dos resultados foi muito próxima de 100%, não se tendo verificado diferença com significado estatístico entre grupos (portadores e não portadores), entre doses (de mamografia e de TC lombar), ou entre tempos (24h e 72h). Contudo, quando realizada a análise de subgrupos depois das 72h, foi possível encontrar diferenças com significado estatístico nos resultados da viabilidade celular nos dois subgrupos em que as amostras que tinham sido submetidas à dose de mamografia: em indivíduos portadores que ingeriam uma maior quantidade de água ao longo do dia e em indivíduos não portadores com antecedentes cardiovasculares. A ingestão de água tem inúmeros benefícios para o corpo humano, contribuindo para a regulação da homeostasia.(57) Desta forma, poderá também exercer um papel potenciador da sobrevivência das células face a agentes agressores, como por exemplo a exposição a radiação ionizante. Pode ser colocada outra hipótese como o facto de uma maior ingestão de água, significar uma maior diurese, e como tal maior eliminação de espécies radiculares por via urinária. O aumento da viabilidade celular em não portadores com antecedentes cardiovasculares é um resultado inesperado, porque seria expectável que estes indivíduos tivessem uma maior senescência celular. Apesar de não terem sido encontrados dados na literatura que suportem os nossos achados, poder-se-á questionar se o ambiente inflamatório associado à patologia cardiovascular

(58) pode condicionar mutações celulares com maior resistência de sobrevivência em ambientes inóspitos. No entanto, dado o pequeno número de doentes em cada grupo, serão necessários estudos com amostras maiores que comprovem os resultados.

Na avaliação dos resultados de viabilidade é necessário ter em conta que, tal como Ancel e Vitemberger postularam, que os efeitos da radiação não são imediatos, existindo um tempo de latência que varia consoante o tipo de radiação e as condições e tipo de células irradiadas. (20,21) Assim, apesar de os resultados do ensaio do FMCA às 24h e às 72h, nos fazerem acreditar que não existia diminuição de viabilidade depois da exposição a estas doses de radiação (TC e mamografia), não podemos excluir que o momento da realização do ensaio possa ter sido muito precoce e ainda não serem observáveis esses efeitos.

A concentração das espécies reativas de oxigénio determina a sua ação a nível celular. Quando presentes em baixas concentração estimulam a proliferação e a diferenciação celulares, ao passo que quando as ROS se encontram em elevadas concentrações, sem o equilíbrio das defesas antioxidantes, ocorre uma situação de stresse oxidativo. Nestas circunstâncias, os principais alvos das ROS são o ADN, o ARN, as proteínas e os lípidos, especialmente os lípidos membranares, podendo provocar a morte celular através do dano oxidativo destas biomoléculas. Quando este dano não é reparado podem induzir doenças, nomeadamente o cancro.(49,54)

Relativamente à avaliação das espécies reativas de oxigénio nas células do sangue, os dados da literatura são escassos. Soares *et al.* otimizaram o protocolo de ROS em sangue total para a sonda de fluorescência DCF (46,55). No caso da sonda DHE e o alaranjado de mercúrio, não foi possível encontrar nenhuma referência bibliográfica da sua utilização em sangue total. Tal facto não permite garantir que o ião superóxido e que as defesas antioxidantes sejam intracelulares, pois não podemos excluir que o DHE e o alaranjado de mercúrio possam ter sido reduzidos por outros elementos constituintes do sangue total, nomeadamente células, e transformados em compostos fluorescentes.

Neste estudo foi avaliada a diferença dos valores normalizados de peróxidos intracelulares entre as diferentes doses, nos diferentes grupos e nos diferentes tempos, mas apenas houve significância estatística para a dose de TC entre portadores e não portadores 2h após a irradiação. Neste caso, os valores normalizados de peróxidos intracelulares foram superiores no grupo de portadores do que no de não portadores. Este resultado poderia ir de encontro ao objetivo do trabalho, uma vez que os portadores de mutação no BRCA2 obtiveram um valor normalizado maior de espécies reativas de oxigênio. Contudo, não se sabe se as defesas antioxidantes compensaram ou não esse aumento porque não foi possível realizar esse ensaio nestas amostras, pelo que não se pode concluir se houve ou não stresse oxidativo. Assim, seria interessante realizar novamente o ensaio das defesas antioxidantes com dose de TC e aumentar o número de indivíduos portadores e não portadores, com o objetivo avaliar se a diferença significativa dos valores normalizados de peróxidos intracelulares entre os grupos se mantém.

No ensaio da avaliação da produção do radical superóxido não foram encontradas diferenças com significado estatístico nos valores normalizados do radical superóxido entre grupos (portadores e não portadores), entre doses (de mamografia e de TC lombar) ou entre tempos (2h e 4h). No entanto, foi encontrada uma diferença com significado estatístico ao comparar subgrupos, em que os valores de concentração do radical superóxido foram superiores em indivíduos não portadores com antecedentes cardiovasculares às 4h. Segundo, Ochoa *et al.*(61), as ROS têm um papel fundamental na mediação da resposta ao stresse do retículo endoplasmático nas doenças coronárias e poderá ser isso que esteja a provocar o aumento significativo das ROS.

O ensaio das defesas antioxidantes foi realizado apenas em algumas das amostras que tinham sido submetidas à dose de mamografia com duas incidências, devido à descontinuação da comercialização do alaranjado de mercúrio. Por conseguinte, só foi possível investigar a presença de diferença com significância estatística entre grupos (portadores e não portadores) e em diferentes tempos. Os resultados mostraram uma tendência de aumento da expressão da GSH em indivíduos não portadores quatro horas

após a irradiação, não tendo sido verificada qualquer correlação, nem diferenças com significado estatístico com as variáveis em estudo.

Estes resultados levaram a acreditar que a exposição à dose de radiação da mamografia não conduziu a stresse oxidativo, uma vez que nas amostras em que se pôde calcular o balanço entre as ROS e as defesas antioxidantes, os valores foram muito próximos de 1. Nos casos em que não se pode calcular, isto é, naquelas em que não foi possível realizar o ensaio das defesas antioxidantes (nas amostras que tinham sido submetidas à dose de TC lombar e nas restantes que tinham sido submetidas à dose de mamografia), verificou-se que os valores dos peróxidos intracelulares e do radical superóxido, quando normalizados à condição de controlo, dão muito próximos de 1. O facto de só ter sido possível realizar o ensaio das defesas antioxidantes num número reduzido de amostras constituiu uma das grandes limitações do nosso estudo. Por esse motivo, não podemos inferir sobre o stresse oxidativo nas amostras em questão, até porque em alguns casos pode haver aumento das ROS, mas se as defesas antioxidantes estiverem também aumentadas, não haverá stresse oxidativo. Estes resultados podem não corresponder à realidade porque a avaliação por fluorescência faz uma medição total da amostra e não célula a célula, ao contrário do que acontece na citometria de fluxo. Seria interessante, no futuro, avaliar as ROS por citometria de fluxo.

Existem muitos fatores químicos, físicos e biológicos que podem causar morte celular e existem fatores que não causam a morte celular, mas são capazes de danificar o material genético da célula, fatores que se denominam de genotóxicos. Na literatura, existem vários estudos que utilizam os micronúcleos para avaliar a genotoxicidade nas células. O micronúcleo atua como um biomarcador do dano ou da perda total do cromossoma. O ensaio de micronúcleos foi desenhado para detetar dano genotóxico através da contagem dos micronúcleos.(62) Na literatura já existem estudos, como os de Baert *et al.* e Varga *et al.*, que utilizaram o ensaio de micronúcleos para avaliar a radiosensibilidade de portadores de variantes causais dos genes *BRCA1* e *BRCA2*.(38,57)

A radiosensibilidade de uma célula é diferente consoante a fase do ciclo celular em que se encontra. Na fase G₀ do ciclo celular, o ensaio de micronúcleos começa com o sangue a ser irradiado e depois colocado em cultura com a fitohematoglutina. Na fase G₂ do ciclo celular, as células são primeiro tratadas com fitohematoglutina. Esta vai estimular a divisão dos linfócitos T levando a que tenhamos uma população de linfócitos em várias fases do ciclo celular (G₁, S, G₂ e fase M). Após 3 dias de incubação, o sangue em cultura é irradiado.(62) Baert *et al.* usaram o ensaio de micronúcleos na fase G₂ e concluíram que houve um aumento significativo de radiosensibilidade em indivíduos portadores saudáveis de mutação no gene *BRCA2* quando expostos a raios-X com a dose de 2Gy. (38) Também Varga *et al.*, utilizando o ensaio de micronúcleos, desta vez na fase G₀, encontraram um aumento de radiosensibilidade em portadores de mutações no genes *BRCA1* e *BRCA2*. (63) Contudo, no nosso trabalho deparámo-nos com o problema de não termos células suficientes com citoplasma bem definido que nos permitissem realizar a contagem dos micronúcleos.

No estudo de Goh *et al.*, os autores investigaram circunstâncias que podem comprometer a presença de citoplasma na célula. Em culturas celulares de sangue total, após a primeira fixação, a remoção do sobrenadante é difícil de realizar porque a distinção entre o *pellet* e o sobrenadante é dificultada pela hemólise dos eritrócitos. Se a remoção do sobrenadante for incompleta, estes resíduos permanecem na solução, causando ruído. Os autores reportaram também que o uso da solução de fixação de 3:1 metanol:ácido acético causou a rotura de muitas células. Outro dos problemas identificado foi a humidade das lâminas quando ocorre a coloração. Os autores verificaram que, dependendo do indivíduo, quando as lâminas entram em contacto com o Giemsa, ainda húmidas, ocorre também rotura do citoplasma.(64)

No decorrer do nosso trabalho deparou-se com alguns destes problemas, que podem justificar não se ter conseguido realizar a contagem de células binucleadas e, por consequência, dos micronúcleos. Verificou-se ainda que as células ficavam mais suscetíveis à rotura do citoplasma quando eram expostas à radiação. Em relação ao problema da humidade, esta podia ser atenuada deixando as lâminas a secar de um dia para o outro, protelando a realização da coloração para o dia seguinte à conclusão do

ensaio de micronúcleos. Obteve-se em vários casos células binucleadas com o citoplasma definido na condição de controlo, mas o mesmo não sucedia na condição irradiada. De forma a contrariar estes problemas, teria sido interessante ter-se usado o ensaio dos cromossomas dicêntricos, porque estes são também bons biomarcadores da exposição à radiação ionizante e não se teria o problema da visibilidade do citoplasma.(64)

No nosso estudo não se conseguiu encontrar relação positiva entre a exposição a exames de diagnóstico com radiação ionizante em indivíduos portadores de mutação e o aumento do risco de desenvolvimento de cancro tendo em conta a informação obtida. No ensaio do FMCA, não houve diferenças de viabilidade entre grupos (portadores e não portadores), entre doses de fontes diferentes (mamografia e TC) ou entre tempos (24h e 72h). Todavia, foram encontradas diferenças com significado estatístico para os subgrupos dos indivíduos portadores que ingeriam uma quantidade de água maior ao longo do dia e para os indivíduos não portadores com antecedentes cardiovasculares. Nos ROS, observou-se diferenças com significado estatístico quando se compararam os valores normalizados de peróxidos intracelulares do grupo de portadores e do grupo de não portadores das amostras que tinham sido sujeitas à dose de TC lombar duas horas antes. Contudo, não se observou diferença com significância estatística em mais nenhuma comparação seja, entre grupos para a dose de mamografia, entre doses ou entre tempos, não havendo qualquer diferença entre a concentração de peróxidos intracelulares e as variáveis em estudo. Relativamente, aos valores normalizados do radical superóxido foram encontradas diferenças com significado estatístico para o subgrupo não portadores com antecedentes cardiovasculares. No ensaio da GSH, não houve diferenças com significado estatístico. Em relação ao ensaio de micronúcleos, não foi possível realizar a análise pelo facto de haver um número reduzido de células com o citoplasma definido. Estes resultados contrariam os resultados esperados, nomeadamente em relação às amostras submetidas à dose de TC lombar, que foram irradiadas com uma dose elevada e, por isso, seria expectável que se observasse uma menor viabilidade e um aumento das espécies reativas de oxigénio. Tanto a viabilidade celular, como as espécies reativas de oxigénio foram normalizadas à condição de

controle de cada indivíduo. No caso do FMCA, a mediana dos resultados foi aproximadamente de 100%. Já nas ROS, as duas espécies reativas que avaliámos, o peróxido de hidrogénio e o radical superóxido, tiveram como resultado um valor normalizado de peróxidos de hidrogénio e do radical superóxido com mediana de aproximadamente 1. Os valores normalizados da defesa antioxidante, GSH, também tiveram um mediana de aproximadamente 1.

Os dados da literatura são contraditórios. Enquanto alguns estudos sugerem uma possível associação entre a radiação dos exames de diagnóstico e o aumento do risco em portadores, outros não encontraram qualquer relação. Pijpe *et al.* observaram uma relação positiva entre a realização de mamografias e o aumento de cancro da mama em portadores de variantes causais nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. (36) Da mesma forma, Gonzalez *et al.*, com um modelo baseado na radiação-indução de cancro e assumindo a hipersensibilidade à radiação do ADN em portadores e uma diminuição de 30% da mortalidade por cancro da mama devido ao rastreio, concluíram que a exposição a exames de diagnóstico só aumentaria o risco de desenvolvimento de cancro da mama se fosse realizado antes dos 35 anos.(65) O nosso estudo não suporta estas conclusões já que não foi encontrada associação entre a exposição a radiação de diagnóstico e o aumento do risco de desenvolvimento de cancro em portadores. No estudo de Giannakeas *et al.* também não foi encontrada qualquer associação entre a exposição a mamografia de portadores e o desenvolvimento de cancro da mama. Neste estudo foram avaliadas 2346 mulheres portadoras de mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e sem antecedentes de cancro da mama, que ao entrarem para o estudo esclareceram o histórico de exames de mamografia a que tinham sido previamente expostas. Estas mulheres foram seguidas durante 5,3 anos ao longo dos quais os autores foram observando o surgimento de novos cancros da mama. Após a análise estatística, os autores não encontraram qualquer relação entre a exposição a mamografia e o desenvolvimento de cancro da mama.(32)

No nosso estudo não ficou esclarecido o efeito da radiação ionizante nos portadores de mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Na realidade, não se espera que a realização isolada de uma mamografia ou de uma TC provoque muitas alterações, mas sim a dose

cumulativa ao longo dos anos. Assim, como perspectiva futura em relação ao projeto seria interessante proceder à imortalização de uma linha de linfócitos de portadores da mutação fundadora portuguesa. Essa imortalização permitiria a irradiação com múltiplas doses para avaliar os efeitos da dose cumulativa. Por outro lado, devido ao tempo de latência para o aparecimento de lesões após a irradiação, permitiria avaliar os dados em tempos mais tardios sem que os linfócitos perdessem as suas propriedades.

6. Conclusão

A radiosensibilidade em indivíduos portadores de mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, tem despoletado interesse na comunidade científica nos últimos anos. Pelo risco inerente de cancro da mama, do ovário, do pâncreas, da próstata e melanoma primário, especialmente abaixo dos 50 anos, estes indivíduos são alvo de um programa de rastreio rigoroso (3-6), que recorre a métodos auxiliares de diagnóstico que usam radiação ionizante, de forma a proceder a um diagnóstico precoce das neoplasias. Perante um diagnóstico atempado destas doenças, é muitas vezes possível proporcionar um tratamento eficaz destas patologias que, quando diagnosticadas em fases tardias, são apenas alvo de terapêuticas paliativas. (5,8,9)

Apesar do benefício indiscutível dos métodos de rastreio que usam radiação ionizante, existem algumas questões quanto ao risco do seu uso, nomeadamente em pessoas com suscetibilidade genética para o desenvolvimento de neoplasias. (30)

Nesse seguimento, o objetivo neste trabalho passava pelo estudo da radiosensibilidade de portadores e não portadores destas mutações quando são submetidos a exames de diagnóstico que utilizam radiação ionizante.

No presente trabalho e tendo em conta as condições estudadas não conseguimos provar que existe um aumento da radiosensibilidade de portadores de mutação no gene *BRCA2*. No entanto, com algumas alterações do protocolo do trabalho sugeridas anteriormente, os resultados poderão ser diferentes, nomeadamente em relação ao estudo do efeito da dose cumulativa, como é o caso da possível imortalização de uma linha de linfócitos com origem em portadores da mutação fundadora portuguesa.

Apesar de os nossos resultados não serem a favor da radiosensibilidade aumentada nos portadores de mutação *BRCA2*, devem ser feitos mais estudos, idealmente com amostras maiores, de forma a confirmar os nossos resultados.

7. Referências

1. Nielsen FC, van Overeem Hansen T, Sørensen CS. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. *Nature Reviews Cancer*. 2016 Sep 12;16(9):599–612.
2. Hino O, Kobayashi T. Mourning Dr. Alfred G. Knudson: the two-hit hypothesis, tumor suppressor genes, and the tuberous sclerosis complex. *Cancer Science*. 2017 Jan;108(1):5–11.
3. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature Reviews Cancer*. 2012 Jan 23;12(1):68–78.
4. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;151:1–32.
5. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *GeneReviews*®. 1993.
6. Yoshida R. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): review of its molecular characteristics, screening, treatment, and prognosis. *Breast Cancer*. 2020 Aug 29;
7. King M-C. Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*. 2003 Oct 24;302(5645):643–6.
8. Guia de Orientação Terapêutica Cancro Hereditário. Instituto Português de Oncologia do Porto. 2018;
9. 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. *Frontiers in Genetics*. 2016;7(71).
10. What is genetic testing? [Internet]. Medline Plus. 2021 [cited 2021 Jul 29]. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/testing/genetic-testing>

11. Pinto P, Paulo P, Santos C, Rocha P, Pinto C, Veiga I, et al. Implementation of next-generation sequencing for molecular diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer highlights its genetic heterogeneity. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2016 Sep 23;159(2):245–56.
12. 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. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2021 Jan 6;19(1).
13. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science*. 2004 Nov;95(11):866–71.
14. National BRCA1 DNA repair associated [Homo sapiens (human)] [Internet]. National Center for Biotechnology Information. 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672>
15. Filippini SE, Vega A. Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. *Frontiers in Bioscience*. 2013;18(4):1358.
16. Gorodetska I, Kozeretska I, Dubrovskaya A. BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. *Journal of Cancer*. 2019;10(9):2109–27.
17. BRCA2 DNA repair associated [Homo sapiens (human)]. National Center for Biotechnology Information. 2021.
18. Beyzadeoglu M, Ozyigit G, Ebruli C. Radiation Physics. In: Beyzadeoglu M, Ozyigit G, Ebruli C, editors. *Basic radiation oncology*. First Edit. Heidelberg: Springer; 2010. p. 1–5.
19. Minimum Essential Syllabus for Radiobiology. In: *Radiation biology: A Handbook for Teachers and Students*. First Edit. Viena: International Atomic Energy Agency; 2010. p. 13–29.

20. Wouters BG, Begg AC. Irradiation-induced damage and the DNA damage response. In: Joiner M, Kogel A van der, editors. *Basic Clinical Radiobiology*. Fourth Edi. Great Britain: Edward Arnorld; 2009. p. 11–25.
21. Forshier S. Radiobiology History. In: Forshier S, editor. *Essentials of Radiation Biology and Protection*. Second Edi. New York: Delmar; 2009. p. 3–9.
22. Kelsey CA, Heintz PH, Sandoval DJ, Chambers GD, Adolphi NL, Paffett KS, editors. Radiation Damage and Repair of Cells. In: *Radation Biology of Medical Imaging*. First Edit. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2014. p. 125–44.
23. Kelsey CA, Heintz PH, Sandoval DJ, Chambers GD, Adolphi NL, Paffett KS, editors. DNA and Genetics. In: *Radation Biology of Medical Imaging*. First Edit. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2014. p. 105–24.
24. Scully R, Panday A, Elango R, Willis NA. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019 Nov 1;20(11):698–714.
25. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2017 Aug 17;18(8):495–506.
26. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2017 Jun;58(5):235–63.
27. Wright WD, Shah SS, Heyer W-D. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*. 2018 Jul;293(27):10524–35.
28. Kelsey CA, Heintz PH, Sandoval DJ, Chambers GD, Adolphi NL, Paffett KS, editors. Radiation Biology of Diagnostic Imaging. In: *Radiation Biology of Medical Imaging*. First Edit. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2014. p. 213–8.

29. Liga Portuguesa Contra o Cancro [Internet]. Programa de Rastreio de Cancro da Mama. 2021 [cited 2021 Jul 24]. Available from:
<https://www.ligacontracancro.pt/servicos/detalhe/url/programa-de-rastreio-de-cancro-da-mama/>
30. 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. Vol. 41, *Cancer Treatment Reviews*. W.B. Saunders Ltd; 2015. p. 187–96.
31. Narod SA, Lubinski J, Gadirian 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. 2006; Available from:
<http://oncology.thelancet.com>
32. Giannakeas V, Lubinski J, Gronwald J, Moller P, Armel S, Lynch HT, et al. Mammography screening and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a prospective study. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2014 Aug 1;147(1):113–8.
33. 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 Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2006 Oct 20;15(11):2311–3.
34. 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 Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2013 Sep;22(9):1547–56.
35. 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. *Journal of Clinical Oncology*. 2006 Jul 20;24(21):3361–6.
36. 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(sep06 2):e5660–e5660.
 37. 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. *Oncology Reports*. 2017 Mar;37(3):1379–86.
 38. Preface, Executive Summary and Glossary. *Annals of the ICRP*. 2007 Apr 17;37(2–4).
 39. Teles P, Trincão M, Alves F, Antunes V, Calado D, Cantinho G, et al. Evaluation of the Portuguese population exposure to ionizing radiation due to x-ray and nuclear medicine procedures from 2013 to 2017. *Radiation Physics and Chemistry*. 2020 Jul;172.
 40. Santos J, Foley S, Paulo G, McEntee MF, Rainford L. The establishment of computed tomography diagnostic reference levels in Portugal. *Radiation Protection Dosimetry*. 2014 Feb 1;158(3).
 41. Shrimpton PC, Hillier MC, Lewis MA, Dunn M. National survey of doses from CT in the UK: 2003. *The British Journal of Radiology*. 2006 Dec;79(948).
 42. Larsson R, Kristensen J, Sandberg C, Nygren P. Laboratory determination of chemotherapeutic drug resistance in tumor cells from patients with leukemia, using a fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA). *International Journal of Cancer*. 1992 Jan 21;50(2).
 43. Csoka K, Larsson R, Tholander B, Gerdin E, de la Torre M, Nygren P. Cytotoxic Drug Sensitivity Testing of Tumor Cells from Patients with Ovarian Carcinoma

- Using the Fluorometric Microculture Cytotoxicity Assay (FMCA). *Gynecologic Oncology*. 1994 Aug;54(2).
44. Lindhagen E, Nygren P, Larsson R. The fluorometric microculture cytotoxicity assay. *Nature Protocols*. 2008 Aug 31;3(8).
 45. Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2005 Dec;65(2–3).
 46. Soares T, Rodrigues D, Sarraguça M, Rocha S, Lima JLFC, Ribeiro D, et al. Optimization of Experimental Settings for the Assessment of Reactive Oxygen Species Production by Human Blood. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019 Jan 10;2019.
 47. Sioen S, Cloet K, Vral A, Baeyens A. The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay on Human Isolated Fresh and Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Journal of Personalized Medicine*. 2020 Sep 14;10(3).
 48. Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Feb 24;21(4).
 49. Pires AS, Sarmiento AB, Crespo P, Botelho F. Citotoxicidade da vitamina C em células tumorais. Universidade de Coimbra; 2008.
 50. InterRad. Protocol Micronucleus Assay. 2020.
 51. IAEA. IAEA SAFETY STANDARDS AND RELATED PUBLICATIONS [Internet]. 2011. 187–191. Available from: <http://www-ns.iaea.org/standards/>
 52. Tanaka T, Halicka D, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Cytometric Analysis of DNA Damage: Phosphorylation of Histone H2AX as a Marker of DNA Double-Strand Breaks (DSBs). In 2009.

53. 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 Research and Treatment*. 2009;114(1):31–8.
54. Clarke JM, Gillings MR, Altavilla N, Beattie AJ. Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. *Journal of Microbiological Methods*. 2001;46(3):261–7.
55. Healthcare G. Ficoll-Paque PLUS Instructions.
56. Salas Salvadó J, Maraver Eizaguirre F, Rodríguez-Mañas L, Saenz de Pipaón M, Vitoria Miñana I, Moreno Aznar L. The importance of water consumption in health and disease prevention: the current situation. *Nutrición Hospitalaria*. 2020;
57. Evans PC, Rainger GE, Mason JC, Guzik TJ, Osto E, Stamataki Z, et al. Endothelial dysfunction in COVID-19: a position paper of the ESC Working Group for Atherosclerosis and Vascular Biology, and the ESC Council of Basic Cardiovascular Science. *Cardiovascular Research*. 2020 Dec 1;116(14).
58. Mittler R. ROS Are Good. *Trends in Plant Science*. 2017;22(1):11–9.
59. Soares T, Rodrigues D, Sarraguça M, Rocha S, Lima JLFC, Ribeiro D, et al. Optimization of experimental settings for the assessment of reactive oxygen species production by human blood. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019.
60. Ochoa CD, Wu RF, Terada LS. ROS signaling and ER stress in cardiovascular disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 2018 Oct;63.
61. Sadeghi F, Asgari M, Matloubi M, Ranjbar M, Karkhaneh Yousefi N, Azari T, et al. Molecular contribution of BRCA1 and BRCA2 to genome instability in breast cancer patients: Review of radiosensitivity assays. *Biological Procedures Online*. 2020;22(1):1–28.

62. Varga D, Vogel W, Bender A, Surowy H, Maier C, Kreienberg R, et al. Increased radiosensitivity as an indicator of genes conferring breast cancer susceptibility. *Strahlentherapie und Onkologie*. 2007;183(12):655–60.
63. 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. *International Journal of Radiation Biology*. 2021;97(2):194–207.
64. Oestreicher U, Endesfelder D, Gomolka M, Kesminiene A, Lang P, Lindholm C, et al. Automated scoring of dicentric chromosomes differentiates increased radiation sensitivity of young children after low dose CT exposure in vitro. *International Journal of Radiation Biology*. 2018;94(11):1017–26.
65. Berrington de Gonzalez A, Berg CD, Visvanathan K, Robson M. Estimated Risk of Radiation-Induced Breast Cancer From Mammographic Screening for Young BRCA Mutation Carriers. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2009 Feb 4;101(3):205–9.



COMISSÃO DE ÉTICA DA FMUC

Of. Refª 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 (refª 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.uc.pt | www.fmed.uc.pt

Anexo 2



SNS SERVIÇO NACIONAL
DE SAÚDE



Comissão de Ética para a Saúde

Visto/ À U.I.D.
para difusão

Exmo. Senhor
Dr. Francisco Parente
Digmº Diretor Clínico do CHUC

Parente
clínico
CHUC

SUA REFERÊNCIA	SUA COMUNICAÇÃO DE	NOSSA REFERÊNCIA	DATA
		N.º 045/CES Proc. N.º CHUC-009-20	27-02-2020

ASSUNTO: Estudo Observacional: "SENSIBILIDADE À RADIAÇÃO IONIZANTE EM PORTADORES DE VARIANTES CAUSAIS NOS GENES BRCA1/2"

Entrada na CES: 17-01-2020

Investigador/a/es: Ana Margarida Coelho Abrantes, Profª Aux. com Agregação da FMUC **Co-investigadores:** Sofia De Melo Feiteira Maia, Médica Geneticista e Profª Aux da FMUC; Lúcia de Fátima Mendes Monteiro, Mestre em Investigação Biomédica

Serviço de Realização: Serviço de Genética Médica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra; Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Cumprir informar Vossa Ex.ª que a CES - Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, reunida em 26 de fevereiro de 2020, considera que se encontram respeitados os requisitos éticos adequados à realização do estudo pelo que emite parecer favorável ao seu desenvolvimento no CHUC. No entanto, solicita-se a apresentação de um caderno de registo de dados devidamente completado.

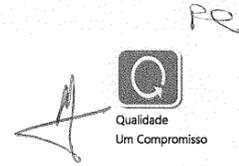
Mais se informa que a CES do CHUC deverá ser semestralmente atualizada em relação ao desenvolvimento dos estudos favoravelmente analisados e informada da data da conclusão dos mesmos, com envio de relatório final.

Com os melhores cumprimentos,

A Comissão de Ética para a Saúde do CHUC, E.P.E.

João Pedroso de Lima
Prof. Doutor João Pedroso de Lima
Presidente

CES do CHUC: Prof. Doutor João Pedroso de Lima, Prof. Doutora Margarida Silvestre, Enfª Adélio Tinoco Mendes, Dra. Cláudia Santos, Dra. Isabel Ventura, Dr. José António Feio, Rev. Pe. Doutor Nuno dos Santos, Dr. Pedro Lopes, Dra. Teresa Monteiro



Parecer Final da Comissão de Ética

Trabalho de Investigação n°: 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 J. Fragoso B.

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



IPO COIMBRA FRANCISCO GENTIL, EPE
Av. Bissaya Barreto, 98, 3000-075 Coimbra - PORTUGAL
TEL + 351 239 400 200 FAX + 351 239 484 317 EMAIL secad@ipocoimbra.min-saude.pt
www.ipocoimbra.pt



Anexo 4

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 ¹⁸ F-FDG	
	PET/CT com ¹⁸ F-NaF	
	PET/CT com ⁶⁸ Ga-Análogos da Somatostatina (⁶⁸ Ga-Dotanoc)	
	PET/CT com ⁶⁸ 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. Prática 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:
