



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Diana Almeida Figueiredo

**IMPACTO DE MUTAÇÕES NOS GENES *BRCA* NA
RESPOSTA CELULAR À RADIAÇÃO IONIZANTE**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Engenharia Biomédica, orientada pela Professora Doutora Ana Margarida Coelho Abrantes e pela Mestre Inês Alexandra Figueira Marques e apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Impacto de mutações nos genes *BRCA* na resposta celular à radiação ionizante

Diana Almeida Figueiredo

Dissertação no âmbito do Mestrado em Engenharia Biomédica, orientada pela Professora Doutora Ana Margarida Coelho Abrantes e pela Mestre Inês Alexandra Figueira Marques, apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

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.

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Diretora do Instituto de Biofísica, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço por me ter acolhido no Instituto de Biofísica, o que permitiu a concretização desta dissertação. Agradeço também todo o conhecimento transmitido e revisão deste documento.

À Professora Doutora Ana Margarida Abrantes, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Médica Interna no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e orientadora desta dissertação, pela disponibilidade, conhecimento transmitido e simpatia. Agradeço ainda a ajuda fundamental na revisão desta dissertação.

À Mestre Inês Marques, coorientadora desta dissertação, pelos ensinamentos e orientação em todas as etapas do projeto. Agradeço a disponibilidade, independentemente da hora do dia, todo o apoio, paciência, partilha de conhecimento e experiência. Obrigada por me teres ajudado a arranjar solução para qualquer problema que surgia e pelas palavras de incentivo, principalmente na reta final.

Ao Serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra agradeço a disponibilização deste serviço para irradiação das linhas celulares. Um agradecimento especial ao Eng.º Paulo César Simões pela partilha de conhecimento e ajuda no processo de irradiação.

À Professora Doutora Ana Salomé Pires, Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, por se mostrar sempre disponível em esclarecer qualquer dúvida, pela ajuda, pelos conselhos dados durante o desenvolvimento do projeto e pela simpatia.

Aos Mestres Ana Rita Gomes, Ricardo Teixeira, Beatriz Serambeque, Eurico Pereira e Catarina Ferreira, pela disponibilidade e ajuda no laboratório e, ainda, pela companhia nas horas de almoço.

À Joana e à Daniela, que me acompanharam durante estes 5 anos e que, neste último ano, se fartaram de me aturar. À Rafaela, que conheci este ano e que foi uma agradável surpresa na minha vida. Obrigada pela amizade, pelos conselhos, pelas palavras

de conforto nos momentos de maior stresse e por tornarem melhor os meus dias nos últimos meses.

A outras pessoas especiais que Coimbra me trouxe, à Diana, à Ariana, à Sara, à Bia e à Sofia. Obrigada por me fazerem sentir em casa em Coimbra, por me terem acompanhado ao longo deste percurso, por estarem lá nos bons e menos bons momentos, pela amizade e pelos momentos que guardarei sempre com muito carinho. À Joana e à Rocha, pela amizade, ajuda e preocupação. Obrigada por terem contribuído, em grande parte, para a minha integração numa cidade que não conhecia e num ambiente que não me era familiar. Foram um pilar fundamental nesta etapa da minha vida.

Às minhas melhores amigas, Catarina, Sónia, Carol e Inês, por nunca me largarem a mão, por terem sempre um ombro amigo disponível e por fazerem questão de estar sempre presentes. Obrigada por todos estes anos de amizade, apoio incondicional e conselhos que só vocês sabem dar. Aos meus amigos, Ricardo, Patrícia, Guilherme, Matilde e Gil, obrigada pela amizade, pelos momentos de descontração nos últimos meses e por todos os momentos que temos vivido.

Ao meu namorado, Ruben, agradeço todo o amor e compreensão ao longo desta fase da minha vida académica. Pela paciência que tens comigo, por acreditares nas minhas capacidades quando eu não o consigo fazer e por me tranquilizares nos momentos de maior pânico. Obrigada por estares sempre presente mesmo quando a distância se sobrepõe e por me lembrares todos os dias da sorte que tenho pelos nossos caminhos se terem cruzado.

Ao meu irmão Miguel, à minha cunhada Manuela e aos meus sobrinhos, Ruben e Simão, agradeço por estarem sempre presentes, pelo carinho, ajuda e apoio constante.

Ao meu irmão André que, tendo experienciado o mundo académico 9 anos antes de mim, me conseguiu orientar e aconselhar quando nada parecia ter solução. Por seres o meu melhor amigo, um exemplo a seguir, por me ensinares muito do que é a vida. Obrigada por vibrares com as minhas conquistas como se tuas fossem e por estares sempre disponível para mim e para as minhas preocupações.

Aos meus pais, Lúcia e Carlos, os principais responsáveis por eu ser a pessoa que sou hoje, agradeço o amor incondicional e os valores que me transmitiram. Obrigada por fazerem os possíveis e impossíveis para que esta etapa fosse concluída e para que nada me faltasse ao longo destes 23 anos. Sem vocês nada disto seria possível. Obrigada por tudo.

Resumo

A síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário (HBOC) é uma doença autossómica dominante, maioritariamente associada a mutações patogénicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, genes envolvidos na manutenção da estabilidade genómica. Os indivíduos com HBOC apresentam uma predisposição aumentada para o desenvolvimento de diferentes tipos de neoplasias, principalmente cancro da mama e do ovário. Mundialmente, o cancro da mama é a neoplasia mais frequente no sexo feminino e a segunda mais mortal entre doentes oncológicos. A radioterapia de fonte externa (EBRT) consiste numa das abordagens mais usadas no tratamento do cancro da mama. A resposta ao tratamento com EBRT pode ser influenciada por variados fatores, nomeadamente pela presença de mutações nos genes *BRCA1/2*. Para além disso, a EBRT pode induzir diversos efeitos adversos nos tecidos saudáveis circundantes, nomeadamente na pele.

O objetivo central deste projeto foi avaliar a radiosensibilidade celular associada à presença de mutações nos genes *BRCA1/2*, procurando clarificar os efeitos biológicos induzidos pela exposição à radiação ionizante, não só em doentes com cancro da mama com mutações nestes genes mas também em indivíduos saudáveis. Adicionalmente, procurou-se avaliar a radiosensibilidade associada ao tecido da pele.

Assim, neste projeto foram utilizadas duas linhas celulares humanas de cancro da mama triplo negativo, uma com mutação no gene *BRCA1* (HCC1395) e a outra sem mutação nos genes *BRCA1/2* (HCC1806), uma linha celular humana de queratinócitos da pele (HaCaT) e três linhas celulares linfoblastoides (LCLs), uma de um indivíduo portador de mutação no gene *BRCA1*, outra de um indivíduo portador de mutação no gene *BRCA2* e outra de um indivíduo não portador de mutação nos genes *BRCA1/2*. Todas as linhas celulares foram expostas a doses de raios-X (0 - 10 Gy) com energia de 6 MV. Os efeitos biológicos foram determinados através da avaliação da sobrevivência celular, da viabilidade e perfil de morte celular, do ciclo celular, da genotoxicidade e da migração celular.

Após exposição à radiação ionizante, a sobrevivência celular das linhas celulares HCC1806 e HaCaT diminuiu com o aumento da dose de exposição, realçando uma maior radiosensibilidade da linha celular de cancro da mama (HCC1806). Adicionalmente, ambas as linhas celulares registaram uma diminuição da viabilidade celular,

acompanhada por um aumento da morte celular por apoptose inicial (HCC1806 e HaCaT) e apoptose tardia/necrose (HCC1806). Mesmo sem exposição à radiação ionizante, a linha celular HCC1395 revelou uma reduzida viabilidade celular, associada maioritariamente a morte celular por apoptose inicial. Para além disso, as células HCC1395 não revelaram capacidade de formação de colónias. As LCLs também apresentaram uma reduzida viabilidade celular, o que impediu a continuidade do estudo dos efeitos induzidos pela radiação ionizante. Tanto na linha celular de cancro da mama sem mutação (HCC1806) como na linha celular HaCaT, foi observado um bloqueio do ciclo celular na fase S após exposição a doses de raios-X. Adicionalmente, foi registado um bloqueio do ciclo celular na fase G2/M na linha celular HaCaT, e um aumento do pico apoptótico na linha celular HCC1806. A exposição à radiação ionizante induziu o aumento do número de células binucleadas com micronúcleos em todas as linhas celulares. Para além disso, mesmo na ausência de irradiação, a linha celular HCC1395 demonstrou uma elevada genotoxicidade. Para todas as linhas celulares constatou-se que ocorreu uma diminuição da capacidade de migração ao longo do tempo, principalmente para doses mais elevadas. No entanto, esta diminuição não foi estatisticamente significativa para a linha celular HCC1395.

A realização deste projeto não permitiu clarificar completamente o impacto de mutações nos genes *BRCA1/2* após exposição à radiação ionizante, contudo, tendo em conta os resultados obtidos, parece haver influência da presença destas mutações mesmo quando não há exposição à radiação. Adicionalmente, denota-se uma maior radiosensibilidade das células de cancro da mama triplo negativo relativamente às células de queratinócitos da pele, o que realça o potencial terapêutico da EBRT contra o cancro da mama triplo negativo, sem afetar a pele, mais especificamente os queratinócitos.

Palavras Chave: Síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário, genes *BRCA1/2*, cancro da mama, radioterapia de fonte externa, radiação ionizante, queratinócitos da pele

Abstract

Hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC) is an autosomal dominant disease, predominantly associated with pathogenic mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes, which are involved in the maintenance of genomic stability. Individuals with HBOC have an increased predisposition to develop various types of neoplasms, primarily breast and ovarian cancers. Worldwide, breast cancer is the most common neoplasm in females and the second most deadly among cancer patients. External beam radiation therapy (EBRT) is one of the most used approaches in breast cancer treatment. The response to EBRT can be influenced by several factors, such as the presence of mutations in the *BRCA1/2* genes. Furthermore, EBRT can induce several adverse effects in surrounding healthy tissues, particularly the skin.

The main purpose of this project was to assess cellular radiosensitivity related to mutations in the *BRCA1/2* genes, aiming to clarify the biological effects induced by exposure to ionizing radiation, not only in breast cancer patients with mutations in these genes but also in healthy individuals. Additionally, the radiosensitivity in the skin tissue was also evaluated.

Thus, in this project, two human triple-negative breast cancer cell lines were used, one with a mutation in the *BRCA1* gene (HCC1395) and the other without mutations in the *BRCA1/2* genes (HCC1806), a human skin keratinocyte cell line (HaCaT) and three lymphoblastoid cell lines (LCLs), one from an individual carrying a *BRCA1* gene mutation, another from an individual with a *BRCA2* gene mutation, and another from an individual without mutations in the *BRCA1/2* genes. All cell lines were exposed to 6 MV X-ray doses (0 - 10 Gy). Biological effects were assessed by evaluating cell survival, cell viability, cell death profile, cell cycle, genotoxicity, and cell migration.

Following exposure to ionizing radiation, the cell survival of the HCC1806 and HaCaT cell lines decreased with the increase in exposure dose, highlighting a higher radiosensitivity of the breast cancer cell line (HCC1806). Additionally, both cell lines showed a decrease in cell viability, accompanied by an increase in cell death by early apoptosis (HCC1806 and HaCaT) and late apoptosis/necrosis (HCC1806). Even without exposure to ionizing radiation, the HCC1395 cell line revealed reduced cell viability, primarily associated with cell death by early apoptosis. Furthermore, HCC1395 cells did not show ability to form colonies. The LCLs also revealed reduced viability, which

blocked the continuation of the study of ionizing radiation-induced effects. In both the non-mutated breast cancer cell line and the HaCaT cell line, a cell cycle arrest in the S phase was observed after exposure to X-ray doses. Furthermore, a G2/M cell cycle arrest was recorded in the HaCaT cell line, and an increase in the apoptotic peak was observed in the HCC1806 cell line. Exposure to ionizing radiation induced an increase in the number of binucleated cells with micronuclei in all cell lines. Also, even in the absence of irradiation, the HCC1395 cell line exhibited high genotoxicity. For all cell lines, a decrease in migration ability over time was observed, especially for higher doses. However, this decrease was not statistically significant for the HCC1395 cell line.

The results obtained in this project did not allow to completely clarify the impact of mutations in the *BRCA1/2* genes after exposure to ionizing radiation, however, there appears to be an influence of the presence of these mutations even when there is no exposure to ionizing radiation. Additionally, a higher radiosensitivity is noted in triple-negative breast cancer cells compared to skin keratinocyte cells, which highlights the therapeutic potential of EBRT against triple-negative breast cancer, without affecting the skin, more specifically keratinocytes.

Keywords: Hereditary breast and ovarian cancer syndrome, *BRCA1/2* genes, breast cancer, external beam radiation therapy, ionizing radiation, skin keratinocytes

Índice

Agradecimentos	VII
Resumo	IX
Abstract.....	XI
Índice de Figuras	XV
Índice de Tabelas	XXI
Índice de Equações	XXI
Lista de abreviaturas	XXIII
Introdução.....	29
1.1. Síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário (HBOC).....	32
1.1.1. O papel dos genes BRCA na HBOC	35
1.2. Radiação Ionizante	39
1.2.1. Efeitos biológicos induzidos pela radiação ionizante.....	41
1.2.2. Danos no DNA e vias de reparação.....	42
1.2.3. Radioterapia (RT).....	45
1.3. Cancro da Mama.....	48
1.4. Impacto da radiação ionizante em portadores de mutações BRCA.....	52
Objetivos.....	55
Materiais e métodos.....	59
3.1. Cultura celular	61
3.1. Irradiação das células com raios-X.....	63
3.2. Avaliação da sobrevivência celular	65
3.3. Avaliação da viabilidade e perfil de morte celular	67
3.4. Avaliação do ciclo celular	68
3.5. Avaliação da genotoxicidade.....	69
3.6. Avaliação da migração celular	71
3.7. Análise estatística	73
Resultados.....	75
4.1. Avaliação da sobrevivência celular	77
4.2. Avaliação da viabilidade e perfil de morte celular	81
4.3. Avaliação do ciclo celular	86

4.4. Avaliação da genotoxicidade.....	90
4.5. Avaliação da migração celular	95
Discussão	103
Conclusão e perspectivas futuras	114
Bibliografia.....	119

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema representativo dos domínios funcionais das proteínas BRCA1 (em cima) e BRCA2 (em baixo). A região N-terminal da BRCA1 é composta por um domínio RING, local de ligação da BARD1. A região central inclui dois sinais de localização nuclear (NLS) e um domínio coiled-coil, responsável por mediar interações com a PALB2. A interação entre as proteínas BRCA1 e BRCA2 ocorre por intermédio da ligação da PALB2 ao este domínio. Por outro lado, a região C-terminal apresenta um domínio BRCT que atua como mediador das reações de fosforilação entre a BRCA1 e as proteínas fosforiladas pelas quinases ATM e a ATR, como a ABRAXAS e a BRIP1. Relativamente à BRCA2, a região N-terminal contém um domínio NTD para ligação de DNA e um local de ligação para a PALB2 denominado domínio TAD. A região central contém 8 repetições BRC, locais de ligação à RAD51. A extremidade C-terminal apresenta um domínio CTD, dois NLS e um domínio TR2. Este último corresponde a um local de ligação específico da RAD51. O domínio CTD, para ligação do DNA, é composto por um domínio helicoidal, 3 regiões de ligação a oligonucleótidos (OB) e um domínio T. Retirado de [27].	36
Figura 2 - Funções das proteínas BRCA1 e BRCA2 na manutenção da estabilidade genómica. De entre estas funções destacam-se a reparação de danos no DNA, tanto por HR como por NHEJ, a regulação do ciclo celular, através do controlo de checkpoints, e a regulação da transcrição. Retirado de [30].	39
Figura 3 - Relação entre os parâmetros LET, RBE e OER. Retirado de [37].	40
Figura 4 - Ação direta e indireta da radiação. Retirado de [41].	42
Figura 5 - Esquema representativo das principais vias de reparação de danos no DNA: BER, NHEJ e HR. A maioria das DSBs pode ser corretamente reparada por NHEJ ou por HR, enquanto que a principal via de reparação das SSBs corresponde à BER. Retirado de [40].	45
Figura 6 - Imagens representativas das linhas celulares utilizadas no estudo: A) Linha celular HCC1395; B) Linha celular HCC1806; C) Linha celular HaCaT.	63
Figura 7 - Acelerador linear TrueBeam® (Varian Medical Systems, EUA) utilizado para a irradiação das linhas celulares utilizadas no estudo. Na imagem à direita é possível observar o fantoma utilizado para a irradiação.	64
Figura 8 - Representação de 2 micronúcleos numa célula binucleada após bloqueio da citocinese.	70
Figura 9 - Lâminas utilizadas para o ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese. A) Suspensão celular em metanol-ácido acético (3:1) depositada em gotas ao longo de cada lâmina. B) Lâminas após coloração com Giemsa a 5% em PBS a pH 6,8.	71
Figura 10 - Exemplo do cálculo da área de uma fenda, em micrómetros ao quadrado, no ImageJ, A) realizado manualmente e B) com recurso a um plugin instalado e específico para este cálculo.	72

Figura 11 – Sobrevivência das células HCC1806. A) Curva de sobrevivência das células HCC1806 após exposição a 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 Gy de raios-X. A curva representa o fator de sobrevivência (FS) em função da dose de radiação (Gy), determinado através do ensaio de formação de colônias, segundo ajuste ao modelo linear quadrático. Os valores correspondem à média±erro padrão de 5 experiências independentes em duplicado. B) Imagens representativas das colônias formadas durante o período de incubação de 10 dias do ensaio de formação de colônias, após exposição a 0, 2 e 4 Gy de raios-X.78

Figura 12 – Sobrevivência das células HaCaT. A) Curva de sobrevivência das células HaCaT após exposição a 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 Gy de raios-X. A curva representa o fator de sobrevivência (FS) em função da dose de radiação (Gy), determinado através do ensaio de formação de colônias, segundo ajuste ao modelo linear quadrático. Os valores correspondem à média±erro padrão de 5 experiências independentes em duplicado. B) Imagens representativas das colônias formadas durante o período de incubação de 12 dias do ensaio de formação de colônias, após exposição a 0, 2, 4, 6 e 8 Gy de raios-X.79

Figura 13 - Imagens representativas do ensaio de formação de colônias com as células HCC1395, após um período de incubação de 24 dias, após exposição a doses de raios-X de A) 0 Gy e B) 2 Gy, obtidas com recurso ao microscópio ótico (ampliação 100x). ...80

Figura 14 -Viabilidade e tipos de morte celular das linhas celulares linfoblastoides (LCLs) com mutação no gene BRCA1 (LCL 105), com mutação no gene BRCA2 (LCL 109) e sem mutação nos genes BRCA1/2 (LCL 114), avaliados por citometria de fluxo através da dupla marcação anexina V/iodeto de propídeo, 10 dias após realização do procedimento de irradiação com 0 Gy (grupo controlo - Ct). Os resultados são preliminares (n=1) e estão expressos em percentagem de células em cada um dos grupos, em específico viáveis (V), apoptose inicial (A), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N).81

Figura 15 - Viabilidade e tipos de morte celular da linha celular HCC1395 avaliados por citometria de fluxo através da dupla marcação com anexina V/iodeto de propídeo, 7 dias após realização do procedimento de irradiação com 0 Gy (grupo controlo - Ct). Os resultados (média±erro padrão) estão expressos em percentagem de células em cada um dos grupos, em específico viáveis (V), apoptose inicial (A), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N), de 2 experiências independentes (n=2) em triplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p<0,05$, ** se $p<0,01$, *** se $p<0,001$ e **** se $p<0,0001$, determinadas pelo teste ANOVA de um fator com post hoc Tukey's.82

Figura 16 – Viabilidade e tipos de morte celular das células A) HCC1806 e B) HaCaT, 7 dias após exposição a 0, 2, 3, 4 ou 5 Gy de raios-X, avaliados por citometria de fluxo através da dupla marcação com anexina V/iodeto de propídeo. Os resultados (média±erro padrão) são expressos em percentagem de células em cada um dos grupos, em específico viáveis (V), apoptose inicial (A), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N), de pelo menos 3 experiências independentes ($n\geq 3$) em duplicado. As diferenças significativas

entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste ANOVA de dois fatores com post hoc Tukey's. 84

Figura 17 - Viabilidade e tipos de morte celular das células HCC1806 e HaCaT, avaliados por citometria de fluxo através da dupla marcação com anexina V/iodeto de propídeo, 7 dias após exposição a 0 Gy (Ct), 2 Gy e ao correspondente valor da DL_{50} (3 Gy para as células HCC1806 e 4 Gy para as células HaCaT). Os resultados (média±erro padrão) são expressos em percentagem de células em cada um dos grupos, em específico viáveis (V), apoptose inicial (A), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N) de pelo menos 3 experiências independentes ($n \geq 3$) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste Mann-Whitney.....85

Figura 18 – Distribuição das células A) HCC1806 e B) HaCaT pelas fases do ciclo celular, 7 dias após exposição a doses de 0, 2, 3, 4 ou 5 Gy de raios-X. O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo através da marcação com iodeto de propídeo-RNase. Os resultados (média±erro padrão) são expressos em percentagem de células identificadas em cada uma das populações (pré-G0/G1, fase G0/G1, fase S e fase G2/M) de pelo menos 3 experiências independentes ($n \geq 3$) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste ANOVA de dois fatores com post hoc Tukey's.....88

Figura 19 - Resultados da análise comparativa da distribuição das células HCC1806 e HaCaT pelas fases do ciclo celular, 7 dias após exposição a 0 Gy (Ct), 2 Gy e à dose correspondente ao DL_{50} (3 Gy para as células HCC1806 e 4 Gy para as células HaCaT). O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo através da marcação com iodeto de propídeo-RNase. Os resultados (média±erro padrão) são expressos em percentagem de células identificadas em cada uma das populações (pré-G0, fase G0/G1, fase S e fase G2/M) de pelo menos 3 experiências independentes ($n \geq 3$) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste Mann-Whitney.....90

Figura 20 – Avaliação da genotoxicidade nas células HCC1806. A) Imagens representativas da presença de micronúcleos nas células HCC1806 binucleadas. As setas a vermelho sinalizam a presença de micronúcleos. B) Quantificação de micronúcleos em 1000 células binucleadas, 5 dias após exposição a 0 Gy (Ct) e 2 Gy. Os resultados (média±erro padrão) são expressos em percentagem de células binucleadas com 1, 2 ou pelo menos 3 micronúcleos por célula binucleada. A experiência foi realizada 3 vezes ($n=3$) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas através do teste t-Student não pareado.91

Figura 21 - Avaliação da genotoxicidade na linha celular HaCaT. A) Imagens representativas da presença de micronúcleos nas células HaCaT binucleadas. As setas vermelhas sinalizam a presença de micronúcleos. B) Quantificação de micronúcleos em 1000 células binucleadas. Os resultados (média±erro padrão) são expressos em

percentagem de células binucleadas com 1, 2 ou pelo menos 3 micronúcleos por célula binucleada. A experiência foi realizada 2 vezes (n=2) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste t-Student não pareado.92

Figura 22 - Avaliação da genotoxicidade na linha celular HCC1395. A) Imagens representativas da presença de micronúcleos nas células HCC1395 binucleadas. As setas vermelhas sinalizam a presença de micronúcleos e a seta preta sinaliza uma célula em apoptose. B) Quantificação de micronúcleos em 200 células binucleadas. Os resultados (média±erro padrão) são expressos em percentagem de células binucleadas com 1, 2 ou pelo menos 3 micronúcleos por célula binucleada. A experiência foi realizada 2 vezes (n=2) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste t-Student não pareado.93

Figura 23 - Resultados da análise comparativa da genotoxicidade nas linhas celulares HCC1806, HCC1395 e HaCaT, através da quantificação de micronúcleos em células binucleadas. Os resultados são expressos em percentagem de células binucleadas com 1, 2 ou pelo menos 3 micronúcleos por célula binucleada. A experiência foi realizada pelo menos 2 vezes (n≥2) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste ANOVA de dois fatores com post hoc Tukey's.....95

Figura 24 - Validação do plugin Wound healing size tool realizada através da comparação das medições obtidas através de dois métodos distintos para o cálculo da área da fenda: delineamento manual e uso do plugin no ImageJ. Os resultados expressam a percentagem de oclusão da fenda às 4 h, às 24 h, às 48 h e 72 h em relação ao tempo 0 (momento de realização da fenda) na linha celular HaCaT, após irradiação com 0 Gy (Ct), 2 Gy, 4 Gy e 5 Gy. A experiência foi realizada em triplicado para cada condição. Não foram verificadas diferenças significativas após análise pelo teste t-Student pareado. ...96

Figura 25 – Avaliação da migração das células HCC1806 após irradiação com doses de raios-X de 0 Gy (Ct), 2 Gy, 3 Gy e 4 Gy, avaliada através do ensaio do scratch. As imagens representativas de cada condição, capturadas com recurso a um microscópio ótico invertido (ampliação 100x), imediatamente (0 horas) ou às 4, 24, 48 e 72 horas após a realização da fenda estão apresentadas. A quantificação da migração celular foi realizada através do plugin automatizado do ImageJ e os resultados são apresentados como a percentagem de oclusão da fenda às 4 h, às 24 h, às 48 h e 72 h em relação ao tempo 0 (momento de realização da fenda). A experiência foi realizada 4 vezes (n=4) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste ANOVA de dois fatores com post hoc Tukey's.98

Figura 26 – Avaliação da migração das células HaCaT após irradiação com doses de raios-X de 0 Gy (Ct), 2 Gy, 4 Gy e 5 Gy, através do ensaio do scratch. As imagens representativas de cada condição, capturadas com recurso a um microscópio ótico

invertido (ampliação 100x), imediatamente (0 horas) ou às 4, 24, 48 e 72 horas após a realização da fenda estão apresentadas. A quantificação da migração celular foi realizada através do plugin automatizado do ImageJ e os resultados são apresentados como a percentagem de oclusão da fenda às 4 h, às 24 h, às 48 h e 72 h em relação ao tempo 0 (momento de realização da fenda). A experiência foi realizada 4 vezes (n=4) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo modelo de efeitos mistos com post hoc Tukey's.99

Figura 27 - Avaliação da migração das células HCC1395 após irradiação com doses de raios-X [0 (Ct) e 2 Gy] através do ensaio do scratch. As imagens representativas de cada condição, capturadas com recurso a um microscópio ótico invertido (ampliação 100x), imediatamente (0 horas) ou às 4, 24, 48 e 72 horas após a realização da fenda estão apresentadas. A quantificação da migração celular foi realizada através do plugin automatizado do ImageJ e os resultados são apresentados como a percentagem de oclusão da fenda às 4 h, às 24 h, às 48 h e 72 h em relação ao tempo 0 (momento de realização da fenda). A experiência foi realizada 4 vezes (n=4) em duplicado. Não foram verificadas diferenças significativas após análise pelo teste t-Student não emparelhado.100

Figura 28 - Resultados da análise comparativa da avaliação da migração entre as células HCC1806, HCC1395 e HaCaT após irradiação com doses de raios-X de 0 Gy (Ct) e 2 Gy, através do ensaio do scratch. A quantificação da migração celular foi realizada através do plugin automatizado do ImageJ e os resultados são apresentados como a percentagem de oclusão da fenda às 4 h, às 24 h, às 48 h e 72 h em relação ao tempo 0 (momento de realização da fenda). A experiência foi realizada 4 vezes (n=4) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo modelo de efeitos mistos com post hoc Tukey's.101

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Tabela relativa à classificação molecular do cancro da mama e biomarcadores característicos, grau de proliferação, frequência de casos e abordagens terapêuticas associados a cada subtipo molecular. Adaptado de [69].	51
Tabela 2 - Número de células semeadas para o ensaio de formação de colónias, por poço e por linha celular após irradiação com 0 - 10 Gy de raios-X.	66
Tabela 3 – Parâmetros, doses letais médias, DL_{50} (Gy), e fator de sobrevivência a 2 Gy (FS2) obtidos através do ajuste matemático do modelo linear quadrático para as linhas celulares HCC1806 e HaCaT.	80

Índice de Equações

Equação 1 - Cálculo da eficiência de placa.	66
Equação 2 - Cálculo do fator de sobrevivência celular.	66
Equação 3 - Cálculo do fator de sobrevivência celular (FS) em função da dose absorvida (D) de acordo com o modelo linear quadrático.	67
Equação 4 – Cálculo da percentagem de oclusão da fenda ao tempo a, em que $A_{t=0}$ corresponde à área da fenda ao tempo 0, ou seja, 0 h após a realização da fenda, e $A_{t=a}$ corresponde à área da fenda ao tempo a.	73

Lista de abreviaturas

¹⁸ F	Flúor-18
¹⁷⁷ Lu	Lutécio-177
53BP1	<i>p53 binding protein</i>
γH2AX	<i>phosphorylated H2A histone family member X</i>
μg	microgramas
μL	microlitros
μm	micrómetros
ABRAXAS	<i>BRCA1 interacting complex subunit</i>
AnV	anexina V
APC	<i>allophycocyanin</i>
APE1	<i>human apurinic/aprimidinic endonuclease</i>
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>ATM</i>	<i>ataxia telangiectasia mutated gene</i>
ATM	ataxia telangiectasia mutated kinase
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3 related kinase</i>
BARD1	<i>BRCA1-associated RING domain protein 1</i>
BER	<i>base excision repair</i>
BN	binucleada(s)
<i>BRCA</i>	<i>breast cancer genes</i>
<i>BRCA1</i>	<i>breast cancer 1 gene</i>
BRCA1	<i>breast cancer 1 protein</i>
<i>BRCA2</i>	<i>breast cancer 2 gene</i>
BRCA2	<i>breast cancer 2 protein</i>
BRCT	<i>BRCA1 C terminus</i>
BRIP1	<i>BRCA1 interacting helicase 1</i>
CA-125	<i>cancer antigen 125</i>
CA 15-3	<i>cancer antigen 15-3</i>
CA 27-29	<i>cancer antigen 27-29</i>
CaCl ₂	cloreto de cálcio
<i>CDH1</i>	<i>cadherin 1 gene</i>

CDKs	<i>cyclin dependent kinases</i>
CETN2	<i>centrin 2</i>
<i>CHEK2</i>	<i>checkpoint kinase 2 gene</i>
Chk1	checkpoint kinase 1
CIP1	<i>cyclin-dependent kinase inhibitory protein-1</i>
cm	centímetros
CSA	<i>cockayne syndrome protein A</i>
CSB	<i>cockayne syndrome protein B</i>
CT	<i>computed tomography</i>
CTD	<i>C-terminal DNA-binding domain</i>
CtIP	<i>(carboxy-terminal binding protein) interacting protein</i>
<i>D-loop</i>	<i>displacement loop</i>
DL ₅₀	dose letal media
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DOTA	<i>1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetracetic acid</i>
dRP	<i>deoxyribose phosphate</i>
DSBs	<i>double strand breaks</i>
EBRT	<i>external beam radiation therapy</i>
EBV	<i>Epstein-Barr virus</i>
EP	erro padrão
ER	<i>estrogen receptors</i>
ERCC1	<i>excision repair cross complementation group 1</i>
ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FDG	<i>fluorodeoxyglucose</i>
Fe	ferro
FS	fator de sobrevivência
FS2	fator de sobrevivência celular a 2 Gy
Gd	gadolínio
GG-NER	<i>global genome nucleotide excision repair</i>
Gy	Gray

h	horas
HBOC	<i>hereditary breast and ovarian cancer syndrome</i>
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HR	homologous recombination
H2AX	<i>H2A histone family member X</i>
IC95%	intervalo de confiança de 95%
IP	iodeto de propídeo
kb	quilobase
KCl	cloreto de potássio
keV	quiloelétron-volt
LCLs	linhas celulares linfoblastoides
LET	<i>linear transfer energy</i>
LIG1	DNA ligase 1
LIG3	DNA ligase 3
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
M	molar
MDC1	<i>mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MeV	megaeletrão-volt
mL	mililitro
Mn	manganês
MMR	<i>mismatch repair</i>
mM	millimolar
MN	micronúcleos
Mre11	<i>meiotic recombination 11 protein</i>
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i>
MU	<i>monitor units</i>
MV	megavolt
NaCl	cloreto de sódio
<i>NBS1</i>	<i>Nijmegen breakage syndrome 1 mutated gene</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NER	<i>nucleotide excision repair</i>
<i>NF1</i>	<i>neurofibromin 1 gene</i>
NHEJ	<i>nonhomologous end joining</i>

NLS	<i>nuclear localization signals</i>
nm	nanómetros
NTD	<i>N-terminal DNA-binding domain</i>
OER	<i>oxygen enhancement ratio</i>
<i>PALB2</i>	<i>partner and localizer of BRCA2 gene</i>
PARP	<i>poly(ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	<i>plating efficiency</i>
PR	<i>progesterone receptor</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
POL β	<i>DNA polymerase β</i>
pRB	proteína retinoblastoma
PRRT	<i>peptide receptor radionuclide therapy</i>
<i>PTEN</i>	<i>phosphatase and tension homolog deleted on chromosome 1 gene</i>
R ²	coeficiente de determinação
RAD23B	<i>UV excision repair protein radiation sensitive 23B</i>
RAD50	<i>RAD50 double strand break repair protein</i>
RAD51	<i>RAD51 recombinase</i>
RBE	<i>relative biological effectiveness</i>
RING	<i>really interesting new gene</i>
RNA	ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Radioterapia
SCD	<i>serine cluster domain</i>
SERM	<i>selective estrogen receptor modulator</i>
SHC	síndromas hereditárias de cancro
SSBs	<i>single strand breaks</i>
<i>STK11</i>	<i>serine/threonine kinase 11 gene</i>
TAD	<i>transcriptional activation domain</i>
TATE	(Tyr ³)-octreotato
TC-NER	<i>transcription-coupled nucleotide excision repair</i>
TFIIH	<i>transcription factor IIH</i>

TN	triplo negativo
<i>TP53</i>	<i>tumor protein p53 gene</i>
XPC	human <i>xeroderma pigmentosum group C endonuclease</i>
XPG	human <i>xeroderma pigmentosum group F endonuclease</i>
XRCC1	<i>X-ray repair cross-complementing protein</i>

Introdução

O cancro pode ser considerado também uma patologia genética quando surge devido a alterações que ocorrem em genes envolvidos no ciclo celular, condicionando o crescimento e a divisão das células e, conseqüentemente, levando à carcinogénese [1].

Cerca de 10% dos cancros diagnosticados são hereditários, ou seja, estão associados a mutações que podem ser transmitidas à descendência, constituindo-se nas chamadas síndromas hereditárias de cancro (SHC), como a síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário (HBOC, do inglês *hereditary breast and ovarian cancer syndrom*) e a síndrome de Lynch. A maioria destas síndromas hereditárias de cancro são doenças autossómicas dominantes, geralmente associadas a uma penetrância incompleta, ou seja, com uma probabilidade de cerca de 50% de serem transmitidas à descendência. Os indivíduos com síndromas hereditárias de cancro apresentam uma predisposição aumentada para o desenvolvimento de diferentes tipos de neoplasias quando comparado com o risco da população em geral [2,3].

O papel dos genes supressores tumorais, como os genes *BRCA* (*breast cancer genes*), começou a ser conhecido e associado às síndromas hereditárias de cancro quando, em 1971, Knudson *et al.* [4] propuseram a hipótese conhecida como “*two-hit theory*”. Neste modelo, a perda de função do gene apenas acontece, podendo levar à carcinogénese, quando ocorrem dois eventos mutacionais, ou seja, quando ambos os alelos do gene são mutados. Cada evento mutacional pode corresponder a uma mutação germinativa (constitucional), que é herdada e que está presente em todas as células do organismo, ou a uma mutação somática (adquirida), que afeta apenas a célula mutada e que está associada, na maioria das vezes, a fatores ambientais ou endógenos. Trata-se de cancro esporádico, não hereditário, quando ocorrem duas mutações somáticas, ou seja, nenhuma mutação foi herdada nem poderá ser transmitida à descendência. Por outro lado, o cancro hereditário desenvolve-se quando o primeiro evento mutacional corresponde a uma mutação germinativa e o segundo evento corresponde a uma mutação somática. Portanto, uma vez que a mutação germinativa já está presente desde o nascimento, indivíduos com este tipo de mutação apresentam uma maior predisposição para o desenvolvimento de cancro, uma vez que apenas é necessária uma mutação somática [3].

1.1. Síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário (HBOC)

De um modo geral, deve-se suspeitar de síndromas hereditárias de cancro quando se verifica, pelo menos, uma destas situações: diagnóstico de cancro em idades mais precoces do que o considerado normal na população em geral; diagnóstico de múltiplos tumores malignos primários num só indivíduo; tumores malignos bilaterais em órgãos pares, como os rins ou a mama; dois ou mais familiares diagnosticados com o mesmo tipo de neoplasia ou uma síndrome hereditária de cancro conhecida; cancro diagnosticado no sexo oposto ao esperado, como é o caso da ocorrência do cancro da mama no homem; presença de certos traços genéticos, como anomalias congénitas e esqueléticas, associadas a uma síndrome hereditária de cancro; pertencer a um grupo étnico associado a uma determinada síndrome hereditária de cancro [2,5].

A síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário está maioritariamente associada a mutações patogénicas nos genes supressores tumorais *BRCA1* (*breast cancer 1 gene*) ou *BRCA2* (*breast cancer 2 gene*), sendo que cerca de 1 em cada 300 indivíduos apresenta uma mutação nestes genes [6]. No entanto, a HBOC pode também ser associada a mutações em outros genes de elevada penetrância, como o *CDH1* (*cadherin 1 gene*), o *PTEN* (*phosphatase and tension homolog deleted on chromosome 1 gene*), o *STK11* (*serine/threonine kinase 11 gene*), o *TP53* (*tumor protein p53 gene*) e o *PALB2* (*partner and localizer of BRCA2 gene*), e de penetrância moderada, como o *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated gene*), o *CHEK2* (*checkpoint kinase 2*) e o *NF1* (*neurofibromin 1 gene*). A penetrância de um gene traduz a relação entre o número de indivíduos portadores de mutação nesse gene que apresentam o fenótipo e o número de indivíduos que apresentam o genótipo. Por exemplo, neste caso em particular, diz-se que os genes *BRCA* são genes de elevada penetrância, uma vez que uma grande percentagem de indivíduos com mutações nestes genes desenvolve cancro. Indivíduos com síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário apresentam uma predisposição aumentada para o desenvolvimento não só de cancro da mama e do ovário, mas também de outros tipos de tumores malignos, incluindo melanoma, cancro do pâncreas e cancro da próstata [7,8]. Na verdade, ao longo da sua vida, as mulheres com mutação nos genes *BRCA1* apresentam um risco entre 70 e 80% de virem a desenvolver cancro da mama e de 50% de probabilidade de desenvolverem cancro do ovário. Por outro lado, mulheres com

mutação *BRCA2* apresentam um risco de 50 a 60% no caso de cancro da mama e de 30% de desenvolverem cancro do ovário [9].

A história clínica familiar desempenha um papel fundamental na identificação de indivíduos com síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário. Na fase inicial de vigilância clínica, aconselhamento e diagnóstico/caracterização genética, o médico especialista em Medicina Geral e Familiar exerce um papel crucial. De acordo com as recomendações da ESMO (*European Society for Medical Oncology*), a suspeita da presença da HBOC deve basear-se nos critérios definidos previamente para o diagnóstico de síndrome hereditária de cancro, tendo em conta o caso específico daquela síndrome. Deve ter-se particular atenção quando se observa pelo menos uma das seguintes situações: casos de cancro da mama e/ou cancro do ovário diagnosticados em membros da família; membros da família diagnosticados com HBOC; pertencer ao sexo masculino e ter ocorrido diagnóstico de cancro da mama; ser descendente de uma população com elevada incidência de mutações fundadoras, como é o caso dos Judeus Ashkenazy ou o caso da mutação fundadora portuguesa [10–12]. Após confirmação da situação que determina um aumento da probabilidade de vir a desenvolver cancro, a etapa seguinte baseia-se no encaminhamento para consulta de aconselhamento genético e realização de testes genéticos [10].

O objetivo do aconselhamento genético é alertar e instruir acerca do cancro hereditário e risco pessoal de desenvolvimento de cancro, para além de informar as várias opções relativas ao rastreio e possibilidades para redução deste risco. Um teste genético com resultado positivo confirma o diagnóstico de síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário e, portanto, os membros da família devem também ser testados para a mutação específica que foi identificada [10].

A redução do risco de desenvolvimento de cancro, principalmente, de cancro da mama e cancro do ovário em portadores de mutações *BRCA* assenta em três vertentes: na vigilância médica/rastreio, na quimioprevenção e na cirurgia profilática para redução de risco [8,13].

No que diz respeito à vigilância médica para deteção precoce do cancro da mama nos portadores de mutação *BRCA*, segundo a NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*), deve ser realizada a partir dos 25 anos. Entre os 25 e os 30 anos, a mamografia deve ser evitada, uma vez que a exposição a radiação ionizante pode aumentar o risco de cancro devido à elevada densidade mamária nestes indivíduos. Assim, nesta faixa etária,

a abordagem a adotar deve ser a realização anual de ressonância magnética mamária. A partir dos 30 anos, é recomendada a realização anual de uma mamografia e de uma ressonância magnética mamária, com um intervalo de 6 meses entre os dois exames médicos [8,13,14]. A vigilância médica para detecção do cancro do ovário pode ser realizada através de ecografia transvaginal ou da avaliação do marcador tumoral CA-125 (*cancer antigen 125*) a cada 6 meses, apesar de existirem dados que comprovam a baixa sensibilidade e eficácia destes métodos para diagnóstico [13,15].

A quimioprevenção consiste no uso de fármacos que bloqueiam a etapa inicial da carcinogénese ou a etapa em que ocorre a proliferação das células que levam ao desenvolvimento do tumor maligno, podendo representar uma alternativa às cirurgias de redução de risco. O ensaio clínico *Breast Cancer Prevention Trial* foi o primeiro a ter resultados positivos recorrendo à quimioprevenção com o agente tamoxifeno, um modulador seletivo do recetor de estrogénio (SERM, do inglês *selective estrogen receptor modulator*). Este ensaio, que incluiu 413 000 mulheres com elevada predisposição para desenvolvimento de cancro da mama, mostrou que a toma deste fármaco durante 5 anos permitiu reduzir o risco de cancro em aproximadamente 50% [16]. No entanto, Fisher *et al.* (1998) [17] concluíram que a administração de tamoxifeno pode aumentar o risco de incidência de cancro do endométrio [16]. Outros estudos realizados permitiram comprovar a eficácia de outros agentes de quimioprevenção, como o raloxifeno, que é também um SERM, e o exemestano, um inibidor da aromatase [6,16,18,19].

A cirurgia profilática para redução de risco de cancro da mama, em portadores de mutações nos genes *BRCAl/2*, é a mastectomia para redução de risco. Esta abordagem de prevenção diminui em 90% o risco de desenvolvimento de cancro da mama. No entanto, devido a questões como a aparência, a sexualidade ou a amamentação, muitas mulheres não consideram a abordagem cirúrgica como uma opção [13,20]. Quando se trata da detecção precoce do cancro do ovário, para portadores de mutações nos genes *BRCAl/2*, a cirurgia profilática para redução do risco consiste na salpingooforectomia, sendo recomendada para mulheres com idade entre os 35 e os 40 anos [13].

1.1.1. O papel dos genes *BRCA* na HBOC

Como já mencionado anteriormente, a maioria dos casos de síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário estão associados a mutações patogénicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Desde que foram descobertos, foram identificadas mais de 2000 mutações diferentes nos genes *BRCA* [11]. As mutações podem ocorrer em qualquer região ao longo do gene, sendo que a maioria corresponde a mutações *frameshift*, *nonsense*, deleções ou duplicações [10].

Em 1990, surgiram as primeiras evidências de que a predisposição de certas famílias para o desenvolvimento de cancro da mama estava associada ao braço longo do cromossoma 17 na posição 21 (17q21), sendo que muitos tumores malignos hereditários da mama e do ovário revelavam uma perda de heterozigosidade (LOH, do inglês *loss of heterozygosity*) neste cromossoma, ou seja, ambos os alelos apresentam mutação [21]. De facto, mais tarde, em 1994, o gene *BRCA1* foi clonado e associado ao cromossoma 17q21.31, ou seja, à região 21.31 do braço longo do cromossoma 17 [22,23]. Posteriormente, Wooster *et al.* [24] conseguiram identificar o gene *BRCA2* e associá-lo à região 12.3 do braço longo do cromossoma 13 (13q12.3) através de um estudo que envolvia famílias cujos membros tinham sido diagnosticados com cancro da mama, mas que, no entanto, não apresentavam mutação no gene *BRCA1* [7,25].

O gene *BRCA1* contém 22 exões codificantes distribuídos por 100 kb de DNA e a proteína que este codifica, proteína BRCA1, é composta por 1863 aminoácidos. Por outro lado, o gene *BRCA2* contém 27 exões e a proteína BRCA2 tem 3418 aminoácidos na sua composição [7,21]. As proteínas BRCA apresentam 3 domínios principais: a região N-terminal, a região central e a região C-terminal. A região N-terminal da proteína BRCA1 (Figura 1) é composta por um domínio denominado RING (*really interesting new gene*), local de ligação da proteína BARD1 (*BRCA1-associated RING domain protein 1*). A região central representa cerca de 65% da sequência proteica e apresenta dois sinais de localização nuclear (NLS, do inglês *nuclear localization signals*) e locais de ligação de várias proteínas, como a proteína retinoblastoma (pRB) e a RAD51 (*RAD51 recombinase*). A região central apresenta ainda um domínio *coiled-coil* na sua composição, o qual é responsável por mediar as interações com a PALB2, e uma porção do domínio SCD (*serine cluster domain*) que é fosforilado pelas quinases ATM e ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*), que são ativadas quando ocorre dano no DNA.

Introdução

A interação entre as proteínas BRCA1 e BRCA2 ocorre por intermédio da ligação da PALB2 ao domínio *coiled-coil* da BRCA1. O terminal carboxilo apresenta um domínio denominado BRCT (*BRCA1 C terminus*). Este domínio é responsável por mediar as reações de fosforilação entre a BRCA1 e as proteínas fosforiladas pelas quinases ATM e a ATR, como a ABRAXAS (*BRCA1 interacting complex subunit*) e a BRIP1 (*BRCA1 interacting helicase 1*) [7,9]. A maioria das mutações BRCA1 ocorrem no domínio RING da região N-terminal, nos exões 11-13 e no domínio BRCT da região C-terminal [9,26].

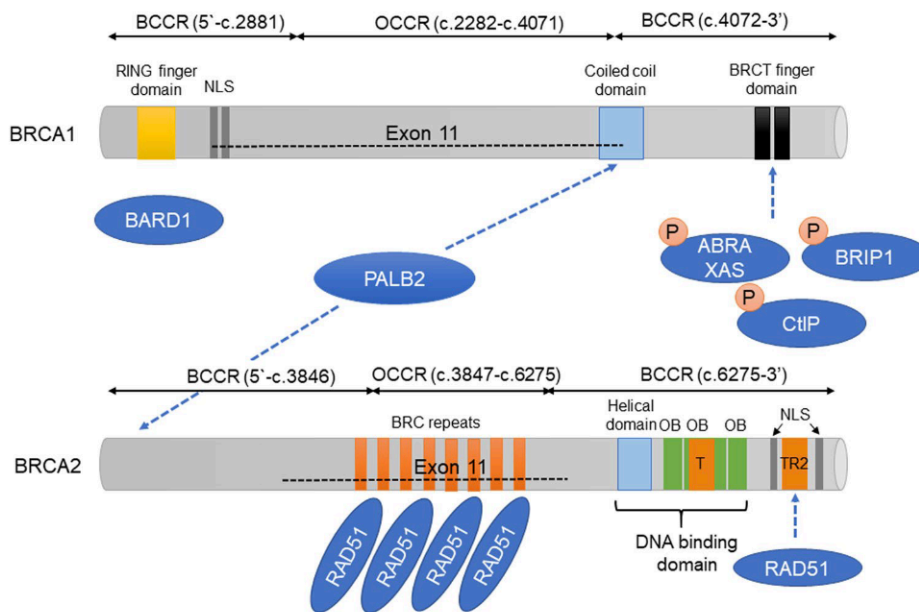


Figura 1 - Esquema representativo dos domínios funcionais das proteínas BRCA1 (em cima) e BRCA2 (em baixo). A região N-terminal da BRCA1 é composta por um domínio RING, local de ligação da BARD1. A região central inclui dois sinais de localização nuclear (NLS) e um domínio coiled-coil, responsável por mediar interações com a PALB2. A interação entre as proteínas BRCA1 e BRCA2 ocorre por intermédio da ligação da PALB2 ao este domínio. Por outro lado, a região C-terminal apresenta um domínio BRCT que atua como mediador das reações de fosforilação entre a BRCA1 e as proteínas fosforiladas pelas quinases ATM e a ATR, como a ABRAXAS e a BRIP1. Relativamente à BRCA2, a região N-terminal contém um domínio NTD para ligação de DNA e um local de ligação para a PALB2 denominado domínio TAD. A região central contém 8 repetições BRC, locais de ligação à RAD51. A extremidade C-terminal apresenta um domínio CTD, dois NLS e um domínio TR2. Este último corresponde a um local de ligação específico da RAD51. O domínio CTD, para ligação do DNA, é composto por um domínio helicoidal, 3 regiões de ligação a oligonucleótidos (OB) e um domínio T. Retirado de [7].

Relativamente à proteína BRCA2 (Figura 1), a região N-terminal contém um domínio NTD (*N-terminal DNA-binding domain*) para ligação de DNA e um local de ligação para a PALB2 denominado domínio TAD (*transcriptional activation domain*). A região central, codificada pelo exão 11, contém 8 repetições BRC, locais de ligação à RAD51. A região C-terminal apresenta um domínio denominado CTD (*C-terminal DNA-binding domain*), dois NLS e um domínio TR2. Este último corresponde a um local de ligação específico para filamentos nucleoproteicos da proteína RAD51. O domínio CTD é composto por um domínio helicoidal, 3 regiões de ligação a oligonucleótidos (OB) e um domínio T (*tower domain*) [7,26,27].

Os genes *BRCA1/2* são supressores tumorais envolvidos na manutenção da estabilidade genómica. Para além de serem responsáveis pela reparação de danos de cadeia dupla do DNA (DSBs, do inglês *double strand breaks*) através de recombinação homóloga (HR, do inglês *homologous recombination*), estão envolvidos no controlo da dinâmica do centróssoma, da segregação cromossómica e da citocinese. O gene *BRCA1* desempenha também funções relacionadas com o desenvolvimento embrionário, a replicação do centróssoma e o tamanho do cérebro [7,26]. Para além disso, pode considerar-se que os genes *BRCA1* e *BRCA2* estão parcialmente relacionados com a reparação de quebras de cadeia simples do DNA (SSBs, do inglês *single strand breaks*) na presença de inibidores da PARP (*poly(ADP-ribose) polymerase*). A PARP é uma enzima nuclear envolvida na reparação de SSBs por excisão de bases (BER, do inglês *base excision repair*). Deste modo, na presença de inibidores desta enzima, as SSBs não conseguem ser reparadas pela via BER. No entanto, a lesão poderá ser corrigida por meio de uma via alternativa, a HR, na qual os genes *BRCA* desempenham um papel crucial [28].

As proteínas BRCA também desempenham importantes funções (Figura 2) que permitem a manutenção da estabilidade genómica na célula, nomeadamente a reparação de lesões no DNA, a regulação do ciclo celular e a regulação da transcrição [29].

No que diz respeito à reparação de lesões no DNA, ambas as proteínas participam na regulação da via de reparação por HR. Durante este processo, a proteína BRCA1 recruta a BRCA2 para a região onde ocorreu a DSB. Por sua vez, a BRCA2 irá auxiliar no recrutamento da proteína RAD51. Para além disso, na via de reparação por ligação das extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês *nonhomologous end joining*), a interação

da proteína BRCA1 com o fator Ku80 estabiliza o heterodímero Ku70/Ku80 na região da DSB [29].

Sabe-se ainda que a proteína BRCA1 atua na regulação do ciclo celular. De facto, a BRCA1 fica na forma hiperfosforilada no final da fase G1 e no início da fase S do ciclo celular, sendo desfosforilada pouco depois da entrada na fase M. Em resposta a danos no DNA, a BRCA1 é fosforilada por quinases, como a ATM, a ATR e a Chk1 (*checkpoint kinase 1*), no checkpoint G2/M, impedindo a reparação do DNA antes da entrada na fase M. Adicionalmente, a proteína BRCA1 também impede a progressão do ciclo celular na transição G1/S ao recrutar a proteína CIP1 (*cyclin-dependent kinase inhibitory protein-1*), um inibidor das quinases dependentes de ciclinas (CDKs, do inglês cyclin dependent kinase). Este impedimento na progressão no ciclo celular está ainda dependente da interação entre a proteína BRCA1 e a pRb na forma hipofosforilada. Para além disso, interage com a proteína MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) que, por sua vez, irá ligar-se à histona H2AX fosforilada, γ H2AX, procedendo ao seu reconhecimento. Por fim, a histona γ H2AX recruta proteínas de reparação, como a 53BP1 (*p53 binding protein 1*), para a região das DSBs [29].

Com base nas funções das proteínas BRCA mencionadas anteriormente, fica claro que mutações nos genes que codificam estas proteínas podem facilmente levar ao processo de carcinogénese. Para além disso, a análise das mutações *BRCA* em doentes oncológicos é altamente relevante, uma vez que estas mutações poderão influenciar a resposta à terapêutica e, conseqüentemente, afetar o prognóstico [29].

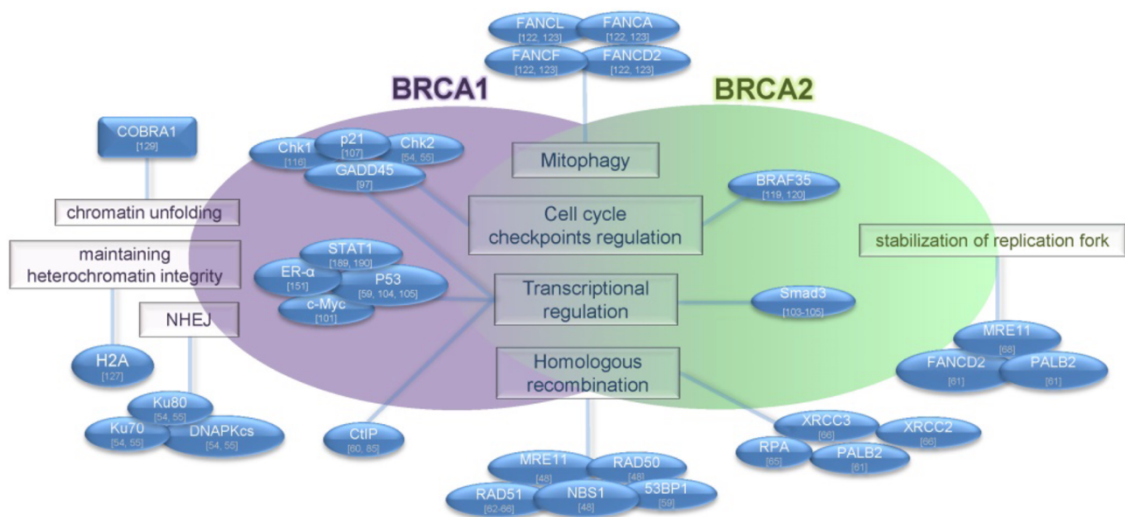


Figura 2 - Funções das proteínas BRCA1 e BRCA2 na manutenção da estabilidade genômica. De entre estas funções destacam-se a reparação de danos no DNA, tanto por HR como por NHEJ, a regulação do ciclo celular, através do controlo de checkpoints, e a regulação da transcrição. Retirado de [29].

1.2. Radiação Ionizante

A radiação corresponde à emissão ou transmissão de energia sob a forma de partículas ou ondas eletromagnéticas [30]. A radiação pode ser classificada como radiação ionizante ou não ionizante. Tal como o nome indica, a radiação ionizante é caracterizada pela sua capacidade de ionização, ou seja, a sua elevada energia permite a remoção de eletrões dos átomos ou moléculas. A radiação ionizante pode assumir a forma de radiação particulada (e.g. partículas α , partículas β , neutrões ou protões) ou de radiação eletromagnética (e.g. raios X e radiação γ) [30,31].

A radiação ionizante, ao atravessar a matéria, perde energia devido às interações que ocorrem durante o trajeto e consequente deposição de energia. A transferência linear de energia (LET, do inglês *linear energy transfer*) corresponde à energia depositada no meio por unidade de comprimento de percurso e depende do tipo de radiação e pela energia da partícula incidente e ainda da densidade do material. Os protões, os neutrões e as partículas α apresentam geralmente uma LET mais elevada do que os raios-X, a radiação γ ou as partículas β [26,32–34].

O efeito biológico da radiação pode ser avaliado através do parâmetro RBE (do inglês, *relative biological effectiveness*), que traduz a relação entre doses absorvidas de

Introdução

dois tipos de radiação distintas necessária para provocar o mesmo efeito biológico, mas também através do parâmetro OER (do inglês, *oxygen enhancement ratio*), razão entre a dose de um determinado tipo de radiação que provoca um dado efeito biológico na ausência de oxigénio (hipoxia) e a dose de radiação que provoca o mesmo efeito na presença de oxigénio. A RBE pretende avaliar efeitos biológicos agudos e de curto prazo, não conseguindo prever efeitos a longo prazo. De um modo geral, a RBE depende da LET na medida em que um aumento na LET da radiação é acompanhado por um aumento da RBE (Figura 3). No entanto, este facto só se verifica até um valor máximo da LET equivalente a 100 keV/μm. Na verdade, a partir desse valor, um aumento no valor da LET não irá contribuir para aumentar o efeito biológico, uma vez que ocorre uma deposição de energia em excesso comparada com a energia necessária para causar determinado efeito biológico, contribuindo para morte celular. No que diz respeito à OER, sabe-se que está associada à ação indireta da radiação, pelo que um valor elevado da OER está diretamente associado a um valor reduzido da LET (Figura 3). No que diz respeito à ação direta da radiação, esta não está dependente da OER [26,34–36].

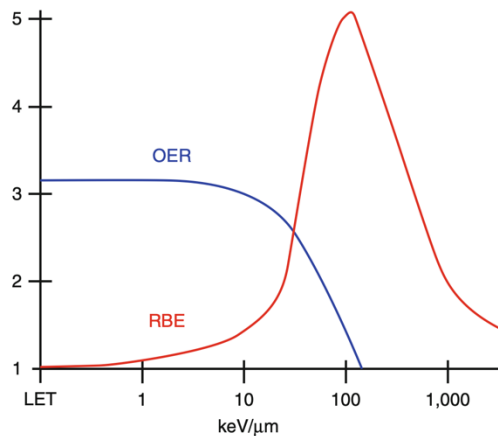


Figura 3 - Relação entre os parâmetros LET, RBE e OER. Retirado de [36].

1.2.1. Efeitos biológicos induzidos pela radiação ionizante

No contexto clínico, a radiação ionizante é usada para auxiliar no diagnóstico e em certas abordagens terapêuticas [37].

Os efeitos biológicos resultantes da exposição a radiação podem ser classificados de várias formas, nomeadamente em determinísticos e estocásticos. Os efeitos determinísticos são caracterizados por existir uma dose limiar, abaixo da qual não se verificam quaisquer alterações. Neste caso, a intensidade do efeito é diretamente proporcional à dose absorvida, no entanto, o efeito apenas é observável para doses superiores ao valor da dose limiar. Por outro lado, os efeitos estocásticos são independentes de uma dose limiar, ou seja, doses baixas também podem produzir efeito. Os efeitos estocásticos (*e.g.* carcinogénese e mutações genéticas) correspondem a efeitos crónicos e de longo prazo [30,38–40].

Para além disso, tendo por base a ação da radiação, os efeitos da radiação ionizante também podem ser classificados em efeitos diretos ou indiretos (Figura 4). A ação direta da radiação está associada a danos no DNA e noutras macromoléculas essenciais para a sobrevivência da célula, cujas alterações podem conduzir à morte celular, estando geralmente associada a radiação de alto LET, como os neutrões, os protões e as partículas α . Por outro lado, os efeitos indiretos estão associados à radiólise da água. Neste processo, a radiação atinge as moléculas de água, desencadeando a formação de espécies reativas de oxigénio. Estas espécies radicalares podem depois interagir com as moléculas de DNA e, conseqüentemente, causar lesões. Uma vez que a célula é constituída por cerca de 60% de água, pode constatar-se que a grande maioria das lesões celulares ocorridas numa célula são devidos à ação indireta da radiação, sendo geralmente desencadeadas por radiação de baixa LET (*e.g.* raios X e radiação γ) [36,40].

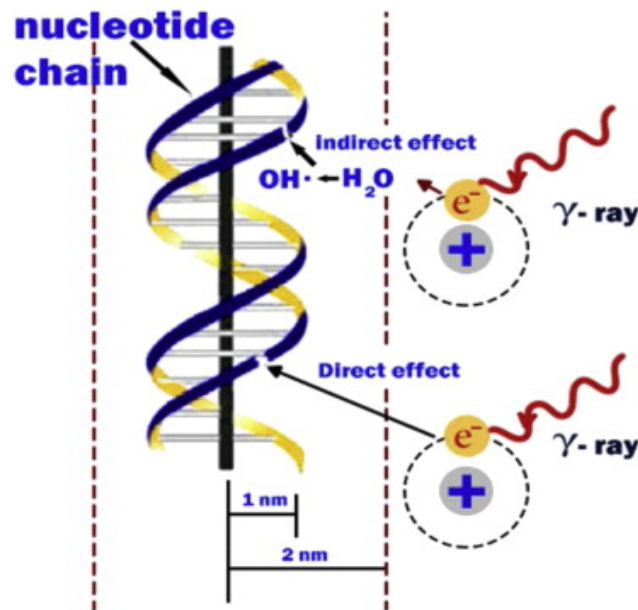


Figura 4 - Ação direta e indireta da radiação. Retirado de [40].

1.2.2. Danos no DNA e vias de reparação

Segundo o modelo linear quadrático, doses baixas de radiação dão origem, essencialmente, a quebras de cadeia simples do DNA (SSBs), enquanto doses mais elevadas levam ao desenvolvimento de quebras de cadeia dupla (DSBs) [38,39]. Na verdade, quanto maior for a LET de uma radiação, maior será a frequência e a complexidade das lesões. Para radiação de baixa LET, em média, são geradas 1000 SSBs e 40 DSBs para uma dose de 1 Gy [41]. Deste modo, uma vez que as quebras de cadeia dupla correspondem às lesões mais citotóxicas do DNA e também às mais difíceis de reparar, podendo facilmente levar a carcinogénese ou morte celular, segundo este modelo, constata-se que apenas uma dose mais elevada é capaz de provocar danos celulares irreparáveis [38].

As principais vias de reparação de danos no DNA correspondem a reparação por excisão de bases (BER), reparação por excisão de nucleótidos (NER, do inglês *nucleotide excision repair*), reparação de erros no emparelhamento de bases (MMR, do inglês *mismatch repair*), reparação por ligação das extremidades não homólogas (NHEJ) e recombinação homóloga (HR) [42].

A principal via de reparação das SSBs é a reparação por excisão de bases (Figura 5) [41]. Esta via de reparação ocorre principalmente na fase G1 do ciclo celular e inicia-se com o reconhecimento da lesão pela enzima DNA glicosilase. De seguida, a região sem base serve de substrato para a endonuclease APE1 (*human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1*), que cliva a ligação fosfodiéster 5', formando um resíduo hidroxilo na extremidade 3' e acoplando dRP (*deoxyribose phosphate*) na extremidade 5' da região clivada. Posteriormente, a dRP é removida e a região da base danificada é, posteriormente, ocupada pela POL β (*DNA polymerase β*), ocorrendo ainda ligação da DNA ligase 1 (LIG1) ou de um complexo da DNA ligase 3 (LIG3) e XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing protein 1*), de modo a reparar a lesão [41,42].

A reparação por excisão de nucleótidos (NER) permite reparar lesões mais extensas causadas pela radiação ultravioleta, danos causados por agentes quimioterapêuticos e adutos de benzo[a]pireno. Pode apresentar dois caminhos distintos que se diferenciam um do outro pelo processo de reconhecimento da lesão. Na GG-NER (*global genome nucleotide excision repair*), o complexo composto pelas proteínas XPC (*human xeroderma pigmentosum group C endonuclease*), RAD23B (*UV excision repair protein radiation sensitive 23B*) e CETN2 (*centrin 2*) procede ao reconhecimento da lesão, recrutando a helicase TFIIH (*transcription factor IIH*). Posteriormente, o complexo XPC-RAD23B-TFIIH desenrola a hélice do DNA. Por outro lado, na TC-NER (*transcription-coupled nucleotide excision repair*), o reconhecimento do dano é iniciado por uma RNA polimerase II que se encontra inativa pela lesão, levando ao recrutamento das proteínas CSA (*cockayne syndrome protein A*) e CSB (*cockayne syndrome protein B*). O complexo CSA-CSB expõe o local da lesão e é recrutada a TFIIH. Posteriormente, tanto na GG-NER como na TC-NER, a endonuclease XPG (*human xeroderma pigmentosum group G endonuclease*) e o complexo XPF (*human xeroderma pigmentosum group F endonuclease*) - ERCC1 (*excision repair cross complementation group 1*) cortam, respetivamente, a cadeia nas extremidades 3' e 5' da lesão, de modo a remover os nucleótidos danificados. Por fim, os nucleótidos em falta são sintetizados e a DNA ligase preenche a lacuna [42,43].

A via de reparação de erros no emparelhamento de bases (MMR) corresponde à principal via de reparação de nucleótidos erradamente emparelhados que surgiram durante a replicação e pequenos *loops* de inserção-deleção gerados pela DNA polimerase [42,43].

A maioria das quebras de cadeia dupla do DNA pode ser corretamente reparada pela via NHEJ ou por HR (Figura 5). O processo mais comum de reparação das DSBs é a NHEJ, no qual a DSB é reconhecida pelo heterodímero Ku70/Ku80, o qual recruta DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) e outras proteínas envolvidas na NHEJ, como as DNA polimerase, helicase e ligase. As duas extremidades quebradas do DNA ligam-se uma à outra, removendo os nucleótidos danificados ou emparelhados. A DNA-PK fosforila e recruta a endonuclease Artemis, a qual irá processar as extremidades. Ao contrário da HR, que está presente ao longo de todas as fases do ciclo celular, a NHEJ apenas atua no final da fase S e na fase G2. No processo de reparação por recombinação homóloga, dominante nas fases G1 e S do ciclo celular, após a identificação de uma DSB, o complexo Mre11 (*meiotic recombination 11 protein*) - RAD50 (*RAD50 double strand break repair protein*) - NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome 1 mutated gene*) e a proteína CtIP (*CtBP (carboxy-terminal binding protein) interacting protein*) quebram as cadeias de DNA junto à região da DSB, através da ação de nucleases, para formar uma cadeia simples de DNA. Posteriormente, dependente da presença das proteínas BRCA, esta cadeia de DNA, ligada à RAD51, irá emparelhar com DNA homólogo de cadeia dupla, que servirá como modelo para a reparação, de modo a formar uma estrutura denominada *D-loop (displacement loop)* que, após libertação da RAD51, será dissociada. Várias proteínas de reparação, como a BRCA2, a RAD51 e a PALB2, desempenham funções de elevada importância nesta via de reparação das DSBs [29,34,43,44].

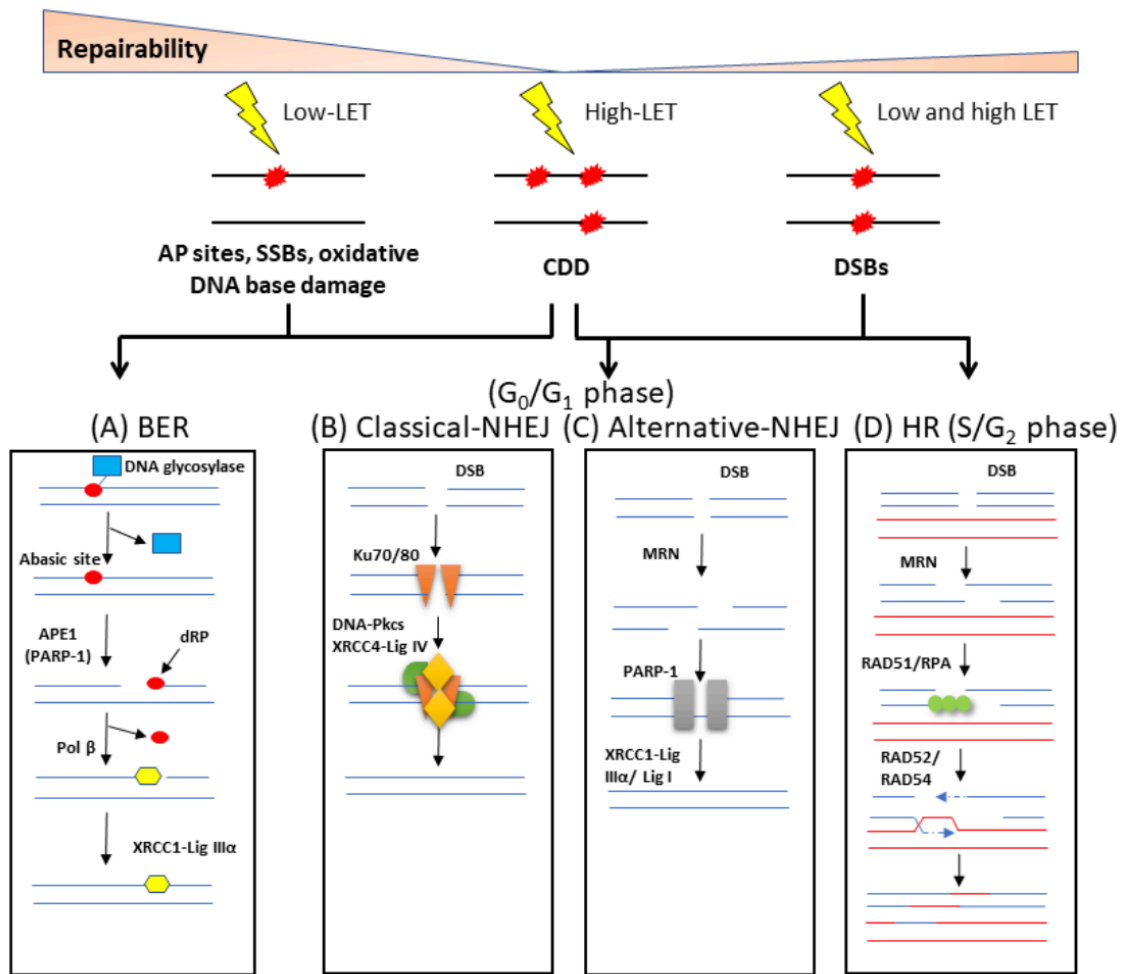


Figura 5 - Esquema representativo das principais vias de reparação de danos no DNA: BER, NHEJ e HR. A maioria das DSBs pode ser corretamente reparada por NHEJ ou por HR, enquanto que a principal via de reparação das SSBs corresponde à BER. Retirado de [40].

1.2.3. Radioterapia (RT)

A radioterapia (RT) consiste numa importante ferramenta para o tratamento do cancro, recorrendo a radiação ionizante tendo em vista a morte das células cancerígenas. Divide-se principalmente em duas modalidades distintas: a radioterapia de fonte externa (EBRT, do inglês *external beam radiation therapy*) e a braquiterapia. Tal como o nome indica, a EBRT utiliza uma fonte externa de radiação de elevada energia, podendo recorrer a fótons, prótons ou outro tipo de radiação de natureza particulada [45]. Os tratamentos com EBRT são realizados com recurso a aceleradores de partículas que emitem radiação com energia na ordem dos MeV. Por outro lado, a braquiterapia recorre

a uma fonte radioativa selada que é colocada no local ou muito próximo do tumor [36,45]. Existe ainda outra modalidade de radioterapia denominada radioterapia dirigida a recetores peptídicos (PRRT, do inglês *peptide receptor radionuclide therapy*), que consiste numa abordagem que geralmente combina um análogo da somastostatina com um radionuclídeo, sendo o mais comum o ^{177}Lu -DOTA-TATE [46]. O maior desafio da RT é expor o tecido tumoral a uma dose suficientemente elevada para provocar a morte das células tumorais, procurando minimizar possíveis danos aos tecidos não tumorais circundantes [47]. Cerca de 87% dos doentes diagnosticados com cancro da mama são tratados com EBRT como abordagem terapêutica adjuvante, verificando-se um controlo do tumor acima dos 20% e um aumento da taxa de sobrevivência a longo prazo [48].

O princípio da RT baseia-se na interação entre fotões ou partículas carregadas com os átomos constituintes do tecido irradiado [47,48]. As interações da radiação com a matéria estão diretamente dependentes da sua energia, do tipo de radiação e do meio que esse tipo de radiação atravessa [48]. As principais formas de radiação eletromagnética usada na radioterapia são os raios-X e a radiação γ , que interagem com a matéria através de três principais mecanismos: efeito de Compton, efeito fotoelétrico e produção de pares [49].

O efeito de Compton corresponde à interação mais relevante na radioterapia de megavoltagem usada tipicamente nos dias de hoje. Embora possa ocorrer para qualquer valor de energia, esta interação é mais provável para energias entre os 26 keV e 24 MeV, e consiste na colisão de um fotão com um eletrão orbital. Deste modo, parte da energia do fotão incidente é cedida ao eletrão orbital sob a forma de energia cinética, resultando na ejeção do eletrão e na mudança da trajetória do fotão incidente. O ângulo associado à mudança da trajetória depende da energia transferida para o eletrão orbital. No efeito fotoelétrico, cuja probabilidade de ocorrência é superior para baixos valores de energia do fotão incidente, o fotão é completamente absorvido e cede a sua energia a um eletrão atómico das camadas mais internas, o qual é ejetado do átomo. Adicionalmente, a probabilidade de ocorrência deste tipo de interação também depende altamente do número atómico, sendo esta dependência responsável por produzir um elevado contraste entre os tecidos moles e o osso observado nas radiografias. A ejeção do eletrão cria uma lacuna naquela camada eletrónica, ficando o átomo num estado excitado. Posteriormente, a lacuna é preenchida por um eletrão de uma camada eletrónica superior, ocorrendo libertação de energia sob a forma de um fotão (radiação característica) ou sob a forma de

um eletrão (eletrão Auger). Na produção de pares, o fóton incidente apresenta uma energia superior a 1,022 MeV, ficando sujeito ao campo elétrico do núcleo atómico quando se aproxima deste. Assim, o fóton incidente é aniquilado e o resultado desta interação é a produção de um eletrão e de um positrão, ambos com energia igual a 0,511 MeV, que são emitidos em direções opostas. A probabilidade de ocorrência desta interação é, geralmente, superior para elevados valores de energia do fóton incidente e elevado número atómico [36,48–50].

Os efeitos induzidos pela RT podem manifestar-se desde as primeiras semanas até vários anos após exposição. Os eventos de ionização e excitação desencadeados pela RT levam à quebra de ligações químicas e à formação de radicais livres, espécies altamente reativas que podem provocar lesões a nível celular, como lesões no DNA [48].

As primeiras manifestações que ocorrem após a exposição à radiação ionizante, decorrente da RT, desencadeiam-se durante as primeiras semanas ou meses e correspondem à morte das células com menor diferenciação e maior taxa de proliferação e metabolismo. Alguns exemplos desta manifestação incluem alterações da pele e danos hematopoiéticos [36]. Os efeitos mais comuns a curto prazo são, sem dúvida, a fadiga e o eritema. As manifestações a longo prazo podem incluir danos nos vasos sanguíneos e na medula óssea. Para além disso, pode ainda ocorrer o desenvolvimento de tumores malignos secundários [48,51]. A RT no controlo do cancro da mama também coloca em risco órgãos como o coração e os pulmões [51,52]. A nível pulmonar, os doentes podem desenvolver pneumonite rádica e fibrose. Pode ainda provocar pericardite, aterosclerose, isquemia miocárdica e fibrose cardíaca [51].

Entre 85% e 95% dos doentes tratados com RT apresentam danos na pele associados à exposição a radiação ionizante. A pele é constituída por células altamente proliferativas, sendo os queratinócitos das células mais radiosensíveis deste tecido. As espécies reativas de oxigénio e os radicais livres gerados sob a ação da radiação ionizante promovem a destruição de uma parte dos queratinócitos da pele, impedindo a sua divisão e migração e, conseqüentemente, a renovação do tecido [53,54]. Os efeitos na pele induzidos pela RT podem ser agudos ou crónicos, dependendo da dose de exposição e do tempo de exposição. Os efeitos agudos incluem eritema, descamação e ulceração. Ocorrem geralmente para doses cumulativas de exposição entre 2 e 40 Gy e estão associados à ação dos radicais livres, provocando lesões no DNA, em proteínas, lípidos e hidratos de carbono. Este tipo de efeito pode desencadear o recrutamento de células

inflamatórias, e apoptose e necrose das células epidérmicas. Por outro lado, os efeitos crónicos ocorrem na derme e incluem fibrose e telangiectasia, manifestações provocadas por lesões e inflamação vasculares. Os efeitos crónicos estão associados a alterações no número de células, tecido fibroso, pigmentação e vascularização. Os principais fatores associados a este tipo de dano incluem a dose total irradiada, o tamanho da área tratada, alterações no fracionamento, a presença de distúrbios na pele ou no tecido conjuntivo e fatores genéticos [36,53,54].

1.3. Cancro da Mama

Mundialmente, o cancro da mama constitui a segunda neoplasia mais frequentemente diagnosticada em ambos os sexos, a principal neoplasia diagnosticada em mulheres e a segunda mais mortal entre doentes oncológicos, sendo a primeira o cancro do pulmão [55,56]. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 2020, foram diagnosticados 2,3 milhões casos de cancro da mama entre a população feminina, tendo sido registadas 685000 mortes [11].

A grande maioria dos cancros da mama está associada a fatores ambientais ou relacionados com o estilo de vida, incluindo exposição natural a radiação ionizante, terapia hormonal, álcool, obesidade e sedentarismo [12,56]. O principal fator de risco associado ao cancro da mama é a idade, sendo que outro fator preponderante é a existência de história familiar de cancro, especialmente se se tratar de cancro da mama [56,57]. Embora a maioria dos cancros da mama diagnosticados seja de natureza esporádica, cerca de 10 a 15% estão relacionados com predisposição hereditária [20,56,58]. Aproximadamente 10% dos casos de cancro da mama estão associados a mutações em genes com elevada penetrância, como é o caso dos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *ATM*, *PTEN* e *STK11*. No entanto, a maioria dos cancros da mama estão associados a mutações em genes de penetrância reduzida, frequentemente mutados na população em geral, como os genes *CDH1*, *NBS1*, *BRIP1*, *CHEK2*, *PALB2* e *RAD50* [57,58].

As técnicas de imagem para diagnóstico, que podem ou não utilizar radiação ionizante, desempenham um papel crucial no rastreio do cancro da mama, bem como no estadiamento e prognóstico da doença [59,60].

A mamografia é uma técnica complementar de diagnóstico que utiliza raios-X para avaliar o tecido mamário. Atualmente, corresponde à modalidade de diagnóstico mais utilizada para detecção precoce do cancro da mama. É considerada uma técnica com uma elevada sensibilidade, no entanto, esta tende a diminuir à medida que a densidade do tecido mamário aumenta [59,60].

A técnica de imagem por ressonância magnética (MRI, do inglês *magnetic resonance imaging*), para além de ter maior precisão do que a mamografia na quantificação do tamanho do tumor, tem a vantagem de gerar imagens de elevada resolução sem ser necessária a exposição a radiação ionizante. Pode recorrer a uma injeção intravenosa de um agente de contraste, como complexos de gadolínio (Gd), manganês (Mn) e ferro (Fe), que apresentam um certo grau de toxicidade. A neovascularização e a elevada permeabilidade dos vasos sanguíneos do tecido tumoral permitem que o agente de contraste alcance a região do tumor. Devido à sua elevada sensibilidade, a MRI permite detetar precocemente o cancro da mama [59–61].

De acordo com as recomendações da ASCO (*American Society of Clinical Oncology*), a expressão dos biomarcadores tumorais CA 15-3 (*cancer antigen 15-3*), CEA (*carcinoembryonic antigen*) e CA 27-29 (*cancer antigen 27-29*) pode ser avaliada apenas em caso de metastização devido à sua reduzida sensibilidade e especificidade [60].

Após a deteção por mamografia ou por MRI, de modo a confirmar o diagnóstico é necessário realizar uma biopsia [60]. A confirmação do diagnóstico de cancro da mama por biopsia deve ser acompanhada da avaliação da presença de biomarcadores associados ao mesmo, como macromoléculas e proteínas. Para além de facilitarem o diagnóstico, estes biomarcadores ajudam na identificação do tipo do tumor e do seu estágio e, conseqüentemente, na escolha da abordagem terapêutica mais adequada contribuindo para um melhor prognóstico [62].

No que diz respeito ao estadiamento do cancro da mama, a tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *Positron Emission Tomography*) em conjunto com a tomografia computadorizada (CT, do inglês *computed tomography*) é uma modalidade de imagem que é utilizada essencialmente para avaliar a presença de invasão ganglionar e presença de metástases à distância. A PET é uma técnica de imagem médica que utiliza radiotraçadores, sendo o principal o ^{18}F -FDG (*fluorodeoxyglucose*) que permite avaliar a atividade metabólica dos tecidos, tendo como base o metabolismo glicolítico preferencial das células tumorais. A PET-CT é uma técnica bastante vantajosa, permitindo a obtenção

tanto de imagens morfológicas como de imagens funcionais. No entanto, é uma técnica altamente dispendiosa, não sendo recomendado como meio complementar de diagnóstico para detecção precoce do cancro da mama [63]. A presença de metástases ósseas é evidente em cerca de 60 a 70% dos casos de recidiva do cancro da mama, podendo ser avaliada por cintigrafia óssea. A NCCN recomenda a realização de cintigrafia óssea, juntamente com a CT, nos casos de cancro da mama metastizado [64,65].

As abordagens terapêuticas (Tabela 1) a adotar para cada caso diagnosticado devem basear-se não só na caracterização histológica, mas também nas características moleculares do tumor, tendo em conta as possíveis mutações associadas [66,67]. As principais abordagens utilizadas para tratamento de cancro da mama são a cirurgia, a RT, a quimioterapia, a terapêutica hormonal e as terapêuticas dirigidas [60].

A cirurgia conservadora é precedida de terapêutica neoadjuvante para reduzir o tamanho do tumor e seguida de terapêutica adjuvante (*e.g.* RT, quimioterapia, terapêutica hormonal) de modo a evitar recidiva e minimizar o risco de metastização. A terapêutica neoadjuvante pode incluir quimioterapia, terapêutica hormonal ou terapêuticas dirigidas [60]. É de notar que a cirurgia conservadora nem sempre é capaz de erradicar a doença. Assim, a terapêutica adjuvante é de extrema importância no controlo de metastização e de recidiva local [51].

A RT é uma abordagem terapêutica usada de rotina no tratamento do cancro da mama após a cirurgia conservadora. No entanto, nem todos os doentes apresentam uma resposta benéfica perante a RT, uma vez que o tumor pode ser refratário a esta modalidade terapêutica. Para além disso, devido à irradiação dos tecidos circundantes, a RT pode causar diversos efeitos adversos, podendo afetar órgãos como a pele, pulmões e o coração [51].

Os protocolos de quimioterapia são geralmente realizados durante 12 a 24 semanas. Esta abordagem terapêutica é indicada para o tratamento de tumores dos subtipos triplo negativo (TN), HER2+ e luminais B HER2- de elevado risco. A literatura constata que a quimioterapia com administração de antraciclinas e taxanos diminui a mortalidade do cancro da mama em cerca de um terço. Para além disso, a quimioterapia apresenta os resultados mais promissores em casos de cancro da mama com expressão negativa de recetores de estrogénio, independentemente da classe de fármacos utilizados [60,68].

Introdução

Tabela 1 – Tabela relativa à classificação molecular do cancro da mama e biomarcadores característicos, grau de proliferação, frequência de casos e abordagens terapêuticas associados a cada subtipo molecular. Adaptado de [68].

	Luminal A	Luminal B		HER2+	TN
		HER2-	HER2+		
ER	+	+	+	+	-
PR	+	-	+/-	-	-
HER2	-	-	+	-	-
Proliferação	Reduzida	Alta	Reduzida/Elevada	Elevada	Elevada
Frequência (%)	40 - 50	20 - 30		15 - 20	10 - 20
Tratamento	Terapêutica hormonal	Terapêutica hormonal Quimioterapia	Terapêutica hormonal Quimioterapia Terapêuticas dirigidas	Quimioterapia Terapêuticas dirigidas	Quimioterapia PARPi

ER: recetor de estrogénio; PR: recetor de progesterona; HER2: recetor 2 do fator de crescimento humano; TN: triplo negativo

De modo a tentar correlacionar as características moleculares do cancro da mama associado à síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário, foram sendo realizados diversos estudos ao longo dos anos com o objetivo de tentar otimizar as abordagens terapêuticas utilizadas e, conseqüentemente, melhorar o prognóstico destes doentes oncológicos. Na verdade, parece haver uma relação entre o subtipo molecular TN e a presença de mutações no gene *BRCA1* [68,69]. Cerca de 12,6% dos cancros triplos negativos apresentam mutação *BRCA1* e apenas 1,1% estão associados a mutações no gene *BRCA2* [70]. Para além disso, cerca de 70% dos cancros da mama com mutação germinativa no gene *BRCA1* correspondem a cancros TN, enquanto que a maioria dos casos de cancro associados a mutações germinativas *BRCA2* expressam recetores hormonais. Por outro lado, entre 16% e 23% dos cancros da mama associados a mutação *BRCA2* são do subtipo triplo negativo [14,71].

Em 1998, os resultados de um estudo realizado por Robson *et al.* [72] numa amostra de 58 mulheres judias permitiu constatar que os casos analisados de cancro com mutações *BRCA1/BRCA2* revelaram uma tendência para apresentar uma expressão

negativa tanto de recetores de estrogénio como do recetor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2, do inglês *human epidermal growth factor receptor 2*), correspondendo a cancro triplo negativo.

Um estudo realizado por Atchley *et al.* (2008) [73] identificou 56 mulheres com cancro da mama portadores de mutações *BRCA1*, 30 portadoras de mutação *BRCA2* e 391 não portadoras. No que diz respeito ao perfil molecular dos tumores com mutação *BRCA1*, a maioria (57,1%) dos tumores *BRCA1* foram associados ao subtipo molecular TN. Por outro lado, cerca de 76,7% dos cancros *BRCA2* analisados expressavam pelo menos um dos recetores hormonais.

Mais recentemente, Nacer *et al.* (2023) [74], ao realizar um estudo que englobou uma amostra de 6660 indivíduos diagnosticados com cancro da mama entre os anos de 2010 e 2018, concluiu que a maioria das mutações patogénicas no gene *BRCA1* está associada a cancro triplo negativo, enquanto a grande maioria das mutações *BRCA2* representa o subtipo molecular luminal B. Na verdade, de entre 43 doentes portadores de mutação *BRCA1*, 26 estavam relacionados com o subtipo triplo negativo. Por outro lado, dos 36 portadores de mutação *BRCA2*, 23 eram doentes oncológicos do subtipo luminal B.

1.4. Impacto da radiação ionizante em portadores de mutações *BRCA*

Tal como referido anteriormente, indivíduos portadores de mutações nos genes *BRCA1/2* apresentam uma predisposição aumentada para o desenvolvimento de diferentes tipos de cancro, principalmente cancro da mama e do ovário, pelo que devem ser regularmente sujeitos a técnicas de rastreio. Deste modo, tendo como principal objetivo esclarecer o impacto da exposição a radiação ionizante em portadores de mutações patogénicas nestes genes, diversos estudos têm vindo a ser realizados.

Andrieu *et al.* (2006) [75] desenvolveu um estudo coorte retrospectivo que envolveu a análise do risco de desenvolvimento de cancro da mama em 1601 portadores do sexo feminino (1187 com mutações *BRCA1* e 414 com mutações *BRCA2*) após a exposição exclusiva a radiografias ao tórax. Foram observadas 853 portadoras diagnosticadas com cancro da mama. A principal conclusão retirada deste estudo foi uma

associação positiva entre a exposição a raios-X e o aumento do risco de cancro da mama, tendo sido mais evidente para as mulheres com idades inferiores a 40 anos. Para além disso, verificou-se uma tendência para diminuição do risco quando as portadoras eram expostas a raios-X depois dos 20 anos de idade.

Em 2012, um estudo coorte retrospectivo desenvolvido por Pijpe *et al.* [76] tinha como principal objetivo estimar o risco de desenvolvimento de cancro da mama em portadores de mutações nos genes *BRCA* associado a exposição a radiação de diagnóstico. No estudo foram incluídas 1993 portadoras, das quais 848 (43%) tinham sido diagnosticadas com cancro da mama. Relativamente à técnica de diagnóstico, cerca de 48% e 33% das portadoras foram submetidas, respetivamente, a pelo menos uma radiografia e uma mamografia. Observou-se uma tendência para o aumento do risco de cancro com o aumento do número de radiografias realizadas antes dos 20 anos de idade. No entanto, a realização de mamografias antes dos 30 anos não se correlacionou de forma significativa com o aumento do risco de desenvolvimento de cancro. De um modo geral, a exposição a qualquer tipo de radiação de diagnóstico, antes dos 30 anos de idade, das portadoras de mutações *BRCA* incluídas neste estudo revelou um aumento do risco de desenvolvimento de cancro da mama. Por outro lado, esta relação não se verificou para exposição entre os 30 e os 39 anos de idade.

Menes *et al.* (2015) [77] levou a cabo um estudo que envolveu 800 mulheres diagnosticadas com cancro da mama, das quais 159 (20%) apresentavam mutação no gene *BRCA1*, 119 (15%) com mutação *BRCA2* e as restantes (65%) não apresentavam mutação em nenhum destes genes. Durante o período de *follow-up* foram detetadas 86 recidivas, das quais 42 foram associadas a mutações *BRCA*. A maior incidência cumulativa foi registada para portadores de mutações *BRCA1* com idade inferior a 40 anos no diagnóstico da primeira neoplasia. Assim, este estudo concluiu que a incidência cumulativa de segundos tumores primários em portadores de mutações *BRCA* está associado com a idade de diagnóstico do primeiro tumor e o tipo de mutação *BRCA*, não estando relacionado com a respetiva abordagem terapêutica utilizada nem, consequentemente, com a radiação ionizante.

Em 2017, Schmidt *et al.* [78] desenvolveu um estudo com o objetivo de comparar o prognóstico associado a portadores e não portadores de mutações *BRCA*. Este incluiu 6478 doentes com cancro da mama invasivo diagnosticados antes dos 50 anos, tendo sido detetada uma mutação *BRCA1* em 210 doentes e uma mutação *BRCA2* em 75. Os

portadores *BRCA1* apresentaram uma taxa de sobrevivência mais reduzida em comparação com não portadores, com diferenças significativas nos primeiros 5 anos de seguimento. Este facto revelou estar associado à incidência de cancro do ovário em portadores de mutações *BRCA1*, sendo não estando relacionado com a modalidade terapêutica. Por outro lado, portadores *BRCA2* revelaram apresentar uma sobrevivência mais reduzida após 5 anos, ainda que sem diferenças significativas.

Para além dos estudos referenciados, outros foram desenvolvidos no sentido de esclarecer a radiosensibilidade de portadores de mutações nos genes *BRCA1/2*, sendo os resultados contraditórios [79]. Deste modo, é de extrema importância continuar a avaliar o impacto destas mutações patogénicas em indivíduos com síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário, que continuam a ser rotineiramente expostos a radiação ionizante decorrente de técnicas de diagnóstico, ainda que em doses reduzidas. Para além disso, não havendo esclarecimento acerca do impacto das mutações nos genes *BRCA1/2* na resposta celular à radiação terapêutica, foi formulado o presente projeto.

Objetivos

Objetivos

A síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário, associada maioritariamente a mutações patogénicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, é caracterizada por uma predisposição aumentada para o desenvolvimento de diferentes tipos de cancro, especialmente cancro da mama e cancro do ovário. A presença de mutações patogénicas nos genes *BRCA1/2* coloca em causa a manutenção da estabilidade genómica, sendo de extrema importância clarificar os efeitos biológicos induzidos pela exposição a radiação ionizante em indivíduos portadores de mutações nestes genes.

Deste modo, o objetivo principal deste projeto é avaliar, *in vitro*, o impacto de mutações nos genes *BRCA1/2* em resposta à exposição a radiação ionizante, tanto em linhas celulares linfoblastoides (LCLs) de portadores e não portadores de mutações nos genes *BRCA1/2* como em linhas celulares humanas de cancro da mama triplo negativo com (HCC1395) e sem mutação no gene *BRCA1* (HCC1806). Para além disso, de forma a avaliar a radiosensibilidade da pele, foi introduzido neste projeto uma linha celular humana de queratinócitos da pele (HaCaT). Os objetivos específicos correspondem à avaliação da sobrevivência celular, da viabilidade celular, do perfil de morte celular, do ciclo celular, da genotoxicidade e da migração celular.

Materiais e métodos

3.1. Cultura celular

Neste projeto foram utilizadas duas linhas celulares humanas de cancro da mama triplo negativo, a linha celular HCC1395 (ATCC[®] CRL-2324[™]) com mutação no gene *BRCA1*, e a linha celular HCC1806 (ATCC[®] CRL-2335[™]) sem mutação nos genes *BRCA*, e uma linha celular humana de queratinócitos da pele, a linha celular HaCaT (CLS 300493). Foram ainda utilizadas três linhas celulares linfoblastoides (LCLs) obtidas através da infeção de células B humanas com o vírus Epstein-Barr (EBV, do inglês *Epstein-Barr virus*), uma de um indivíduo com mutação no gene *BRCA1* (LCL 105), uma de um indivíduo com mutação no gene *BRCA2* (LCL 109) e outra sem mutação nos genes *BRCA* (LCL 114). Todas as linhas celulares (Figura 6) foram incubadas numa atmosfera húmida, a 37 °C e 5% de dióxido de carbono numa incubadora Binder[®] (Binder, Alemanha).

A colheita das células B foi aprovada pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (103-CE-2019) e pela Comissão de Ética do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG) (TI 01/2020) [80].

A linha celular HCC1395 foi cultivada em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, Sigma R4130), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *fetal bovine serum*) (Gibco 10270-106), 1% de antibiótico (Sigma A5955) e 0,1 mM de piruvato de sódio (Sigma S8636). A linha celular HCC1806 foi também cultivada em meio de cultura RPMI suplementado com 5% de FBS, 1% de antibiótico e 0,1 mM de piruvato de sódio. A linha celular HaCaT foi cultivada em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma D5648), suplementado com 5% de FBS, 1% de antibiótico e 0,25 mM de piruvato de sódio. As LCLs, propagadas em culturas em suspensão, foram cultivadas em meio de cultura RPMI suplementado com 20% de FBS, 1% de antibiótico e 0,1 mM de piruvato de sódio. As linhas celulares testaram negativo na análise de micoplasma.

No caso das LCLs, a manutenção celular foi realizada adicionando meio novo a cada 2 ou 3 dias. Verificando-se um elevado volume de meio no frasco de cultura, as células foram centrifugadas a 170xG durante 10 minutos (Heraus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18,7 cm) de modo a remover o sobrenadante. De seguida, o *pellet* foi homogeneizado em meio novo.

Para a realização dos ensaios foi necessário determinar a concentração de células. No que diz respeito às células em cultura aderente, aspirou-se o meio de cultura consumido e realizou-se a lavagem das células com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) a pH 7,4. Esta solução é composta por 137 mM de cloreto de sódio (Sigma S7653), 2,7 mM de cloreto de potássio (Sigma P9333), 1,8 mM de fosfato de potássio monobásico (Sigma P0662) e 10 mM fosfato de sódio monobásico (Sigma S5011). A lavagem com PBS permite a remoção de qualquer vestígio de FBS para potenciar ao máximo a ação das soluções de destacamento celular. Posteriormente, de modo a proceder ao destacamento das células da monocamada aderente, aspirou-se o PBS e incubaram-se as células com 2 mL de solução tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma T4049), no caso das linhas celulares HCC1395 e HaCaT, e com TrypLE (Gibco 12605-010), no caso da linha celular HCC1806. O tempo de incubação para destacamento das células HCC1395, HCC1806 e HaCaT corresponde a 3, 15 e 10 minutos, respetivamente. Após se verificar o destacamento celular ao microscópio ótico invertido (Motic AE31), adicionaram-se 5 mL de meio de cultura para inibir a ação da tripsina ou do TrypLE. Finalmente, procedeu-se à contagem das células pelo método de exclusão do azul de tripano, recorrendo a um hemocitómetro, no microscópio (ampliação 100×), com recurso a uma amostra composta por igual volume da suspensão celular e de uma solução de azul de tripano (Sigma T0776) a 5% em água ultrapura. Após a contagem e a determinação da concentração celular, preparam-se as concentrações celulares pretendidas. Para as LCLs, como as culturas são em suspensão, procedeu-se de imediato à contagem das células.

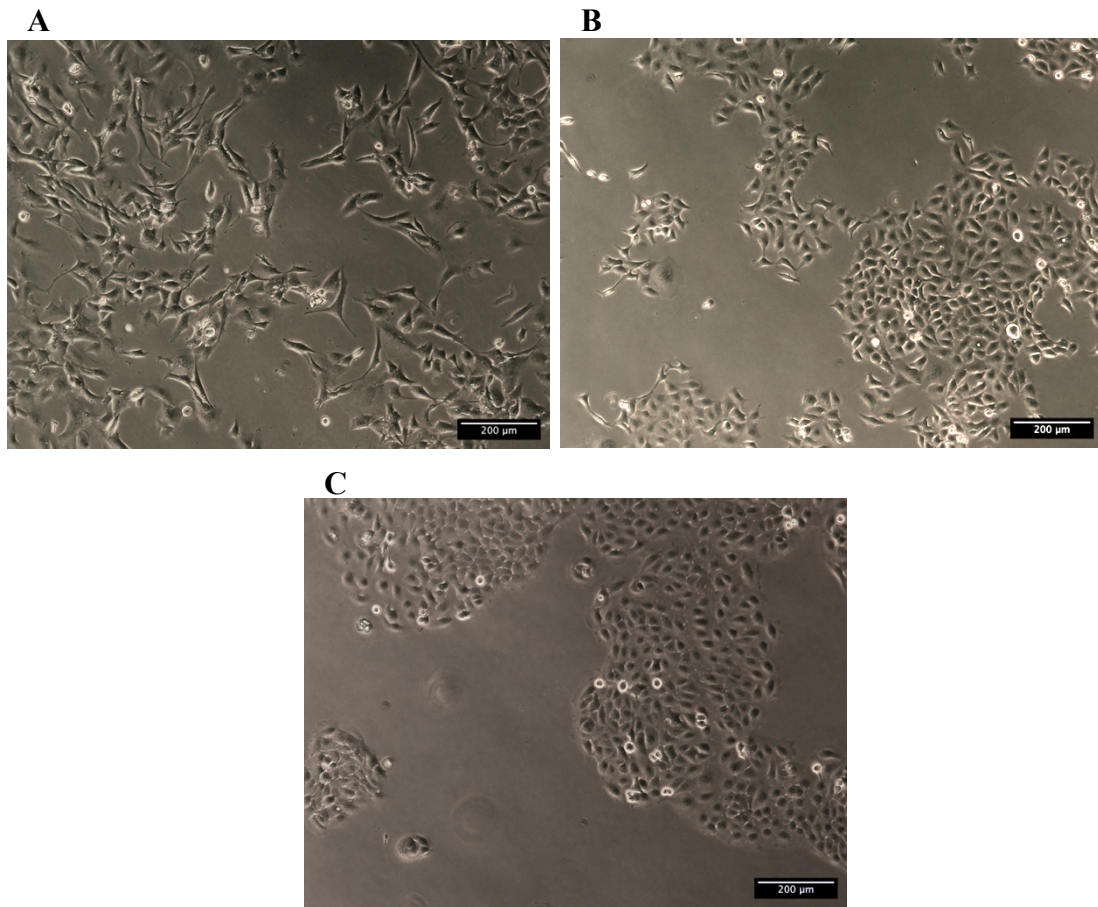


Figura 6 - Imagens representativas das linhas celulares utilizadas no estudo: A) Linha celular HCC1395; B) Linha celular HCC1806; C) Linha celular HaCaT.

3.1. Irradiação das células com raios-X

As linhas celulares foram irradiadas com raios-X, com energia de 6 MV, recorrendo a um acelerador linear TrueBeam® (Varian Medical Systems, EUA) (Figura 7), no serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC).

O processo de irradiação é antecedido pela preparação das células, de modo a obter uma suspensão celular com uma concentração de 5×10^5 células/mL. Esta suspensão foi, posteriormente, transferida para microtubos de 0,5 mL devidamente identificados com a linha celular e a dose a ser irradiada. É de notar que se teve o cuidado de encher totalmente os microtubos (aproximadamente 700 µL) com a suspensão celular a irradiar, de modo a evitar a presença de ar dentro de cada microtubo, uma vez que a presença de ar durante a irradiação influencia o valor de dose depositada [81,82]

Em seguida procedeu-se à irradiação dos microtubos, com doses de raios-X de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10 Gy, dependendo da experiência a realizar e da linha celular. Para todas as experiências realizadas foi necessário ter células controlo (não irradiadas), pelo que os microtubos correspondentes foram sujeitos às mesmas condições que os irradiados com exceção do processo de irradiação. As doses foram fornecidas de forma cumulativa, estando diretamente relacionadas com as unidades do monitor (MU, do inglês *monitor units*) do acelerador linear [83]. Tendo em conta o acelerador linear utilizado, uma MU corresponde a 0,022 Gy. Durante o processo de irradiação, os microtubos foram colocados dentro de um fantoma de acrílico com paredes de 1 cm de espessura (Figura 7). O fantoma foi preenchido com água, a uma temperatura de cerca de 37 °C, uma vez que o efeito da radiação na água é bem conhecido. Para além disso, é necessário que seja distribuída uma dose precisa, o que depende essencialmente da configuração experimental. Assim, a exposição à radiação foi realizada através de duas incidências, 90° e 270°, de modo a permitir uma distribuição uniforme da dose de exposição em ambos os lados do fantoma e, conseqüentemente, nas células nos microtubos.

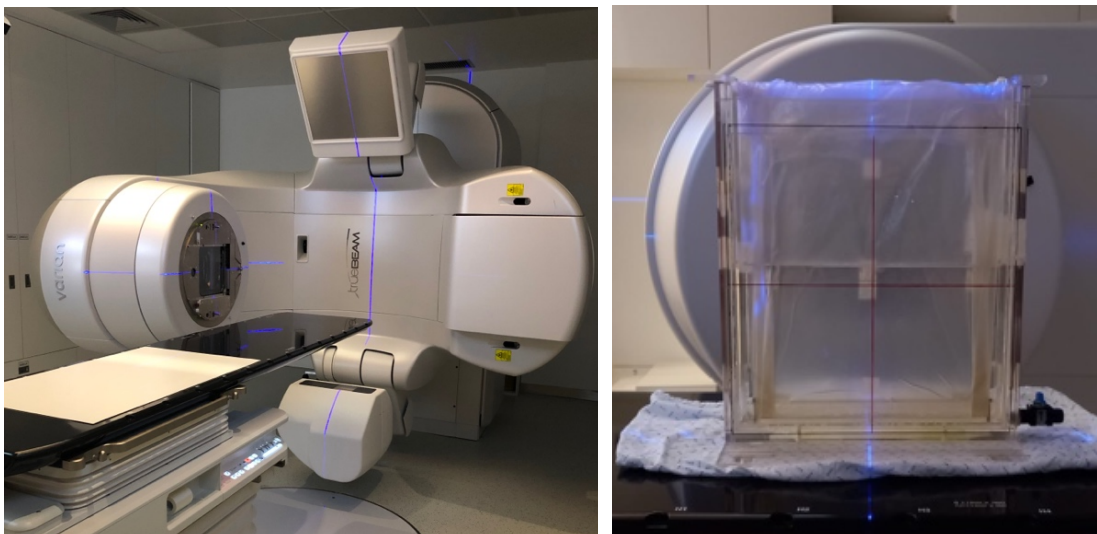


Figura 7 - Acelerador linear TrueBeam® (Varian Medical Systems, EUA) utilizado para a irradiação das linhas celulares utilizadas no estudo. Na imagem à direita é possível observar o fantoma utilizado para a irradiação.

3.2. Avaliação da sobrevivência celular

O ensaio de formação de colónias permite analisar a sobrevivência celular com base na capacidade de as células se dividirem para formarem colónias, ou seja, aglomerados com um mínimo de 50 células. Este ensaio é fundamental para determinar a capacidade de sobrevivência de células expostas à radiação ionizante [84].

Após irradiação das células, estas foram semeadas em placas de 6 poços (SPL Life Sciences 30006) com um volume de 3 mL por poço. O número de células semeadas por poço e por linha celular encontra-se esquematizado na Tabela 2. De seguida, as células foram incubadas por um período de tempo adequado a cada linha celular, tendo em conta o seu tempo de duplicação, para a formação das colónias. No caso da linha celular HCC1395, o período de incubação correspondeu a 24 dias, tendo sido renovado o meio a cada seis dias. Para a linha celular HCC1806, o meio foi trocado após cinco dias e a incubação terminou ao 10º dia. A linha celular HaCaT precisou de um período de incubação de 12 dias, tendo sido trocado o meio ao 6º dia. Após o respetivo período de incubação, procedeu-se à coloração das colónias formadas. Para tal, descartou-se o meio de cada poço e efetuou-se uma lavagem com PBS. Após a lavagem com PBS, as células foram fixadas com aproximadamente 2 mL de metanol (LabChem VT430) durante, pelo menos, 30 minutos. Descartou-se o metanol e as placas foram deixadas a secar à temperatura ambiente. Após se verificar a secagem, procedeu-se à coloração com 2 mL de uma solução de violeta de cristal (Sigma C3886) a 0,5% em água destilada. Após 15 minutos, removeu-se o excesso de corante, lavaram-se as placas com água corrente e deixaram-se a secar à temperatura ambiente. Posteriormente, contaram-se as colónias e calculou-se a eficiência da placa (PE, do inglês *plating efficiency*) e o fator de sobrevivência celular (FS), tendo em conta a Equação 1 e a Equação 2, respetivamente. O FS corresponde à razão entre a eficiência de placa das células irradiadas e a eficiência da placa das células não irradiadas (controlo), sendo que a PE corresponde à razão entre o número de colónias contadas e o número de células semeadas, para cada condição. A experiência foi realizada pelo menos 4 vezes ($n \geq 4$) em duplicado.

Materiais e métodos

Tabela 2 - Número de células semeadas para o ensaio de formação de colónias, por poço e por linha celular após irradiação com 0 - 10 Gy de raios-X.

	Dose (Gy)							
	0	0,5	1	2	4	6	8	10
HCC1395	1500	-	-	1500	-	-	-	-
HCC1806	800	800	800	1000	1000	2000	2000	2000
HaCaT	600	600	600	800	800	2000	2000	2000

$$PE = \frac{\text{número de colónias contadas}}{\text{número de células semeadas}}$$

Equação 1 - Cálculo da eficiência de placa.

$$FS = \frac{PE \text{ das células irradiadas (Raios - X)}}{PE \text{ das células não irradiadas}}$$

Equação 2 - Cálculo do fator de sobrevivência celular.

Recorrendo ao *software* GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA), foram traçadas as respetivas curvas de dose-resposta de acordo com o modelo linear quadrático, para as linhas celulares HCC1806 e HaCaT, através do qual se extraiu o valor da dose letal média (DL₅₀), que corresponde à dose de radiação à qual as células necessitam de ser expostas para induzir a morte celular de 50% da população inicial. Este ajuste matemático relaciona o FS e a dose irradiada de acordo com a Equação 3. Esta equação apresenta um termo linear, representado pelo coeficiente α , e um termo quadrático, representado pelo coeficiente β , obtidos a partir do ajuste linear quadrático. Cada um destes termos caracteriza um tipo distinto de lesões no DNA. Estes coeficientes expressam a radiosensibilidade das células irradiadas, estando o parâmetro α relacionado com as características do tecido irradiado e com a LET da radiação envolvida, enquanto o parâmetro β é indicador do grau de sensibilidade do tecido a alterações na taxa de dose e no esquema de irradiação [85,86].

$$FS = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

Equação 3 - Cálculo do fator de sobrevivência celular (FS) em função da dose absorvida (D) de acordo com o modelo linear quadrático.

3.3. Avaliação da viabilidade e perfil de morte celular

A análise da viabilidade celular e dos tipos de morte celular foram realizadas com recurso a citometria de fluxo, utilizando a dupla marcação com anexina V (AnV) marcada com o fluorocromo aloficocianina (APC, do inglês *allophycocyanin*) e com iodeto de propídeo (IP).

A distinção dos tipos de morte celular entre apoptose inicial, apoptose tardia/necrose e necrose, baseia-se nas características morfológicas das células. Em células em condições normais, o fosfolípido fosfatidilserina é predominante no folheto interno da membrana celular. Quando se inicia o processo de apoptose, este fosfolípido sofre uma translocação, passando a estar exposto no folheto externo da membrana. A AnV, apesar de ser incapaz de entrar na célula, apresenta uma elevada afinidade para a fosfatidilserina, sendo capaz de estabelecer uma ligação quando este fosfolípido está exposto no folheto externo da membrana. Por outro lado, o IP é capaz de se ligar diretamente ao DNA quando ocorre dano na membrana, permitindo a entrada do IP em células em apoptose tardia ou necrose [87]. Deste modo, células marcadas apenas com AnV correspondem a células em apoptose inicial, células marcadas com AnV e IP encontram-se em apoptose tardia/necrose e células marcadas apenas com IP estão associadas a necrose.

Após irradiação, foram semeadas $0,6 \times 10^6$ células em frascos de cultura de 25 cm², por condição, para a linha celular HCC1395 (Corning® 430639) e $0,3 \times 10^6$ células para as linhas celulares HCC1806 e HaCaT (SPL Life Sciences 70025). A avaliação do perfil de morte celular foi realizada sete dias após a irradiação. Para tal, as células foram destacadas do frasco e em seguida, realizou-se uma centrifugação da suspensão celular a 1300×G durante 5 minutos). Após descartar o sobrenadante, procedeu-se à lavagem com PBS, tendo sido transferido desta suspensão 1×10^6 de células para cada um dos tubos de citómetro e posteriormente centrifugados à mesma aceleração. Em seguida, adicionaram-se 100 µL de tampão de ligação (1×) (NaCl na concentração de 0,14 M [Sigma S7653],

Hepes na concentração de 0,01 M [Sigma H7523] e CaCl_2 na concentração de 3,3 mM [Sigma C4901]), 2,5 μL de AV-APC (BD Biosciences 550475) e 1 μL de IP (Immunostep S.L. ANXVKF). As células foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Finalmente, adicionaram-se mais 400 μL de tampão de ligação (1 \times) e procedeu-se à leitura no citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson), com um comprimento de onda de excitação de 488 nm e comprimentos de onda de emissão de 533 nm para a AV-APC e de 640 nm para o IP. Foram adquiridos pelo menos 25000 eventos através do *software* CellQuest (Becton Dickinson) e analisados com o *software* Paint-a-Gate (Becton Dickinson). No caso das LCLs, após irradiação com 0 e 2 Gy, procedeu-se à avaliação da viabilidade celular, 10 dias após exposição à radiação, analisando uma suspensão com concentração de $0,25 \times 10^6$ células/mL.

Os resultados expressam a percentagem de células em cada um dos grupos (viáveis, apoptose inicial, apoptose tardia/necrose e necrose) de 4 experiências independentes (n=4) em duplicado para as linhas HCC1806 e HaCaT, de 2 experiências independentes (n=2) em triplicado para a linha HCC1395 e de 1 experiência independente (n=1) para as LCLs.

3.4. Avaliação do ciclo celular

A desregulação do ciclo celular corresponde a um dos primeiros passos para a carcinogénese, sendo que a progressão do ciclo celular pode ser bastante útil para entender a dinâmica do desenvolvimento de cancro. A avaliação do ciclo celular foi realizada com recurso à marcação com IP, de modo a avaliar os efeitos da radiação ionizante no ciclo celular. Tendo em conta o conteúdo de DNA das células é possível quantificar a fração de células que se encontram nas diferentes fases do ciclo celular, as fases G0/G1, S e G2/M. O IP, para além de ser capaz de se ligar ao DNA, também é capaz de estabelecer ligação com o RNA, pelo que é necessário a ação da RNase de modo a garantir a marcação específica do DNA. Em condições normais, sabe-se que o conteúdo do DNA das células na fase G0/G1 corresponde a metade do conteúdo de DNA presente nas células da fase G2/M e que o conteúdo de DNA na fase S é superior ao conteúdo de DNA presente na fase G0/G1 e inferior ao da fase G2/M. Para além disso, é possível determinar a presença de células numa fase pré-G0/G1, uma vez que apresentam ainda menos DNA do que a fase G0/G1 [88,89].

Após irradiação, foram semeadas $0,3 \times 10^6$ células em frascos de cultura de 25 cm^2 , por condição, para as linhas celulares HCC1806 e HaCaT. A avaliação do ciclo celular foi realizada sete dias após irradiação. Primeiramente, procedeu-se ao destacamento das células e posterior centrifugação durante 5 minutos a $1300 \times G$. Descartou-se o sobrenadante e as células foram lavadas com PBS, transferindo-se, posteriormente, 1×10^6 para cada um dos tubos de citómetro. As células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante descartado e foram fixadas com $200 \mu\text{L}$ de etanol (Sigma 24102) a 70%, em agitação no vórtex. Posteriormente, foram incubadas a 4°C durante 30 minutos. Após incubação, foram adicionados 2 mL de PBS e as células foram novamente centrifugadas. Após descartar o sobrenadante, as células foram incubadas com $200 \mu\text{L}$ de IP/RNase (Immunostep S.L. PI/RNase) a temperatura ambiente e no escuro, durante 15 minutos. A análise do ciclo celular foi realizada num citómetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson), com comprimentos de onda de excitação de 488 nm e de emissão de 640 nm. Foram adquiridos pelo menos 25000 eventos através do *software* CellQuest (Becton Dickinson), tendo sido analisados e quantificados com o *software* Paint-a-Gate (Becton Dickinson).

Os resultados expressam a percentagem de células identificadas em cada um dos grupos (pré-G0/G1, G0/G1, S, G2/M) de 4 experiências independentes ($n=4$) em duplicado para a linha celular HaCaT e de 3 experiências independentes ($n=3$) em duplicado para a linha celular HCC1806.

3.5. Avaliação da genotoxicidade

Os micronúcleos (MN) (Figura 8) resultam de cromossomas ou fragmentos destes que ficam retidos durante a anáfase, sendo que a sua presença apenas pode ser quantificada em células binucleadas, ou seja, células que sofreram divisão do núcleo, mas não sofreram divisão do citoplasma. O ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese utiliza a citocalasina B, um inibidor da polimerização da actina que é uma proteína responsável pela formação do anel de microfilamentos necessário à divisão do citoplasma. Deste modo, a adição da citocalasina B induz o bloqueio da citocinese, permitindo obter células binucleadas. Este ensaio permite avaliar os efeitos de agentes citotóxicos como danos cromossómicos, necrose e apoptose [90]. Para além disso, este

ensaio provou ser importante no ramo da radiobiologia, uma vez que permite aferir doses de exposição accidental [91].

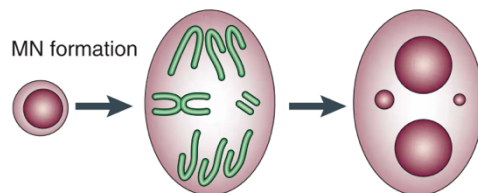


Figura 8 - Representação de 2 micronúcleos numa célula binucleada após bloqueio da citocinese.

Foram semeadas 2×10^5 células HCC1806 e 1×10^5 células HaCaT, em frascos de cultura de 25 cm². Para a linha celular HCC1395, foram semeadas 4×10^5 células em frascos de 25 cm². As células foram incubadas (37 °C, 5% CO₂) durante 96 horas, de modo a ocorrer pelo menos uma divisão celular. Posteriormente, substituiu-se o meio de cultura por meio com citocalasina B (Sigma C6762) na concentração de 2 µg/mL. Passado 48 horas da adição da citocalasina B, procedeu-se ao destacamento celular e centrifugou-se a suspensão celular a 170×G durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e homogeneizou-se o *pellet* em 1 mL de KCl na concentração de 0,075 M (Sigma P9333) com posterior incubação (37 °C, 5% CO₂) durante 5 minutos. Após a incubação, adicionou-se 1 mL de uma solução de metanol em ácido acético (Honeywell 33209) numa proporção de 3:1 em volume e centrifugou-se a 100×G durante 8 minutos. De seguida, descartou-se o sobrenadante e as células foram fixadas com 1 mL de metanol durante 10 minutos. As células foram centrifugadas novamente a 100×G durante 8 minutos, aspirando-se cerca de 0,8 mL do sobrenadante. O *pellet* foi homogeneizado no restante volume de sobrenadante e foram adicionadas 3 gotas desta suspensão em lâminas de vidro (Normax 5470317C). As lâminas (Figura 9) foram deixadas a secar durante 24 horas, passado as quais as mesmas foram coradas com uma solução de Giemsa (Merck, Alemanha) a 5% em PBS, a pH 6,8. De seguida, foram lavadas com água corrente e, após se verificar a sua secagem, com recurso a um microscópio Nikon Eclipse 80i (ampliação 200x), equipado com Nikon Digital Camera DXM 1200F, foram analisadas 1000 células binucleadas por condição (500 por lâmina) no caso das linhas celulares HCC1806 e HaCaT, e 400 células binucleadas por condição (200 por lâmina) no caso da linha celular

HCC1395. Através destas imagens foi calculada a frequência de MN por célula binucleada. A experiência foi realizada 2 vezes (n=2), em duplicado, para as linhas celulares HCC1395 e HaCaT, e 3 vezes (n=3), em duplicado, para a linha celular HCC1395.

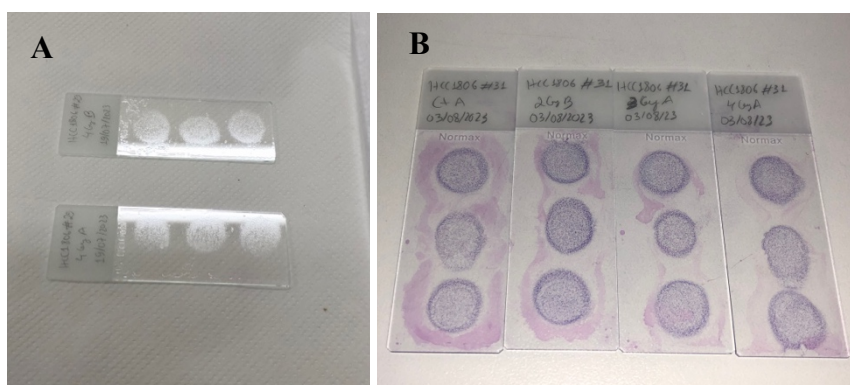


Figura 9 - Lâminas utilizadas para o ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese. A) Suspensão celular em metanol-ácido acético (3:1) depositada em gotas ao longo de cada lâmina. B) Lâminas após coloração com Giemsa a 5% em PBS a pH 6,8.

3.6. Avaliação da migração celular

As células tumorais apresentam a capacidade de migração a partir da região do tumor primário, formando metástases. Este processo de migração pode ser influenciado pela exposição à radiação ionizante [92]. Para além disso, a radioterapia pode afetar tecidos normais, nomeadamente a pele, sendo importante avaliar a migração celular na cicatrização de feridas [93].

A migração celular pode ser avaliada *in vitro* através do *scratch assay*. Este ensaio permite mimetizar a migração das células *in vivo* após a formação de uma ferida, ou rutura, e as suas principais vantagens relacionam-se com o reduzido custo, elevada simplicidade e com o facto de não ser necessário nenhum equipamento especializado para o efeito [94].

Imediatamente após a irradiação, as células HCC1806 e HaCaT foram semeadas em placas de 12 poços (SPL Life Sciences 30012) à concentração de 6×10^4 células por poço, num volume de 1 mL. As células HCC1395 foram semeadas em placas de 24 poços (SPL Life Sciences 30024), à concentração de 8×10^4 células por poço, num volume de

500 μL . Após cerca de 72 horas (HCC1806 e HaCaT) ou de 96 horas de incubação (HCC1395), quando os poços apresentavam uma confluência de aproximadamente 80%, removeram-se os meios de cultura e realizou-se uma fenda com a ponta de uma micropipeta de 200 μL . Em seguida, realizou-se uma lavagem com PBS e adicionou-se 1 mL de meio de cultura para as células das linhas HCC1806 e HaCaT, ou 500 μL de meio de cultura para as células da linha HCC1395. O seguimento da área da fenda realizou-se por microscopia ótica, tendo sido capturadas imagens com recurso ao microscópio ótico invertido (ampliação 100 \times) aos tempos 0, 24, 48 e 72 horas após realização da fenda. A área da fenda foi calculada recorrendo ao *software* ImageJ (Rasband, W. S., U. S. National Institutes of Health), delimitando a área de forma manual ou com a instalação de um *plugin* específico para este cálculo (*Wound healing size tool*) [95], sendo que 1 pixel corresponde a 0,956 μm na escala utilizada (Figura 10). Antes da utilização do *plugin*, procedeu-se à sua validação, comparando com o método manual de delineamento da fenda.

Os resultados foram apresentados como a percentagem de oclusão da fenda às 4 h, às 24h, às 48 h, e às 72 h em relação ao tempo 0 de acordo com a Equação 4. A experiência foi realizada 4 vezes (n=4) em duplicado para as linhas celulares HCC1395, HCC1806 e HaCaT.

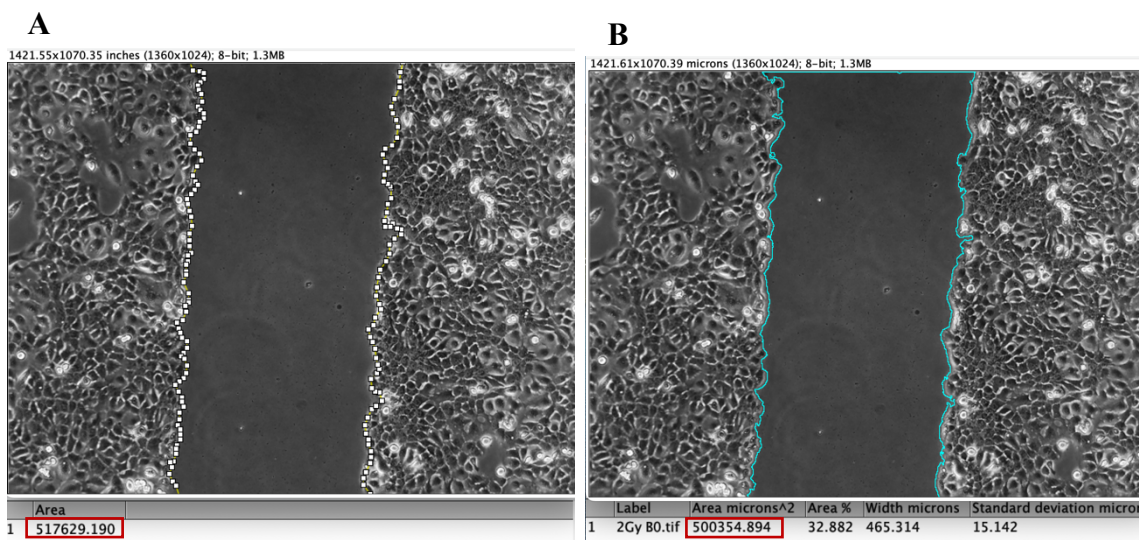


Figura 10 - Exemplo do cálculo da área de uma fenda, em micrómetros ao quadrado, no ImageJ, A) realizado manualmente e B) com recurso a um *plugin* instalado e específico para este cálculo.

$$\text{Oclusão da fenda (t = a) (\%)} = \frac{A_{t=0} - A_{t=a}}{A_{t=0}} \times 100$$

Equação 4 – Cálculo da porcentagem de oclusão da fenda ao tempo a , em que $A_{t=0}$ corresponde à área da fenda ao tempo 0, ou seja, 0 h após a realização da fenda, e $A_{t=a}$ corresponde à área da fenda ao tempo a .

3.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). A normalidade de distribuição de variáveis quantitativas foi analisada de acordo com o teste de normalidade *Shapiro-Wilk*. Foram usados testes paramétricos para variáveis com distribuição normal e testes não paramétricos em caso contrário. A comparação dos resultados, dependentes de duas variáveis, entre dois grupos foi realizada pelo teste *t-Student*, (distribuição normal) e pelo teste de *Mann-Whitney* (distribuição não normal). A comparação de resultados, dependentes de duas variáveis, entre três ou mais grupos foi realizada através do teste ANOVA (do inglês, *analysis of variance*) de dois fatores ou com o modelo de efeitos mistos (distribuição normal). A comparação das médias, dependentes de uma única variável, entre três ou mais grupos foi analisada pelo teste ANOVA de um fator (distribuição normal). As comparações múltiplas foram realizadas segundo o teste de *Tukey* para comparar as médias de todos os grupos entre si. Para todas as comparações foi considerada uma significância de 0,05.

Resultados

Tendo como objetivo central avaliar o impacto de mutações nos genes *BRCA1/2* em resposta à exposição a radiação ionizante decorrente de radioterapia, foram realizados estudos *in vitro* em linhas celulares humanas de cancro da mama triplo negativo com mutação no gene *BRCA1* (HCC1395), sem mutação nos genes *BRCA1/2* (HCC1806) e em linhas linfoblastoides (LCLs) de portadores e não portadores de mutações nos genes *BRCA1/2*. Os resultados apresentados nesta secção incluem a avaliação da radiosensibilidade associada a uma linha celular humana de queratinócitos da pele (HaCaT).

4.1. Avaliação da sobrevivência celular

Após exposição a doses até 10 Gy de raios-X, foi realizado o ensaio de formação de colónias. Através deste ensaio, verificou-se que, de um modo geral, a exposição das células a raios-X induziu uma diminuição da sobrevivência das células HCC1806 (Figura 11) e das células HaCaT (Figura 12), com o aumento da dose de exposição à radiação. As curvas de sobrevivência celular, obtidas através do ajuste ao modelo linear quadrático relacionam o fator de sobrevivência celular (FS) com a dose irradiada, em Gy. Os valores da dose letal média (DL_{50}), do fator de sobrevivência aos 2 Gy (FS2), das componentes α e β , da razão α/β , assim como os restantes parâmetros relativos a este ajuste matemático, para cada linha celular, são apresentados na Tabela 3.

Resultados

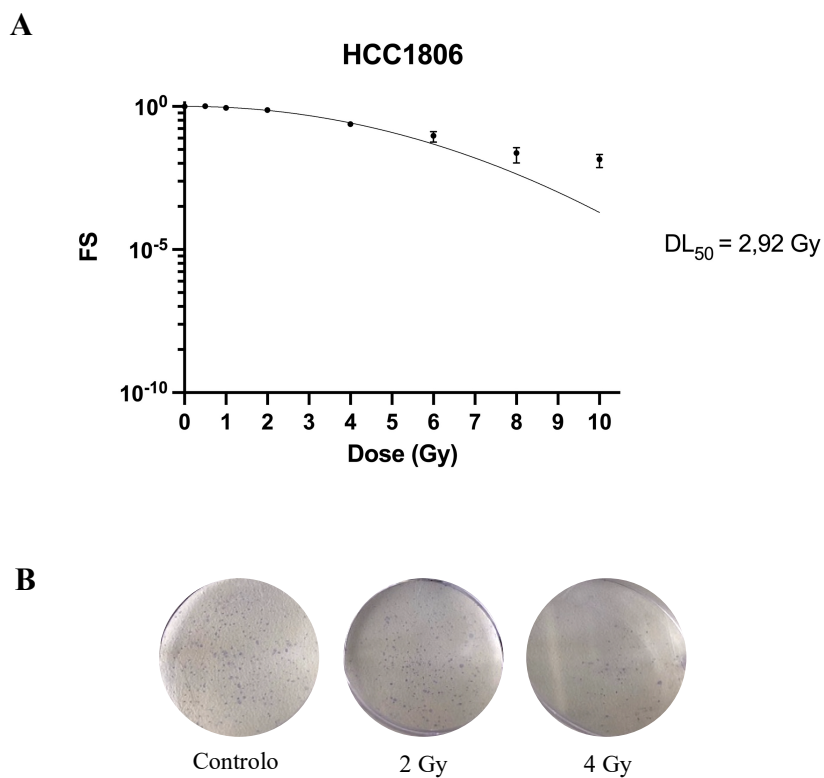


Figura 11 – Sobrevivência das células HCC1806. A) Curva de sobrevivência das células HCC1806 após exposição a 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 Gy de raios-X. A curva representa o fator de sobrevivência (FS) em função da dose de radiação (Gy), determinado através do ensaio de formação de colónias, segundo ajuste ao modelo linear quadrático. Os valores correspondem à média \pm erro padrão de 5 experiências independentes em duplicado. B) Imagens representativas das colónias formadas durante o período de incubação de 10 dias do ensaio de formação de colónias, após exposição a 0, 2 e 4 Gy de raios-X.

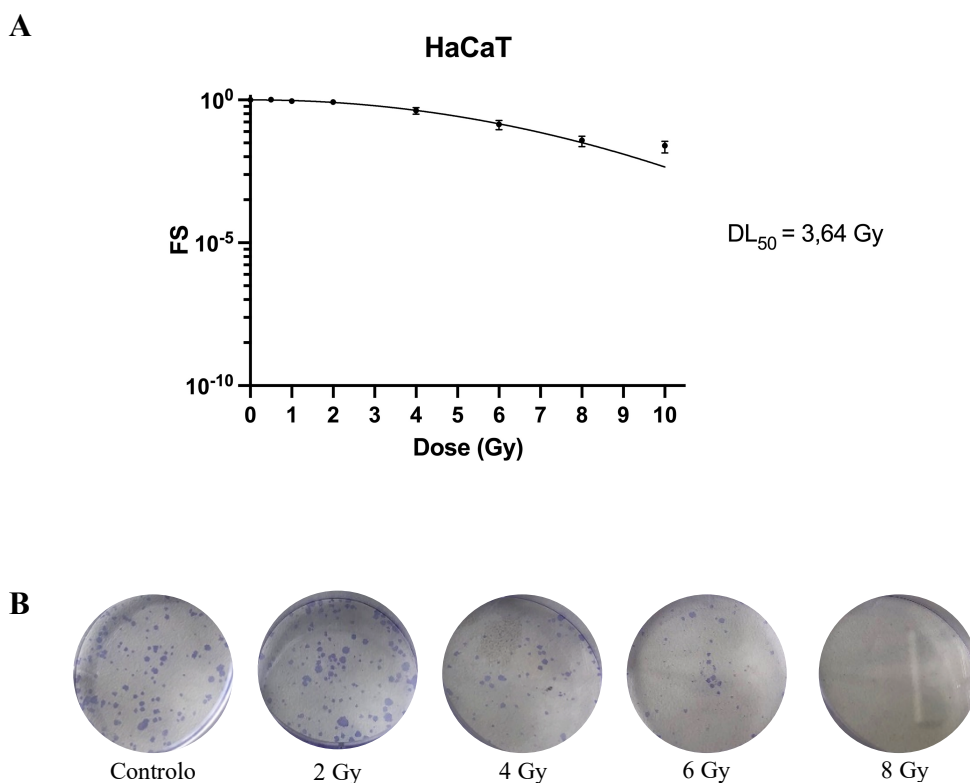


Figura 12 – Sobrevivência das células HaCaT. A) Curva de sobrevivência das células HaCaT após exposição a 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 Gy de raios-X. A curva representa o fator de sobrevivência (FS) em função da dose de radiação (Gy), determinado através do ensaio de formação de colônias, segundo ajuste ao modelo linear quadrático. Os valores correspondem à média±erro padrão de 5 experiências independentes em duplicado. B) Imagens representativas das colônias formadas durante o período de incubação de 12 dias do ensaio de formação de colônias, após exposição a 0, 2, 4, 6 e 8 Gy de raios-X.

As células HCC1806 apresentaram um valor de DL_{50} de 2,92 Gy (IC95%: 2,80; 3,05) significativamente inferior ao da linha celular HaCaT, que foi de 3,64 Gy (IC95%: [3,49; 3,80]). Assim, analisando os valores da LD_{50} obtidos e os respetivos intervalos de confiança de 95% (Tabela 3), verificou-se uma maior radiosensibilidade da linha celular HCC1806.

Para além disso, pode-se constatar que não existem diferenças significativas entre os valores do fator de sobrevivência celular (FS2) para um valor de dose de exposição de 2 Gy da linha celular HCC1806, cujo valor médio do FS2 corresponde a 0,75 (IC95%: 0,68; 0,82), e da linha celular HaCaT, com um valor médio do FS2 correspondente a 0,82 (IC95%: 0,78; 0,86).

Resultados

Tabela 3 – Parâmetros, doses letais médias, DL_{50} (Gy), e fator de sobrevivência a 2 Gy (FS2) obtidos através do ajuste matemático do modelo linear quadrático para as linhas celulares HCC1806 e HaCaT.

		Parâmetro	α/β	R^2	DL_{50} (Gy)	IC95% (Gy)	FS(2Gy)	IC95%
		Valor médio \pm EP						
HCC1806	α	$-0,017 \pm 0,021$	-0,193	0,98	2,92	[2,80; 3,05]	0,75	[0,68; 0,82]
	β	$0,087 \pm 0,007$						
HaCaT	α	$-0,022 \pm 0,018$	-0,375	0,97	3,64	[3,49; 3,80]	0,82	[0,78; 0,86]
	β	$0,058 \pm 0,005$						

EP (erro padrão); R^2 – coeficiente de determinação; DL_{50} – dose letal média; IC95% - intervalo de confiança de 95%; FS(2Gy) – fator de sobrevivência a 2 Gy.

Para a linha celular HCC1395 não foi possível avaliar a sobrevivência celular após irradiação com as doses de 0 e de 2 Gy. As células foram incubadas durante cerca de 24 dias, não tendo sido observada a formação de colónias como demonstrado na Figura 13. Por outro lado, visto que as LCLs crescem em cultura em suspensão, não foi realizado o ensaio de formação de colónias para estas linhas celulares.

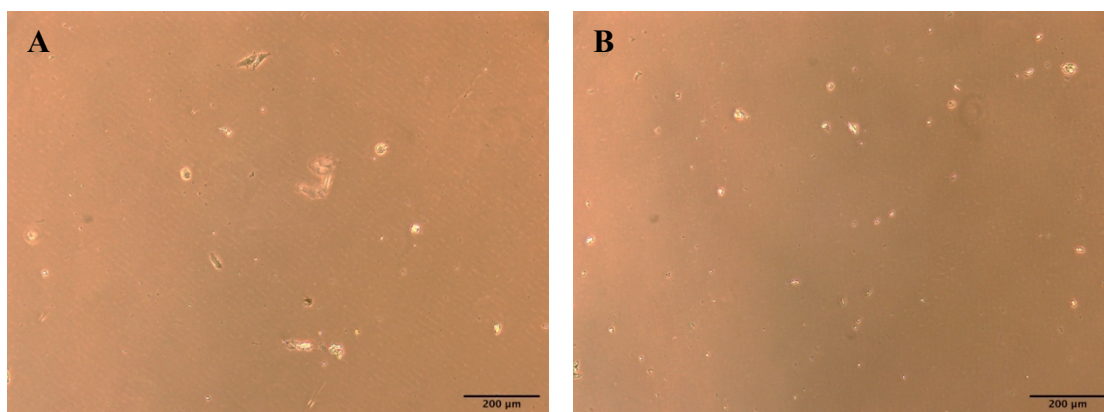


Figura 13 - Imagens representativas do ensaio de formação de colónias com as células HCC1395, após um período de incubação de 24 dias, após exposição a doses de raios-X de A) 0 Gy e B) 2 Gy, obtidas com recurso ao microscópio ótico (ampliação 100x).

4.2. Avaliação da viabilidade e perfil de morte celular

A viabilidade e o perfil de morte celulares foram avaliados nas várias linhas celulares em estudo por citometria de fluxo, através da dupla marcação com anexina V e com iodeto de propídeo. Na Figura 14 são apresentados os resultados preliminares (n=1) desta avaliação nas LCLs não irradiadas (controlo). Assim, e de acordo com o gráfico, verificou-se que a cultura que apresentou uma maior viabilidade celular foi a LCL 114 (70%), proveniente de um indivíduo não portador de mutação nos genes *BRCA1/2*, apresentando 15% da população de células em apoptose inicial, 13% em apoptose tardia/necrose e 2% em necrose. A linhagem LCL 105 (linha linfoblastoide de portador de mutação *BRCA1*) apresentou uma viabilidade celular de 50% e a linhagem LCL 109 (linha linfoblastoide de portador de mutação *BRCA2*) apresentou uma viabilidade celular de apenas 7%. Os tipos de morte celular predominantes na linhagem LCL 105 foi a apoptose tardia/necrose e a necrose, tendo sido registada uma população com 33% e com 16% das células analisadas, respetivamente. Por outro lado, a reduzida viabilidade celular da linhagem LCL 109 está associada maioritariamente (86%) a morte por apoptose tardia/necrose.

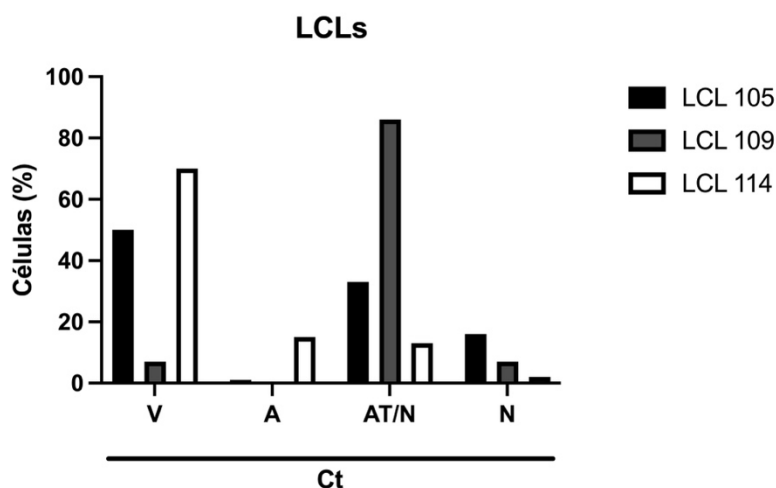


Figura 14 - Viabilidade e tipos de morte celular das linhas celulares linfoblastoides (LCLs) com mutação no gene *BRCA1* (LCL 105), com mutação no gene *BRCA2* (LCL 109) e sem mutação nos genes *BRCA1/2* (LCL 114), avaliados por citometria de fluxo através da dupla marcação anexina V/iodeto de propídeo, 10 dias após realização do procedimento de irradiação com 0 Gy (grupo controlo - Ct). Os resultados são preliminares (n=1) e estão expressos em percentagem de células em cada um dos grupos, em específico viáveis (V), apoptose inicial (A), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N).

Resultados

No que diz respeito às células HCC1395 (Figura 15), a viabilidade celular das células não irradiadas (controlo) foi reduzida. Esta baixa viabilidade celular está associada maioritariamente a morte por apoptose inicial, mas também a morte por apoptose tardia/necrose e necrose. De facto, foi registada uma diminuição com significado estatístico entre a população de células HCC1395 viáveis ($60,33 \pm 2,66\%$) e a população de células em apoptose inicial ($18,00 \pm 1,00\%$, $p < 0,0001$), entre as células viáveis e as células em apoptose tardia/necrose ($10,67 \pm 0,58\%$, $p < 0,0001$), e entre as células viáveis e as células em necrose ($9,00 \pm 1,00\%$, $p < 0,0001$). Foram ainda registadas diferenças significativas entre a população de células HCC1395 em apoptose inicial e a população de células em apoptose tardia/necrose ($p < 0,01$), e entre a população de células em apoptose inicial e a população de células em necrose ($p < 0,001$).

Face à baixa viabilidade apresentada pelas células do grupo controlo, tanto das linhas celulares linfoblastoides como da linha celular HCC1395, a avaliação do efeito da exposição destas células a doses de raios-X não foi determinada.

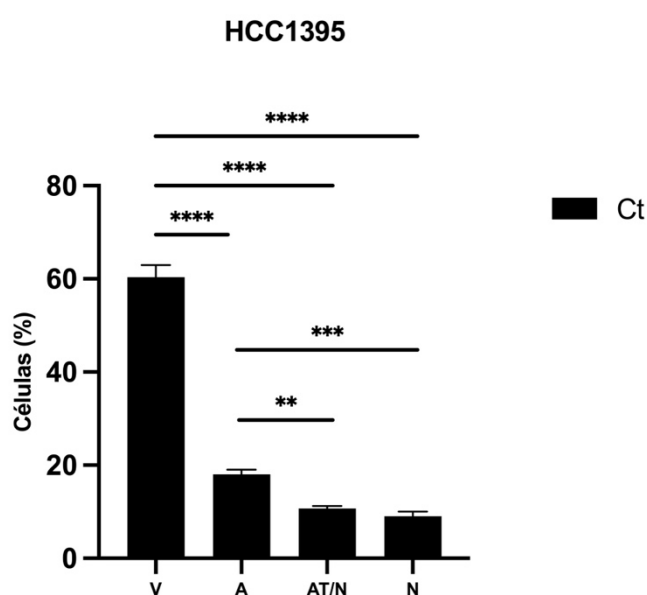


Figura 15 - Viabilidade e tipos de morte celular da linha celular HCC1395 avaliados por citometria de fluxo através da dupla marcação com anexina V/iodeto de propídeo, 7 dias após realização do procedimento de irradiação com 0 Gy (grupo controlo - Ct). Os resultados (média±erro padrão) estão expressos em percentagem de células em cada um dos grupos, em específico viáveis (V), apoptose inicial (A), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N), de 2 experiências independentes (n=2) em triplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste ANOVA de um fator com *post hoc Tukey's*.

Resultados

Da análise geral dos resultados apresentados na Figura 16, verificou-se que a viabilidade das linhas celulares HCC1806 e HaCaT, sete dias após a irradiação, apresentou uma diminuição estatisticamente significativa à medida que a dose aumenta, quando em comparação às células não irradiadas. Efetivamente, a viabilidade celular das células HCC1806 (Figura 16a) não irradiadas registou um valor de $80,63 \pm 3,34\%$, diminuindo para $62,83 \pm 11,16\%$ ($p < 0,001$) após exposição a 2 Gy, para $58,75 \pm 9,27\%$ ($p < 0,001$) após exposição a 3 Gy, dose correspondente à DL_{50} , e para $57,13 \pm 3,36\%$ ($p < 0,001$) após exposição a 4 Gy. A diminuição da viabilidade, comparativamente às células controlo, foi acompanhada por um aumento significativo da população de células em apoptose inicial de $7,88 \pm 1,89\%$ para $16,00 \pm 1,51\%$ ($p < 0,01$) após irradiação com 3 Gy (DL_{50}), e para $17,00 \pm 1,60\%$ ($p < 0,001$) após exposição a uma dose de 4 Gy. Entre as várias doses de raios-X, na população de células em apoptose inicial, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas. De modo semelhante, a população de células em apoptose tardia/necrose aumentou de $8,25 \pm 1,58\%$ para $16,17 \pm 5,78\%$ ($p < 0,01$), para $18,13 \pm 5,84\%$ ($p < 0,001$) e para $18,00 \pm 2,00\%$ ($p < 0,001$), após irradiação com 2 Gy, com 3 Gy (DL_{50}) e com 4 Gy, respetivamente.

Relativamente às células HaCaT (Figura 16b), a exposição a várias doses de raios-X induziu, também, uma diminuição significativa da viabilidade celular, variando de $85,75 \pm 4,20\%$ para $78,25 \pm 3,73\%$ ($p < 0,05$) com a dose de 2 Gy, para $66,00 \pm 11,74\%$ ($p < 0,001$) com a dose de 4 Gy, correspondente à DL_{50} , e para $51,63 \pm 4,03\%$ ($p < 0,0001$) com a dose de 5 Gy. A população de células viáveis após irradiação com uma dose de 5 Gy ($51,63 \pm 4,03\%$) foi significativamente inferior ao número de células viáveis após a exposição a 2 Gy ($78,25 \pm 3,73\%$, $p < 0,0001$) e após a exposição a 4 Gy (DL_{50}) ($66,00 \pm 11,74\%$, $p < 0,0001$). De modo semelhante, o número de células viáveis associado à dose de 4 Gy (DL_{50}), quando comparado com o número de células viáveis associado a 2 Gy, foi significativamente inferior ($p < 0,001$).

A diminuição da viabilidade das células HaCaT foi acompanhada por um aumento significativo da percentagem de células em apoptose inicial com o aumento da dose, passando de $7,00 \pm 2,07\%$ (não irradiadas) para $22,75 \pm 11,51\%$ ($p < 0,0001$) com a dose de 4 Gy (DL_{50}), e para $34,00 \pm 9,97\%$ ($p < 0,0001$) com a dose de 5 Gy. Tendo em conta a comparação entre doses, a população de células em apoptose inicial com a dose de 2 Gy ($12,63 \pm 2,50\%$) aumenta de forma significativa ($p < 0,01$) após exposição a 4 Gy

Resultados

($p < 0,01$) e a 5 Gy ($p < 0,0001$). De forma análoga, a exposição a uma dose de 5 Gy induz um aumento significativo ($p < 0,001$) de morte celular por apoptose inicial, quando comparada com a exposição a 4 Gy (DL_{50}).

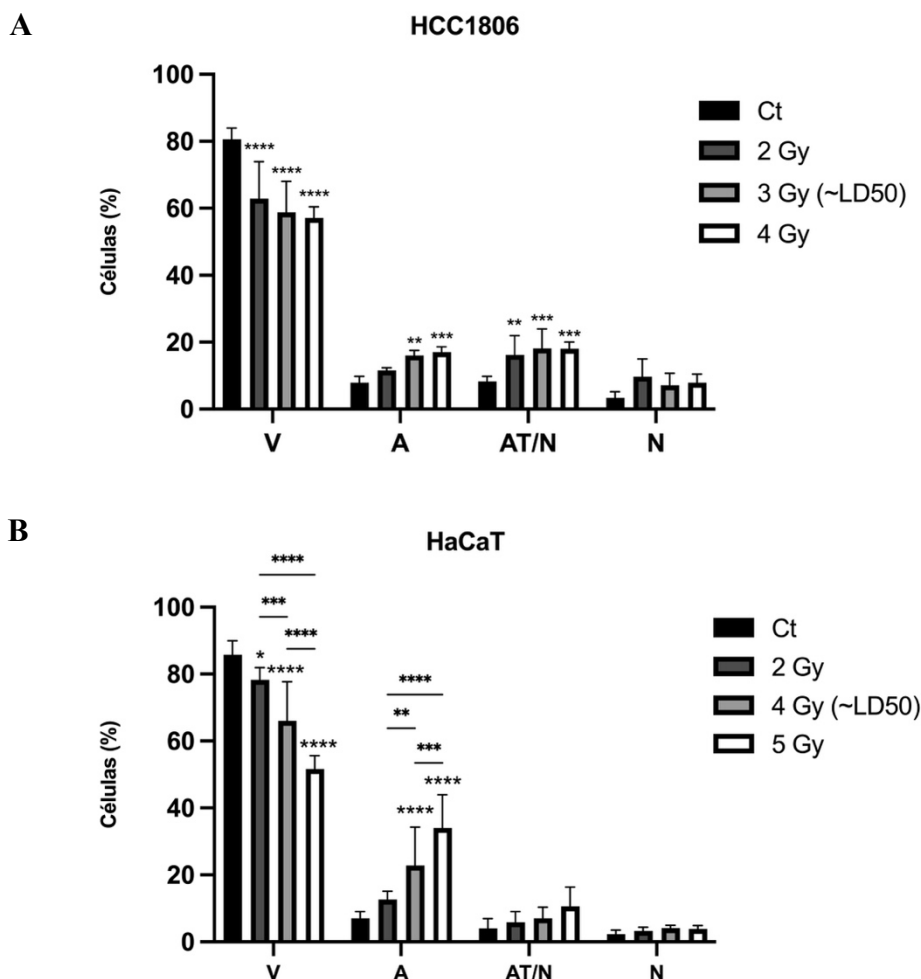


Figura 16 – Viabilidade e tipos de morte celular das células A) HCC1806 e B) HaCaT, 7 dias após exposição a 0, 2, 3, 4 ou 5 Gy de raios-X, avaliados por citometria de fluxo através da dupla marcação com anexina V/iodeto de propídeo. Os resultados (média±erro padrão) são expressos em percentagem de células em cada um dos grupos, em específico viáveis (V), apoptose inicial (A), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N), de pelo menos 3 experiências independentes ($n \geq 3$) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste ANOVA de dois fatores com *post hoc Tukey's*.

Resultados

Ao compararmos os efeitos na ausência de exposição à radiação (0 Gy) e após exposição à dose de 2 Gy e à dose correspondente à DL₅₀ das células HCC1806 (3 Gy) e HaCaT (4 Gy) (Figura 17) verificou-se que, para as células não irradiadas (controlo), a população de células HCC1806 em apoptose tardia/necrose foi de $8,25 \pm 1,58\%$ enquanto que, para a linha celular HaCaT, a percentagem de células neste tipo de morte foi significativamente inferior ($p < 0,01$), apresentando um valor de $4,00 \pm 2,93\%$. Por outro lado, nas células HaCaT irradiadas com a dose de 2 Gy, quando comparadas com a mesma condição de irradiação das células HCC1806, foi registado um aumento significativo ($p < 0,01$) na população de células viáveis. Para além disso, após irradiação com a dose de exposição de 2 Gy, a população de células HCC1806 em apoptose tardia/necrose apresentou um valor significativamente superior ($16,17 \pm 5,78\%$, $p < 0,01$) quando comparado com as células HaCaT ($5,88 \pm 3,18\%$). O mesmo sucedeu para as células em necrose, observando-se uma diminuição ($p < 0,01$) de $9,67 \pm 5,32\%$ (HCC1806) para $3,25 \pm 1,17\%$ (HaCaT). Após exposição à dose correspondente à DL₅₀, a população de células HCC1806 em apoptose tardia/necrose ($18,13 \pm 5,84\%$) é significativamente superior à das células HaCaT ($7,00 \pm 3,38\%$, $p < 0,01$).

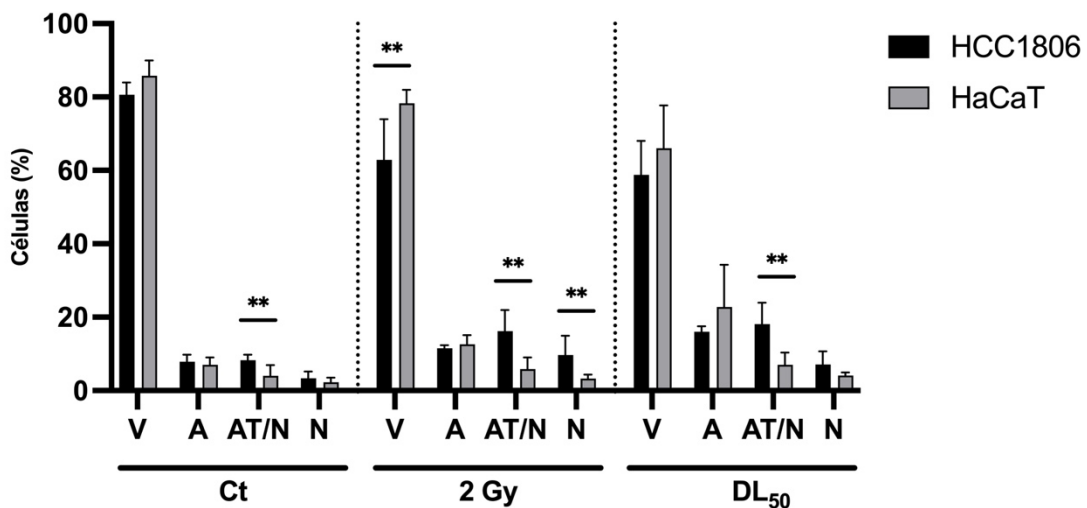


Figura 17 - Viabilidade e tipos de morte celular das células HCC1806 e HaCaT, avaliados por citometria de fluxo através da dupla marcação com anexina V/iodeto de propídeo, 7 dias após exposição a 0 Gy (Ct), 2 Gy e ao correspondente valor da DL₅₀ (3 Gy para as células HCC1806 e 4 Gy para as células HaCaT). Os resultados (média±erro padrão) são expressos em percentagem de células em cada um dos grupos, em específico viáveis (V), apoptose inicial (A), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N) de pelo menos 3 experiências independentes ($n \geq 3$) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste *Mann-Whitney*.

4.3. Avaliação do ciclo celular

A Figura 18a apresenta os resultados da avaliação do ciclo celular da linha celular HCC1806, sete dias após exposição a diferentes doses de raios-X (0, 2, 3 e 4 Gy). Verificou-se que nas células não submetidas a radiação (condição controle), $1,50 \pm 0,54\%$ das células estão na fase pré-G0/G1, enquanto que $58,63 \pm 2,33\%$ estão na fase G0/G1, $21,38 \pm 1,19\%$ estão na fase S e $19,75 \pm 1,91\%$ estão na fase G2/M. Após a irradiação, verificou-se um aumento significativo da percentagem de células HCC1806 na fase pré-G0/G1, passando para $4,83 \pm 2,04\%$ ($p < 0,05$), para $5,63 \pm 2,13\%$ ($p < 0,01$) e para $5,14 \pm 2,97$ ($p < 0,05$) após exposição a doses de 2 Gy, 3 Gy e 4 Gy, respetivamente. Na fase G0/G1, em relação à ausência de exposição a radiação ionizante, verificou-se uma diminuição significativa para $50,75 \pm 3,37\%$ ($p < 0,001$) com a dose de exposição de 3 Gy, e para $45,71 \pm 3,04\%$ ($p < 0,001$) quando irradiadas com a dose de exposição de 4 Gy. A população de células na fase S aumentou significativamente para todas as doses de exposição em relação às células não irradiadas, registando-se uma população de células de $25,50 \pm 2,51\%$ ($p < 0,01$) após irradiação com 2 Gy, de $29,50 \pm 3,07\%$ ($p < 0,0001$) com a dose de exposição de 3 Gy e de $33,00 \pm 2,38\%$ ($p < 0,0001$) com a dose de exposição de 4 Gy.

Assim, a irradiação das células HCC1806 com raios-X induziu, de um modo geral, uma diminuição da percentagem de células na fase G0/G1 e um aumento na fase pré-G0/G1 e S, sendo dependente da dose de exposição à irradiação. Na fase G0/G1, após irradiação com 2 Gy, a população de células correspondeu a $55,83 \pm 1,72\%$, significativamente superior à percentagem de células presentes após irradiação com 3 Gy ($50,75 \pm 3,37\%$, $p < 0,001$) e após irradiação com 4 Gy ($45,71 \pm 3,04\%$, $p < 0,0001$). Para além disso, nesta fase do ciclo celular, também foram verificadas diferenças significativas entre as doses de 3 Gy e de 4 Gy ($p < 0,001$). Por outro lado, ocorreu um aumento significativo de células na fase S quando irradiadas com 3 Gy ($29,50 \pm 3,07\%$, $p < 0,01$) e com 4 Gy ($33,00 \pm 2,38\%$, $p < 0,0001$), comparativamente a 2 Gy ($25,50 \pm 2,51\%$), assim como quando irradiadas com 4 Gy, comparativamente às irradiadas com 3 Gy ($p < 0,05$). Na fase G2/M não se verificaram diferenças estatisticamente significativas, nem relativamente à condição na ausência de exposição à radiação nem com o aumento das doses de exposição à radiação.

Resultados

Em relação à linha celular HaCaT (Figura 18b), a irradiação com doses de exposição de 2, 4 e 5 Gy quase não alterou a percentagem de células na fase pré-G0/G1 relativamente ao controlo, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas. Tal como aconteceu para as células HCC1806, com o aumento da dose, verificou-se uma tendência para a diminuição do número de células na fase G0/G1 e para o aumento na fase S. A população de células na fase G0/G1 diminuiu de $92,75 \pm 2,05\%$ para $84,50 \pm 4,60\%$ ($p < 0,01$) com a dose de exposição de 2 Gy, para $75,75 \pm 11,44\%$ com a dose de exposição de 4 Gy ($p < 0,0001$) e para $65,63 \pm 7,95\%$ ($p < 0,0001$) com a dose de exposição de 5 Gy. O aumento na fase S foi significativo após exposição à dose de 4 e de 5 Gy, em relação às células não irradiadas, verificando-se um aumento de $3,13 \pm 1,25\%$ (0 Gy) para $13,63 \pm 7,73\%$ ($p < 0,001$) e para $21,50 \pm 5,83\%$ ($p < 0,0001$), respetivamente. Entre diferentes doses, a população de células identificadas na fase G0/G1 após exposição a 2 Gy ($84,50 \pm 4,60\%$) foi significativamente superior à percentagem de células identificadas após exposição à dose de 4 Gy ($75,75 \pm 11,44\%$, $p < 0,01$), e após exposição à dose de 5 Gy ($65,63 \pm 7,95\%$, $p < 0,0001$). Para além disso, a irradiação com a dose de 5 Gy induziu uma diminuição significativa ($p < 0,001$) desta população de células quando comparada com a dose de 4 Gy. Na fase S, em comparação com a dose de 2 Gy ($7,25 \pm 3,11\%$), o aumento também foi verificado após exposição a 4 Gy ($13,63 \pm 7,73\%$, $p < 0,05$) e após exposição a 5 Gy ($21,50 \pm 5,83\%$, $p < 0,0001$). De forma semelhante, verificou-se um aumento significativo ($p < 0,01$) associado à exposição a 5 Gy em comparação com a dose de 4 Gy.

Resultados

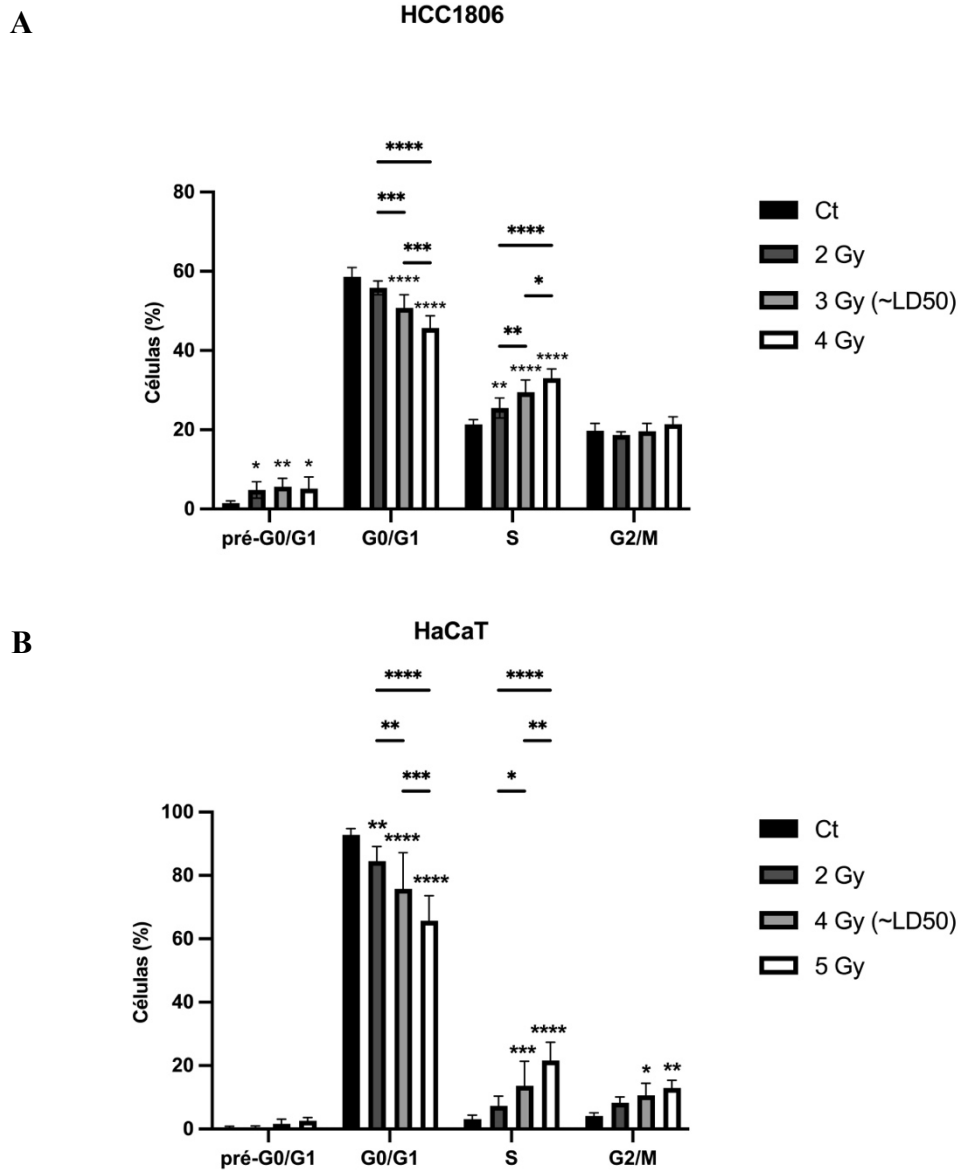


Figura 18 – Distribuição das células A) HCC1806 e B) HaCaT pelas fases do ciclo celular, 7 dias após exposição a doses de 0, 2, 3, 4 ou 5 Gy de raios-X. O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo através da marcação com iodeto de propídeo-RNAse. Os resultados (média±erro padrão) são expressos em percentagem de células identificadas em cada uma das populações (pré-G0/G1, fase G0/G1, fase S e fase G2/M) de pelo menos 3 experiências independentes ($n \geq 3$) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste ANOVA de dois fatores com *post hoc Tukey's*.

Resultados

As alterações induzidas pela irradiação no ciclo celular das células HCC1806 e HaCaT (Figura 19) é, de um modo geral, semelhante para ambas as linhas celulares. De referir que as células HaCaT, tal como evidenciado pelo grupo controlo, apresentam um maior número de células na fase G0/G1, enquanto as células HCC1806 estão mais distribuídas pelas diferentes fases do ciclo celular.

Na população de células identificadas na fase pré-G0/G1 ocorreu diminuição significativa ($p < 0,01$) de $4,83 \pm 2,04\%$ (HCC1806) para $0,25 \pm 0,71\%$ (HaCaT) no grupo de células expostas à dose de exposição de 2 Gy. A população de células HaCaT na fase G0/G1 com a dose de exposição de 2 Gy diminuiu ($p < 0,01$) de $84,50 \pm 4,60\%$ (HaCaT) para $55,83 \pm 1,72\%$ (HCC1806). Na fase S, a população de células após a exposição a uma dose de 2 Gy diminuiu de forma significativa ($p < 0,01$) de $25,50 \pm 2,51\%$ (HCC1806) para $7,25 \pm 3,11\%$ (HaCaT). Os valores correspondentes às células na fase G2/M variaram de forma significativa ($p < 0,01$) de $18,67 \pm 0,82\%$ (HCC1806) para $8,25 \pm 1,91\%$ (HaCaT), após exposição à dose de 2 Gy.

No grupo de células expostas à dose de exposição correspondente à DL_{50} (3 Gy para as células HCC1806 e de 4 Gy para as células HaCaT), a população de células HCC1806 na fase pré-G0/G1 ($5,63 \pm 2,13\%$) foi significativamente superior à das células HaCaT ($1,63 \pm 1,51\%$, $p < 0,001$). Na fase G0/G1, a percentagem de células HCC1806 identificadas ($50,75 \pm 3,37\%$) foi significativamente inferior à das células HaCaT ($75,75 \pm 11,44\%$, $p < 0,001$). Na fase S, ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,001$) entre a população de células HCC1806 ($29,50 \pm 3,07\%$) e a população de células HaCaT ($13,63 \pm 7,73\%$). De forma análoga, a população de células HCC1806 retidas na fase G2/M ($19,63 \pm 2,00\%$) foi significativamente inferior ($p < 0,001$) às células HaCaT ($10,63 \pm 3,85\%$).

Resultados

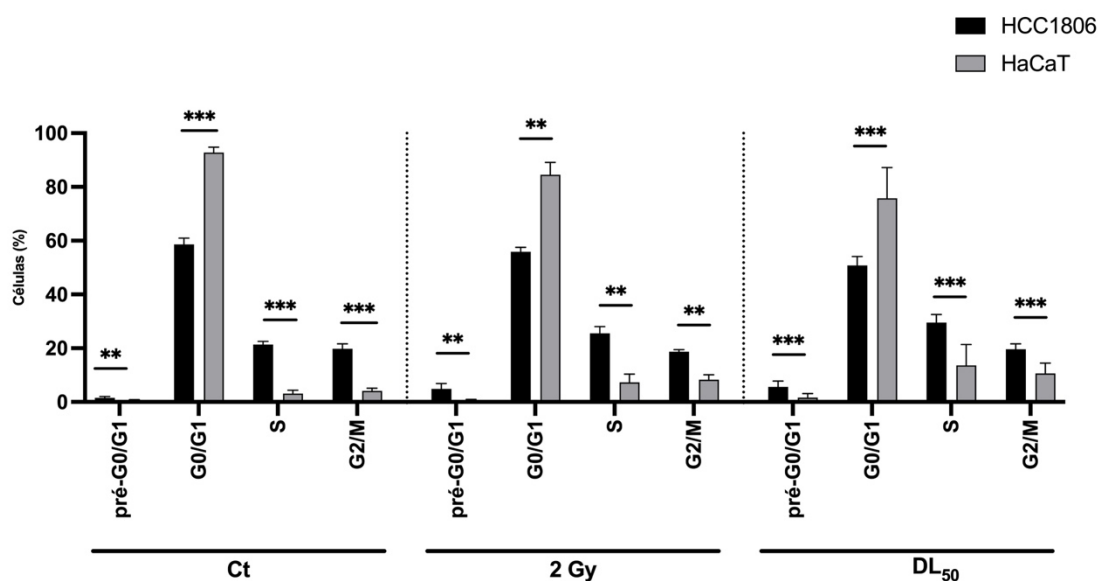


Figura 19 - Resultados da análise comparativa da distribuição das células HCC1806 e HaCaT pelas fases do ciclo celular, 7 dias após exposição a 0 Gy (Ct), 2 Gy e à dose correspondente ao DL₅₀ (3 Gy para as células HCC1806 e 4 Gy para as células HaCaT). O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo através da marcação com iodeto de propídeo-RNase. Os resultados (média±erro padrão) são expressos em percentagem de células identificadas em cada uma das populações (pré-G0, fase G0/G1, fase S e fase G2/M) de pelo menos 3 experiências independentes (n≥3) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se p<0,05, ** se p<0,01, *** se p<0,001 e **** se p<0,0001, determinadas pelo teste *Mann-Whitney*.

4.4. Avaliação da genotoxicidade

A avaliação da genotoxicidade através do ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese nas linhas celulares HCC1806, HaCaT e HCC1395, foi realizada 5 dias após irradiação com dose de exposição de 2 Gy e na situação controlo (0 Gy). A análise dos micronúcleos (MN) foi realizada através da sua quantificação em células binucleadas (BN), tendo sido segmentada em grupos por número de micronúcleos (um, dois e três ou mais) presentes na célula.

Nas células HCC1806 (Figura 20) não irradiadas verificou-se que $3,03 \pm 1,64\%$ das células binucleadas analisadas apresentaram um micronúcleo, $0,57 \pm 0,39\%$ apresentaram dois micronúcleos e $0,10 \pm 0,11\%$ apresentaram pelo menos três micronúcleos. Após exposição a uma dose de 2 Gy, em comparação com as células controlo, registou-se um aumento significativo de células com um MN ($9,73 \pm 2,15\%$, p<0,0001), com dois MN ($1,97 \pm 0,53\%$, p<0,001) e com três ou mais MN ($0,73 \pm 0,55\%$, p<0,05).

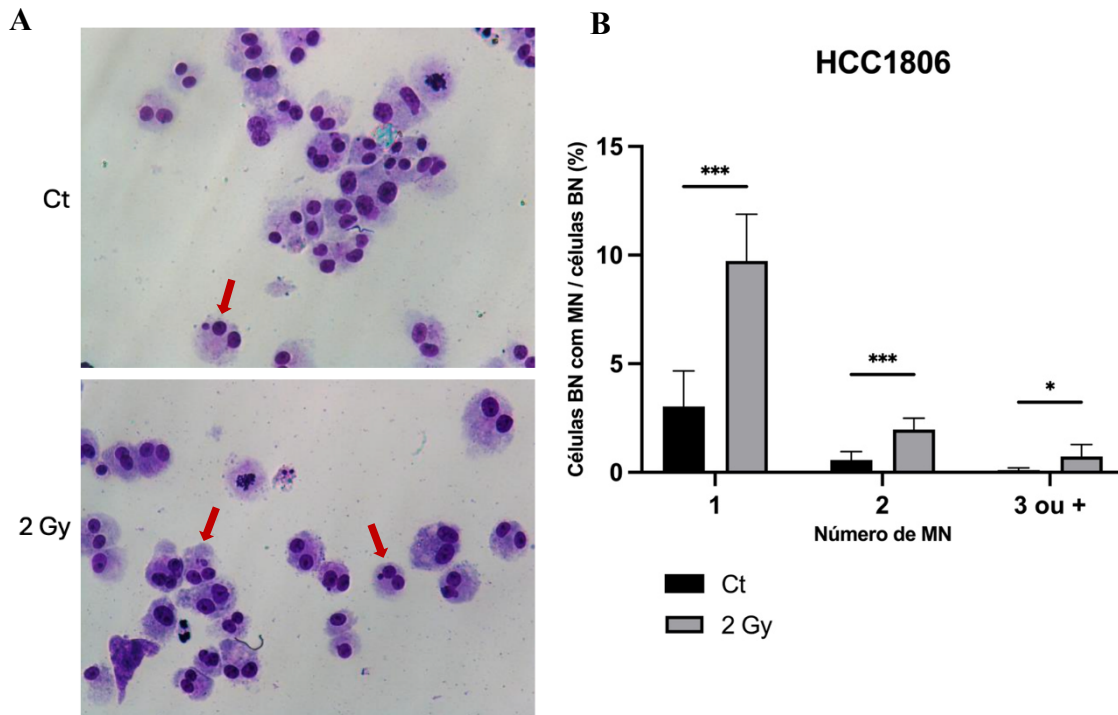


Figura 20 – Avaliação da genotoxicidade nas células HCC1806. A) Imagens representativas da presença de micronúcleos nas células HCC1806 binucleadas. As setas a vermelho sinalizam a presença de micronúcleos. B) Quantificação de micronúcleos em 1000 células binucleadas, 5 dias após exposição a 0 Gy (Ct) e 2 Gy. Os resultados (média±erro padrão) são expressos em percentagem de células binucleadas com 1, 2 ou pelo menos 3 micronúcleos por célula binucleada. A experiência foi realizada 3 vezes (n=3) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas através do teste *t-Student* não emparelhado.

A análise dos micronúcleos nas células HaCaT (Figura 21) apenas registou uma diferença significativa na percentagem de células binucleadas com pelo menos três micronúcleos. Neste caso, o número de células com micronúcleos após irradiação com 2 Gy ($1,55 \pm 0,87\%$) é significativamente superior ($0,05 \pm 0,10\%$, $p < 0,05$).

Resultados

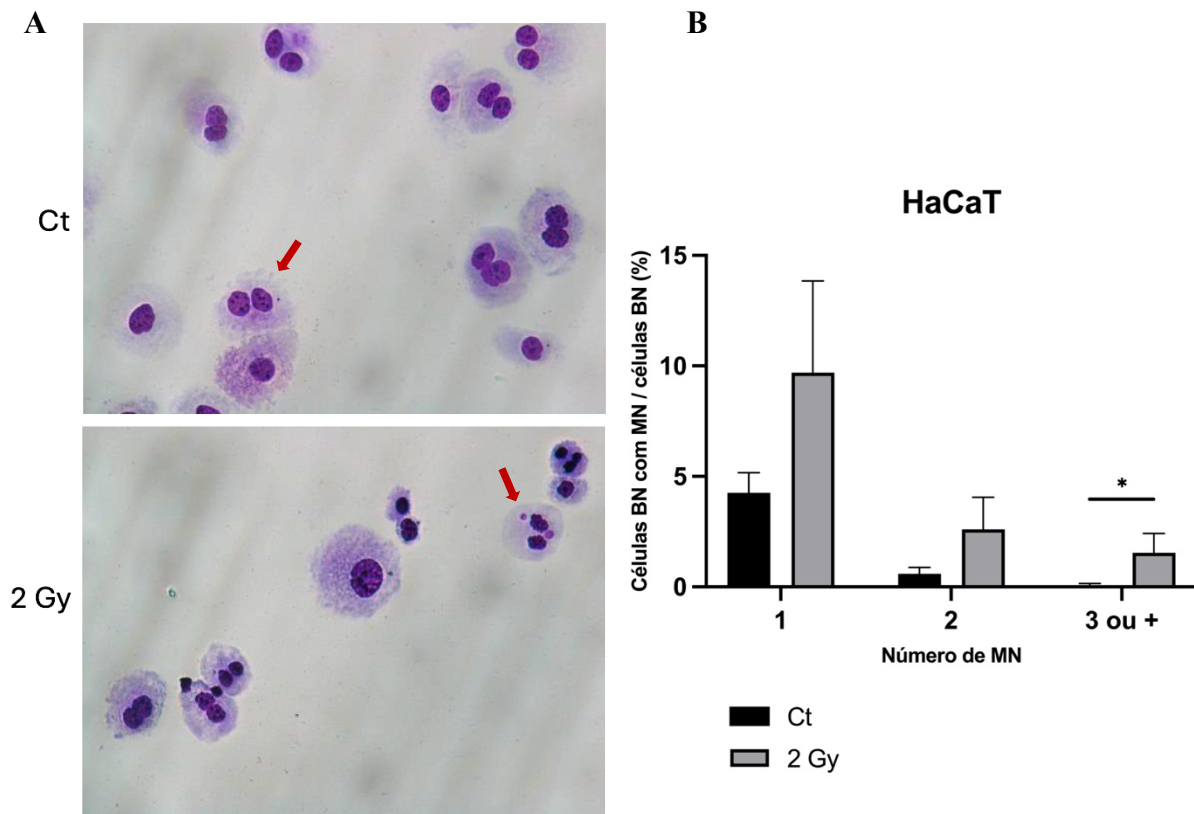


Figura 21 - Avaliação da genotoxicidade na linha celular HaCaT. A) Imagens representativas da presença de micronúcleos nas células HaCaT binucleadas. As setas vermelhas sinalizam a presença de micronúcleos. B) Quantificação de micronúcleos em 1000 células binucleadas. Os resultados (média±erro padrão) são expressos em percentagem de células binucleadas com 1, 2 ou pelo menos 3 micronúcleos por célula binucleada. A experiência foi realizada 2 vezes (n=2) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste *t-Student* não emparelhado.

No que diz respeito à análise da linha celular HCC1395 (Figura 22), em relação ao grupo controlo, a irradiação das células com a dose de exposição de 2 Gy levou a um aumento da percentagem de células com um micronúcleo, passando de $14,13 \pm 1,11\%$ para $21,50 \pm 2,27\%$ ($p < 0,01$), e também a um aumento do número de células com pelo menos três micronúcleos passando de $5,88 \pm 2,32\%$ para $15,25 \pm 4,01\%$ de células ($p < 0,05$).

Resultados

A observação das várias imagens que foram captadas para a quantificação dos micronúcleos permitiu constatar que, de um modo geral, as células HCC1395 apresentavam características morfológicas que não seriam esperadas para células viáveis, nomeadamente a presença de perturbações na membrana plasmática, fragmentos de DNA espalhados pelo citoplasma e rutura da membrana.

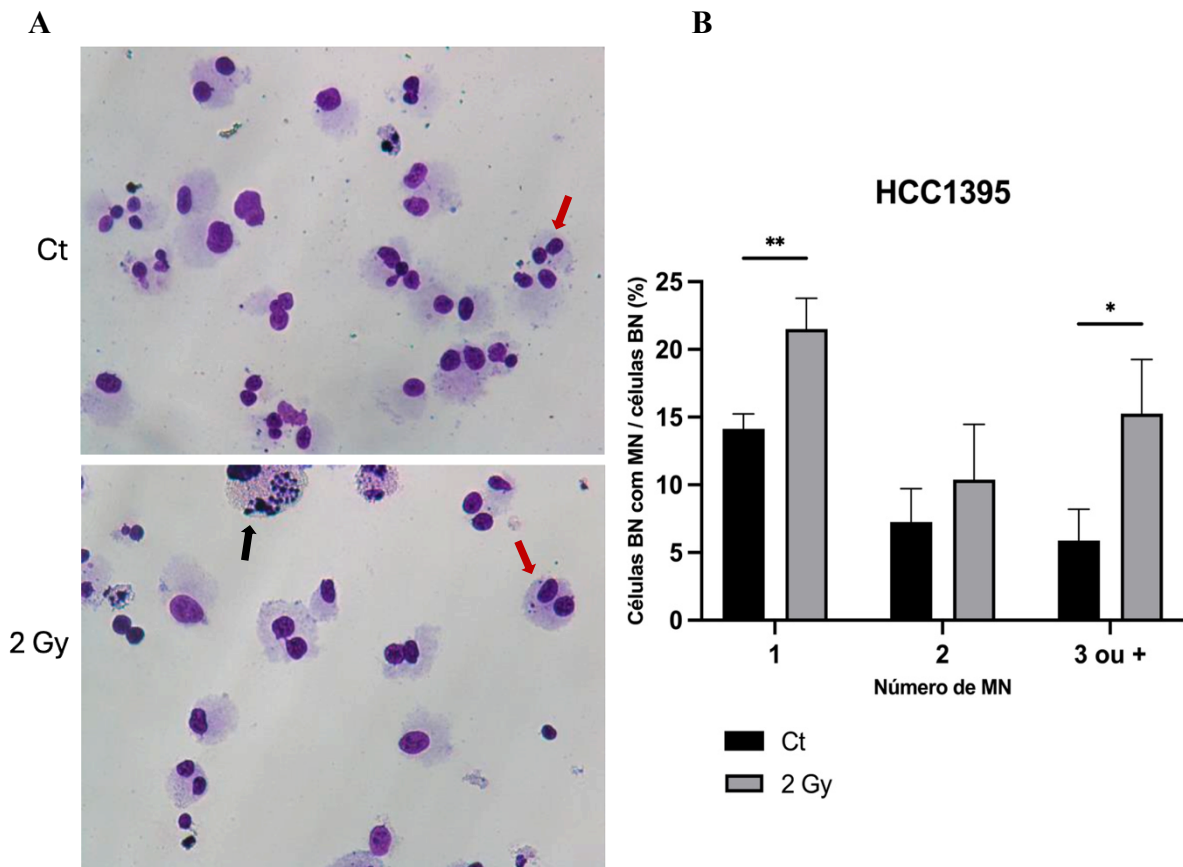


Figura 22 - Avaliação da genotoxicidade na linha celular HCC1395. A) Imagens representativas da presença de micronúcleos nas células HCC1395 binucleadas. As setas vermelhas sinalizam a presença de micronúcleos e a seta preta sinaliza uma célula em apoptose. B) Quantificação de micronúcleos em 200 células binucleadas. Os resultados (média±erro padrão) são expressos em percentagem de células binucleadas com 1, 2 ou pelo menos 3 micronúcleos por célula binucleada. A experiência foi realizada 2 vezes (n=2) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste t-Student não emparelhado.

Resultados

A análise entre as diferentes linhas celulares avaliadas (Figura 23) relativa ao grupo controle mostra um aumento ($p < 0,0001$) na percentagem de células binucleadas com um micronúcleo, de $3,03 \pm 1,64\%$ nas células HCC1806 para $14,13 \pm 1,11\%$ nas células HCC1395, com dois micronúcleos, de $0,57 \pm 0,39\%$ de células HCC1806 para $7,25 \pm 2,47\%$ de células HCC1395, e com três micronúcleos, de $0,10 \pm 0,11\%$ de células HCC1806 para $5,88 \pm 2,32\%$ de células HCC1395. Da linha celular HCC1395 para a linha celular HaCaT verificou-se, para todas as situações com micronúcleos, uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), variando de $14,13 \pm 1,11\%$ para $4,25 \pm 0,92\%$ nas células com um micronúcleo, de $7,25 \pm 2,47\%$ para $0,60 \pm 0,28\%$ nas células com dois micronúcleos, e de $5,88 \pm 2,32\%$ para $0,05 \pm 0,10\%$ com três micronúcleos.

De modo semelhante, nas células após exposição com a dose de 2 Gy, foram observados aumentos significativos ($p < 0,0001$) entre a percentagem de células com um, dois e três ou mais micronúcleos entre as linhas celulares HCC1806 e HaCaT. Entre a linha celular HCC1395 e a linha celular HaCaT verificou-se uma diminuição na percentagem de células com um micronúcleo, variando ($p < 0,0001$) de $21,50 \pm 2,27\%$ (HCC1395) para $9,70 \pm 4,15\%$ (HaCaT), com dois micronúcleos, variando de $10,38 \pm 4,09\%$ para $2,60 \pm 1,45\%$ ($p < 0,001$), e com pelo menos três micronúcleos, passando de $15,25 \pm 4,01\%$ para $1,55 \pm 0,87\%$ com 3 micronúcleos ($p < 0,0001$). Por outro lado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as células HCC1806 e as células HaCaT.

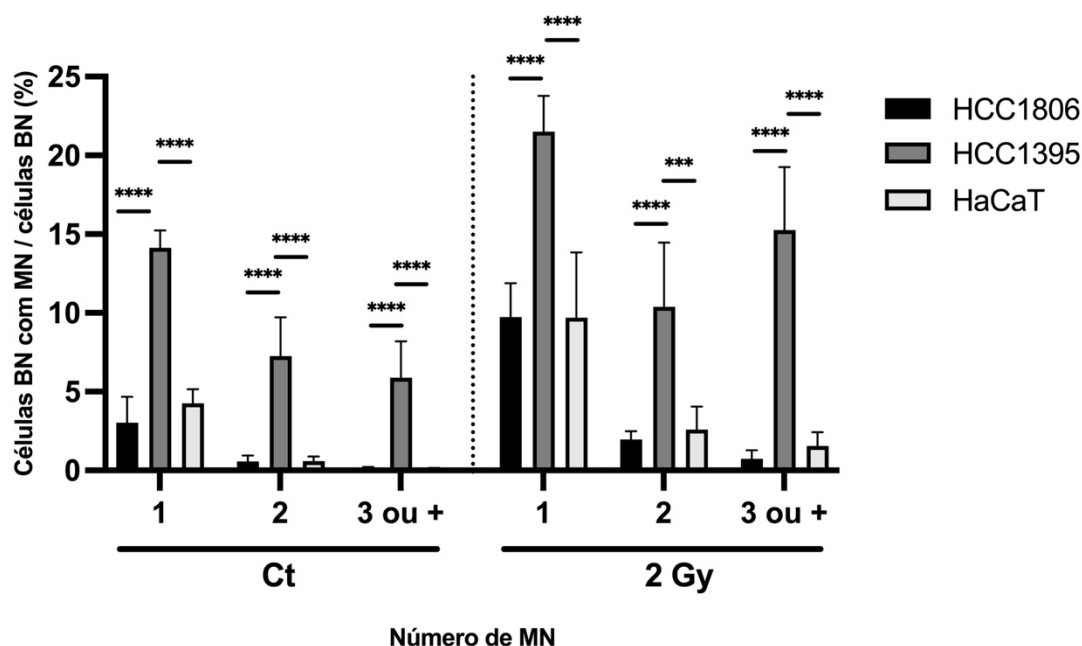


Figura 23 - Resultados da análise comparativa da genotoxicidade nas linhas celulares HCC1806, HCC1395 e HaCaT, através da quantificação de micronúcleos em células binucleadas. Os resultados são expressos em percentagem de células binucleadas com 1, 2 ou pelo menos 3 micronúcleos por célula binucleada. A experiência foi realizada pelo menos 2 vezes ($n \geq 2$) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste ANOVA de dois fatores com *post hoc Tukey's*..

4.5. Avaliação da migração celular

A migração celular nas células HCC1806, HaCaT e HCC1395 foi analisada através do *scratch assay*, calculando a percentagem de oclusão da fenda às 4, às 24, às 48 e às 72 horas após a realização da fenda, relativamente ao tempo 0.

O cálculo da área da fenda no *software* ImageJ, foi realizado utilizando um *plugin* automatizado denominado *Wound healing size tool* [96], específico para este cálculo. Para tal, em primeiro foi realizada a validação desta ferramenta automatizada, comparando-a com o método tradicional de delineamento manual da fenda realizado também no *software* ImageJ. Através da quantificação da fenda em células HaCaT às 4, 24, 48 e 72 horas, 3 dias após irradiação com as doses de exposição de 2, de 4 e de 5 Gy,

Resultados

e na condição controlo (Figura 24), verificou-se que não existiam diferenças significativas entre os valores obtidos, para cada condição em estudo, quando analisados através das duas metodologias. Na verdade, a diferença entre as médias obtidas pelo *plugin* e o método de delineamento manual variou entre $-0,54 \pm 1,45\%$ (4 h) e $0,35 \pm 0,35\%$ (72 h) para o controlo, entre $-0,11 \pm 0,09\%$ (72 h) e $0,89 \pm 0,77\%$ (24 h) para a dose de 2 Gy, entre $-0,77 \pm 1,22\%$ (4 h) e $3,58 \pm 2,13\%$ (48 h) para a dose de 4 Gy, e entre $0,16 \pm 0,78\%$ (4 h) e $3,346 \pm 1,834\%$ (48 h). É de notar que não se conseguiram obter dados suficientes às 72 horas para a dose de 5 Gy, não tendo sido possível realizar esta análise para estas condições.

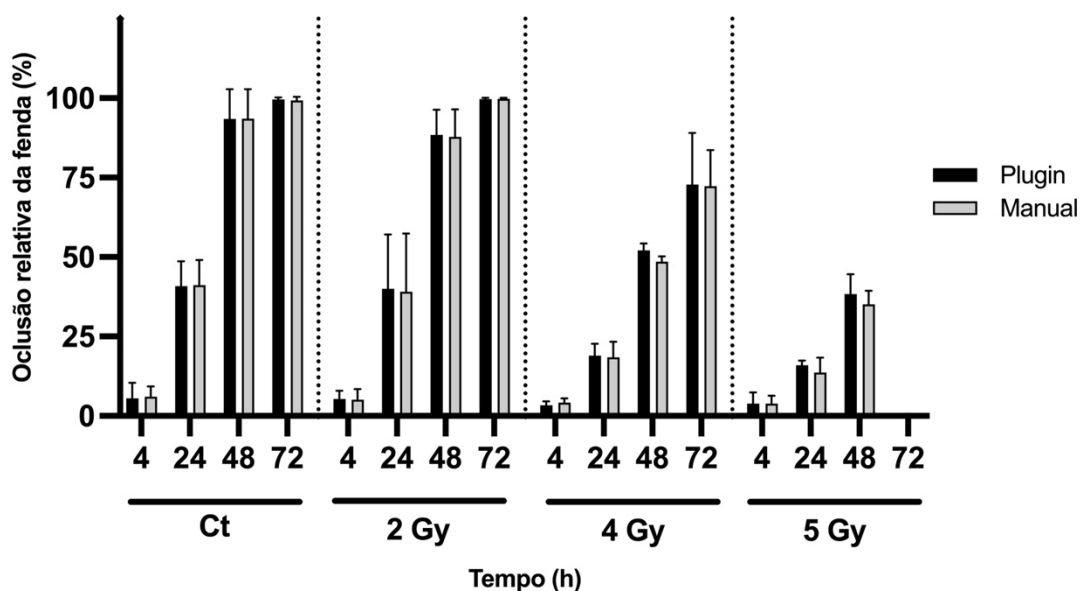


Figura 24 - Validação do *plugin Wound healing size tool* realizada através da comparação das medições obtidas através de dois métodos distintos para o cálculo da área da fenda: delineamento manual e uso do *plugin* no ImageJ. Os resultados expressam a percentagem de oclusão da fenda às 4 h, às 24 h, às 48 h e 72 h em relação ao tempo 0 (momento de realização da fenda) na linha celular HaCaT, após irradiação com 0 Gy (Ct), 2 Gy, 4 Gy e 5 Gy. A experiência foi realizada em triplicado para cada condição. Não foram verificadas diferenças significativas após análise pelo teste *t-Student* não emparelhado.

Resultados

Os resultados do efeito da irradiação na migração das células HCC1806 (Figura 25), das células HaCaT (Figura 26) e das células HCC1395 (Figura 27), avaliado durante 72h, 3 dias após exposição para as linhas celulares HCC1806 e HaCaT, e 4 dias após exposição aos raios-X para a linha celular HCC1806, mostram que, de um modo geral, o efeito da migração está depende da linha celular e da dose de exposição.

A avaliação dos efeitos da irradiação na migração das células HCC1806, apresentados na Figura 25, permitiu concluir que, de um modo geral, a migração celular apenas pareceu ser afetada pela exposição a uma dose de 4 Gy, pois não se verificou diminuição significativa na oclusão relativa da fenda após irradiação com doses de exposição de 2 e 3 Gy, comparativamente às células não irradiadas. De facto, os resultados mostram que três dias após a exposição das células a 4 Gy, em relação ao controlo, as células apresentaram uma diminuição na capacidade de migração, diminuindo significativamente a percentagem de oclusão relativa da fenda de $59,33 \pm 16,99\%$ para $25,91 \pm 10,51\%$ ($p < 0,01$) às 24 horas, de $75,23 \pm 15,25\%$ para $49,73 \pm 8,23\%$ ($p < 0,01$) às 48 horas e de $83,69 \pm 14,06\%$ para $59,13 \pm 9,47\%$ ($p < 0,01$) às 72 horas. Para além disso, às 24 horas, ocorreu um aumento estatisticamente significativo, relativamente à dose de exposição de 4 Gy ($25,91 \pm 10,51\%$), após uma dose de exposição de 2 Gy ($59,95 \pm 23,92\%$, $p < 0,01$) e após uma exposição de 3 Gy ($64,13 \pm 22,15\%$, $p < 0,05$). Às 48 horas, a percentagem da oclusão com a dose de exposição de 2 Gy ($80,47 \pm 18,14\%$) foi significativamente superior ($p < 0,01$) à percentagem de oclusão para a dose de exposição de 4 Gy. Ao tempo de incubação correspondente a 72 horas, a oclusão da fenda das células irradiadas com a dose de exposição de 4 Gy foi inferior tanto à oclusão da fenda associada à dose de exposição de 2 Gy ($90,30 \pm 11,91$, $p < 0,0001$) como à oclusão da fenda com a dose de exposição de 3 Gy ($89,52 \pm 17,09\%$, $p < 0,05$).

Resultados

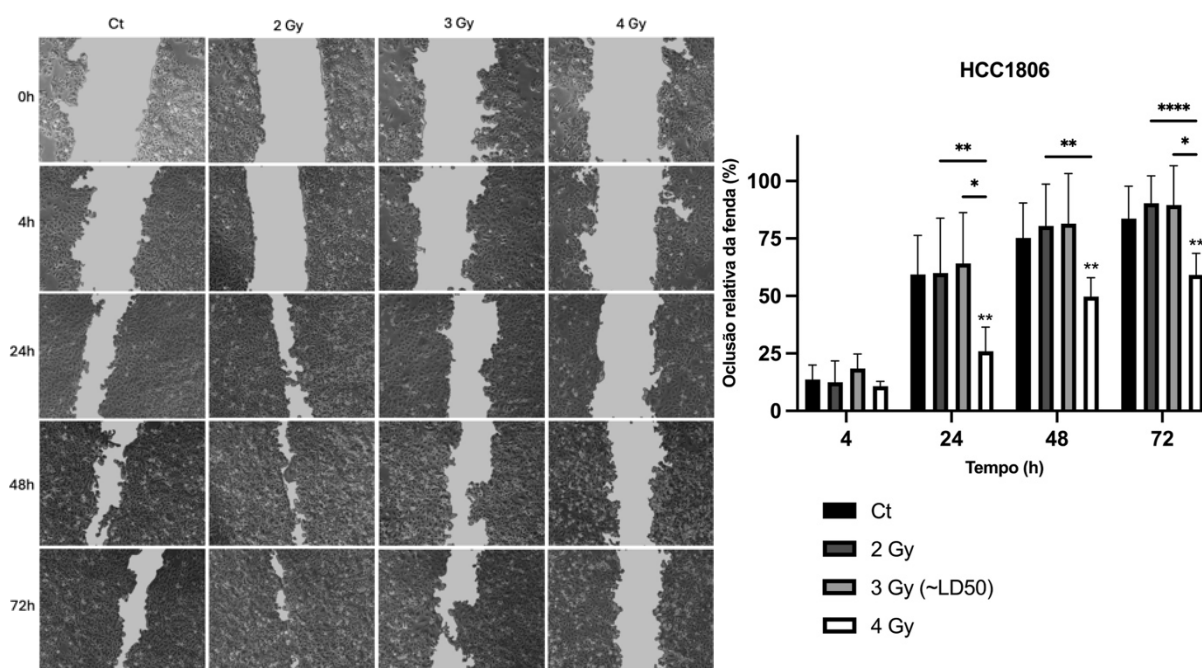


Figura 25 – Avaliação da migração das células HCC1806 após irradiação com doses de raios-X de 0 Gy (Ct), 2 Gy, 3 Gy e 4 Gy, avaliada através do ensaio do *scratch*. As imagens representativas de cada condição, capturadas com recurso a um microscópio ótico invertido (ampliação 100x), imediatamente (0 horas) ou às 4, 24, 48 e 72 horas após a realização da fenda estão apresentadas. A quantificação da migração celular foi realizada através do *plugin* automatizado do ImageJ e os resultados são apresentados como a percentagem de oclusão da fenda às 4 h, às 24 h, às 48 h e 72 h em relação ao tempo 0 (momento de realização da fenda). A experiência foi realizada 4 vezes (n=4) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste ANOVA de dois fatores com *post hoc Tukey's*.

De um modo geral, em relação à avaliação da migração celular da linha celular HaCaT (Figura 26), podemos observar uma diminuição da oclusão da fenda, ou seja, uma menor migração, associada ao aumento da dose de exposição, principalmente para doses mais elevadas. Para a dose de exposição de 5 Gy, ocorreu uma diminuição com significado estatístico da oclusão da fenda em relação às células não irradiadas às 24 horas, passando de $50,68 \pm 15,95\%$ para $26,52 \pm 13,25\%$ ($p < 0,05$), e às 48 horas, passando de $90,72 \pm 10,03\%$ para $52,94 \pm 19,34\%$ ($p < 0,05$). Às 48 horas, foi ainda registada uma percentagem de oclusão da fenda após irradiação com 2 Gy ($93,15 \pm 7,05\%$) significativamente superior à registada para a dose de exposição de 4 ($66,41 \pm 23,99\%$, $p < 0,05$) e de 5 Gy ($p < 0,05$). Às 4 h e às 72 horas não se registaram

Resultados

diferenças significativas entre os valores apresentados relativamente à oclusão da fenda para as diferentes doses de exposição.

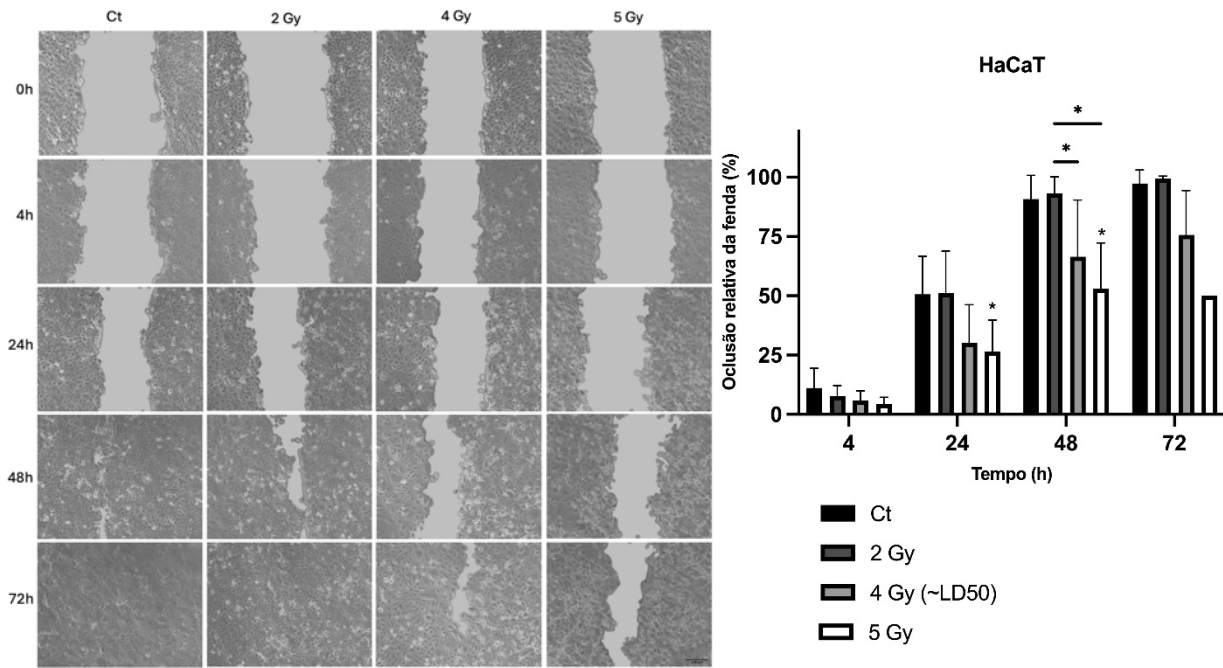


Figura 26 – Avaliação da migração das células HaCaT após irradiação com doses de raios-X de 0 Gy (Ct), 2 Gy, 4 Gy e 5 Gy, através do ensaio do *scratch*. As imagens representativas de cada condição, capturadas com recurso a um microscópio ótico invertido (ampliação 100x), imediatamente (0 horas) ou às 4, 24, 48 e 72 horas após a realização da fenda estão apresentadas. A quantificação da migração celular foi realizada através do *plugin* automatizado do ImageJ e os resultados são apresentados como a percentagem de oclusão da fenda às 4 h, às 24 h, às 48 h e 72 h em relação ao tempo 0 (momento de realização da fenda). A experiência foi realizada 4 vezes (n=4) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo modelo de efeitos mistos com *post hoc Tukey's*.

Da observação da Figura 27, podemos verificar que a migração celular das células HCC1395 não foi significativamente afetada pela exposição a uma dose de 2 Gy, parecendo haver uma tendência para um aumento da oclusão da fenda, ou seja, uma maior migração celular, em todos os tempos de análise à exceção das 48 horas. No entanto, não foram verificadas diferenças com significado estatístico.

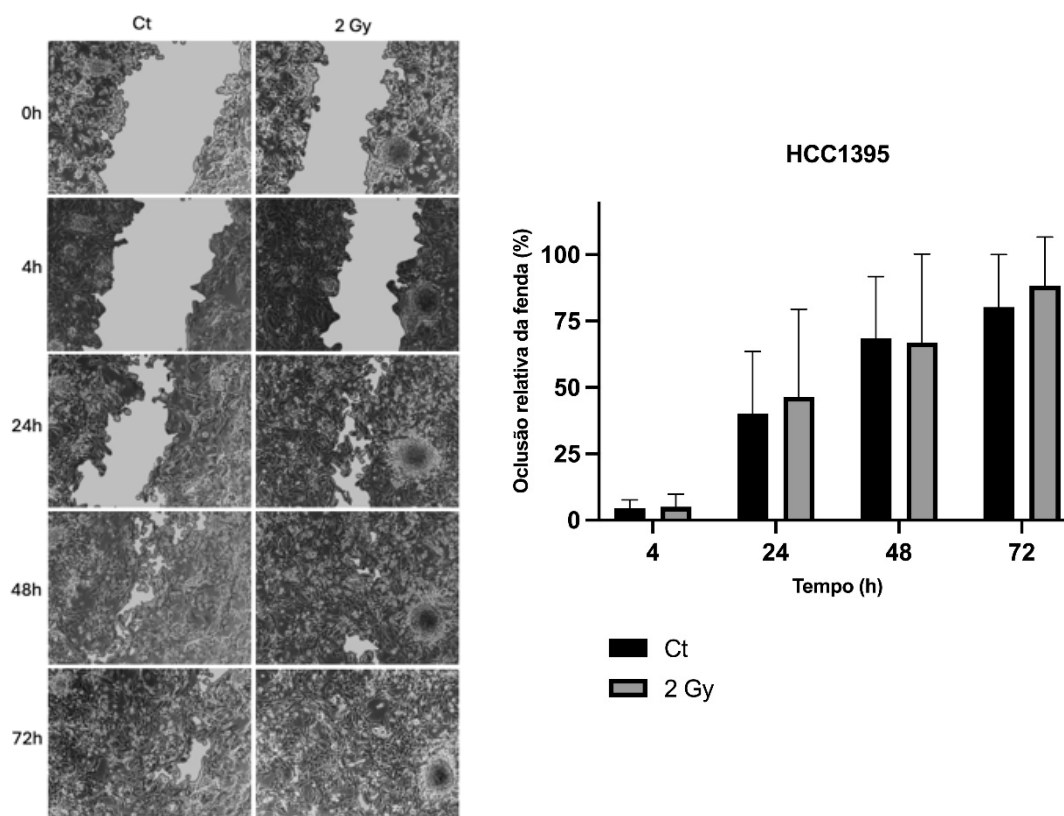


Figura 27 - Avaliação da migração das células HCC1395 após irradiação com doses de raios-X [0 (Ct) e 2 Gy] através do ensaio do *scratch*. As imagens representativas de cada condição, capturadas com recurso a um microscópio ótico invertido (ampliação 100x), imediatamente (0 horas) ou às 4, 24, 48 e 72 horas após a realização da fenda estão apresentadas. A quantificação da migração celular foi realizada através do *plugin* automatizado do ImageJ e os resultados são apresentados como a percentagem de oclusão da fenda às 4 h, às 24 h, às 48 h e 72 h em relação ao tempo 0 (momento de realização da fenda). A experiência foi realizada 4 vezes (n=4) em duplicado. Não foram verificadas diferenças significativas após análise pelo teste *t-Student* não emparelhado.

A Figura 28 representa os resultados da análise comparativa das diferentes linhas celulares (HCC1806, HCC1395 e HaCaT) na ausência de exposição à radiação (Ct) e após a exposição a 2 Gy. Após 4 horas, no que diz respeito ao grupo de células não irradiadas, grupo controlo, foi registada uma diminuição significativa ($p < 0,01$) na oclusão relativa da fenda entre as linhas celulares HCC1806 ($13,68 \pm 6,25\%$) e HCC1395 ($4,43 \pm 3,20\%$). Às 48 horas, as células HaCaT não irradiadas apresentaram um valor de oclusão significativamente superior ($90,72 \pm 10,03\%$, $p < 0,05$) às células HCC1395 não irradiadas ($68,44 \pm 23,32\%$). O mesmo aconteceu às 72 horas, em que as células HaCaT

Resultados

registaram um valor de oclusão de $97,38 \pm 5,65\%$, valor significativamente superior ($p < 0,05$) ao registado para as células HCC1395 ($80,26 \pm 19,79\%$). No entanto, no grupo de células sujeitas à dose de exposição de 2 Gy, não foram registadas diferenças estatisticamente significativas entre as linhas celulares para nenhum tempo de avaliação após exposição à radiação ionizante.

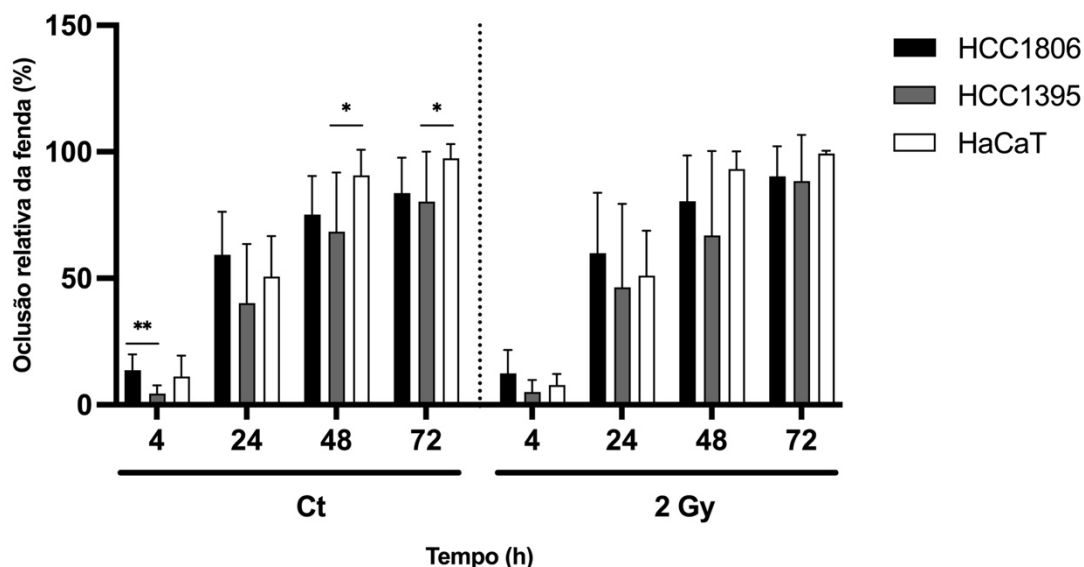


Figura 28 - Resultados da análise comparativa da avaliação da migração entre as células HCC1806, HCC1395 e HaCaT após irradiação com doses de raios-X de 0 Gy (Ct) e 2 Gy, através do ensaio do *scratch*. A quantificação da migração celular foi realizada através do *plugin* automatizado do ImageJ e os resultados são apresentados como a percentagem de oclusão da fenda às 4 h, às 24 h, às 48 h e 72 h em relação ao tempo 0 (momento de realização da fenda). A experiência foi realizada 4 vezes (n=4) em duplicado. As diferenças significativas entre as doses estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo modelo de efeitos mistos com *post hoc Tukey's*.

Discussão

A síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário é uma doença autossómica dominante, maioritariamente associada a mutações patogénicas nos genes *BRCA1* e/ou *BRCA2*, cuja incidência é de 1 em cada 300 indivíduos [6]. Quando comparados com a população em geral, os indivíduos portadores de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* apresentam uma predisposição aumentada para desenvolvimento de cancro, ao longo da sua vida. Este risco é ainda maior quando se trata da probabilidade de desenvolver cancro da mama e do ovário [51]. Uma vez que os genes *BRCA1* e *BRCA2* estão envolvidos nas vias de reparação de lesões no DNA, a presença de mutações patogénicas nestes genes tem de ser tida em conta na escolha das abordagens terapêuticas a ser utilizadas em doentes com cancro da mama, podendo influenciar o prognóstico [97].

A radioterapia é utilizada como abordagem terapêutica em cerca de 50% dos doentes oncológicos, sendo utilizada para fins curativos em cerca de 60%. Um importante aspeto a ter em conta é a radiosensibilidade associada aos tecidos normais, também eles expostos à radiação nas diferentes modalidades de radioterapia, nomeadamente a radioterapia de fonte externa [98]. A pele corresponde a um dos tecidos mais afetados pela exposição a radiação ionizante, devido às suas características biológicas, mas principalmente porque constitui a primeira barreira na irradiação externa. De facto, as manifestações induzidas pela radiação ionizante na pele estão presentes em aproximadamente 95% dos doentes submetidos a radioterapia de fonte externa [53]. Deste modo, torna-se importante encontrar um equilíbrio entre a irradiação das células tumorais e a minimização dos efeitos adversos induzidos pela radiação nos tecidos saudáveis, nomeadamente na pele. Este equilíbrio pode ser encontrado através de recurso a radioterapia guiada por imagem ou da radioterapia de intensidade modulada [99].

A avaliação dos efeitos induzidos pela radiação ionizante, decorrente da radioterapia de fonte externa, foi realizada *in vitro*, após exposição a várias doses de raios-X (0 – 10 Gy) em células de cancro da mama, em células não tumorais da pele e em células linfoblastoides imortalizadas a partir de indivíduos portadores e não portadores de mutações nos genes *BRCA1/2*. Em específico, foram utilizadas três linhas celulares, uma de cancro da mama triplo negativo associada a uma mutação no gene *BRCA1* (HCC1395), uma de cancro da mama triplo negativo sem mutação nos genes *BRCA1/2* (HCC1806) e uma linha celular de queratinócitos da pele (HaCaT). Para além disso, o estudo de radiosensibilidade também incluiu três linhas celulares linfoblastoides (LCLs) imortalizadas a partir de culturas primárias, uma de um indivíduo portador de mutação

no gene *BRCA1* (LCL 105), outra de um indivíduo portador de mutação no gene *BRCA2* (LCL 109) e outra de um não portador de mutação nos genes *BRCA1/2* (LCL 114).

O cancro da mama é uma doença heterogênea, podendo apresentar diversos perfis histológicos e de expressão gênica, o que influencia o comportamento e a resposta do tumor à terapêutica e, conseqüentemente, o prognóstico [51]. O cancro da mama triplo negativo representa cerca de 10 a 20% dos câncros da mama e é caracterizado por não expressar nenhum dos três tipos de recetores, os recetores de estrogénio, os recetores de progesterona ou o recetor HER2 (recetor 2 do fator de crescimento epidérmico humano), constituindo o subtipo molecular com pior prognóstico. Este subtipo de cancro apresenta tumores com um comportamento bastante agressivo e com uma elevada capacidade de proliferação [70].

A sobrevivência das células HCC1806 foi avaliada 12 dias após exposição a doses de raios-X (0 – 10 Gy), verificando-se uma diminuição da sobrevivência com o aumento da dose de exposição à radiação ionizante. A dose letal média (DL_{50}) desta linha celular, valor de dose de radiação capaz de induzir a morte celular de metade da população inicial, obtida através do ajuste ao modelo linear quadrático, registou um valor de 2,92 Gy (IC95%: [2,802; 3,045]). Os resultados da viabilidade celular, obtidos 7 dias após exposição à radiação, permitem afirmar que a irradiação das células HCC1806 com doses de exposição a raios-X induziu uma diminuição da percentagem de células viáveis, a qual foi acompanhada pelo aumento de morte celular. Esta diminuição na população de células viáveis é proporcional ao aumento da dose de exposição.

No caso da linha celular HCC1395 não foi possível obter resultados que permitissem aferir sobre a sobrevivência celular. Assim, não foi possível realizar o ensaio de formação de colónias, mesmo após várias tentativas de otimização. Os resultados obtidos poderão ser explicados pelo longo período de duplicação desta linha celular e, principalmente, pela baixa eficiência de placa no ensaio de formação de colónias. O fator de sobrevivência celular a 2 Gy (FS2), que representa a proporção de células que sobrevive a uma dose de exposição de 2 Gy, é comumente usado como marcador biológico na avaliação da radiosensibilidade tumoral e de tecidos normais [100]. Mesmo após um período de incubação correspondente a cerca de 24 dias, não foi possível observar a formação de colónias após irradiação das células HCC1395 com 2 Gy de dose de exposição, nem na condição controlo, ou seja, na ausência de irradiação. De acordo

com Schröder-Heurich *et al.* (2014) observa-se um reduzido valor de eficiência de placa, de cerca de 2%, ou seja, apenas cerca de 2% das células semeadas são capazes de sobreviver e formar colônias. Este estudo relata danos consideráveis nesta linha celular, mesmo sem o efeito da exposição a agentes citotóxicos, que podem estar associados à presença de mutação no gene *NBN*, gene da síndrome de quebras de Nijmegen. A perda da função da proteína associada a este gene pode desencadear deficiências na reparação das quebras de cadeia dupla da DNA (DSBs), uma vez que é responsável pelo recrutamento da quinase ATM para os locais onde ocorrem as lesões. Para além disso, para que ocorra uma reparação correta da lesão no DNA, é necessário que interaja com a histona H2AX fosforilada [101]. Na verdade, a reduzida viabilidade observada nesta linha celular, avaliada sete dias após a irradiação, também pode ser assim justificada. As células não sujeitas a doses de raios-X apresentaram uma viabilidade celular de $60,33 \pm 2,66\%$, o que pode ser justificado pelas razões anteriormente apresentadas. Considerando que a baixa viabilidade e a incapacidade de formação de colônias das células HCC1395 se verifica tanto após exposição à radiação ionizante como na ausência da exposição (0 Gy), postula-se a hipótese de que estes resultados podem ser justificados pela presença da mutação no gene *BRCA1*, gene envolvido nas vias de reparação de lesões no DNA e, consequentemente, responsáveis por reparar qualquer tipo de lesões e não só as induzidas pela radiação ionizante.

De modo semelhante ao ocorrido com as células HCC1806, a exposição a doses compreendidas entre os 0 e os 10 Gy de raios-X levou a uma diminuição da sobrevivência das células HaCaT, cujo valor da DL_{50} foi de 3,64 Gy (IC95%: [3,49; 3,80]). A viabilidade desta linha celular registou uma diminuição, à medida que a dose de exposição ia aumentando, correspondendo ao que seria esperado.

A sobrevivência celular após exposição a doses de radioterapia de fonte externa descreve tipicamente uma curva linear quadrática, sendo o que melhor se parece ajustar aos dados clínicos e experimentais [102,103]. O modelo de agressão celular que melhor se ajustou ao conjunto dos resultados, tanto da linha celular HCC1806 como da linha celular HaCaT, foi o modelo linear quadrático. Os valores do coeficiente de determinação (R^2), correspondente a 0,98 para as células HCC1806 e 0,97 para as células HaCaT, corroboram o bom ajuste deste modelo ao conjunto de resultados obtidos, uma vez que correspondem a valores bastante próximos da unidade. A parte inicial da curva, descrita pela exposição a doses mais baixas, é dominada pelo parâmetro α . Relativamente à razão

α/β , que define a curvatura do ajuste, as células com um reduzido valor de α/β demonstram uma curvatura mais acentuada, associada a uma maior radiosensibilidade, enquanto uma razão α/β mais elevada descreve uma curva com um comportamento mais linear (menor radiosensibilidade) [44]. De facto, tanto para a linha celular HCC1806 como para a linha celular HaCaT, a razão α/β assumiu valores absolutos bastante reduzidos, um valor de 0,193 Gy para as células HCC1806 e um valor de 0,375 Gy para as células HaCaT. Assim, tendo por base os valores da razão α/β , a linha celular HCC1806 demonstra uma maior radiosensibilidade quando comparada com a linha celular HaCaT, dado que apresenta um menor valor da razão α/β .

Por outro lado, através dos valores da DL_{50} , constata-se que existe uma maior radiosensibilidade associada às células HCC1806, em comparação com as células HaCaT, uma vez que apresenta um valor da DL_{50} significativamente inferior ao das células HaCaT. Chumsuwan *et al.* (2022) apresentam resultados que parecem associar uma maior radiosensibilidade à linha celular MDA-MB-231, uma linha celular de cancro da mama triplo negativo, em comparação com a linha celular HaCaT, após exposição a 1, 2, 5, 10 e 15 Gy de raios-X com um acelerador com energia de 6 MV [104]. Estes resultados parecem ser bastante promissores para a prática clínica, uma vez que parecem indicar que se consegue obter o resultado desejado com doses mais baixas, minimizando os efeitos secundários nos tecidos saudáveis, neste caso a pele. Comparando as mesmas doses a que ambas as linhas celulares foram expostas (0 Gy, 2 Gy e dose correspondente à DL_{50}), constata-se que a viabilidade celular da linha celular HaCaT foi sempre superior à da linha celular HCC1806, apenas tendo sido registadas diferenças significativas para a exposição a uma dose de 2 Gy.

Para além disso, verificou-se que, sete dias após a irradiação, a média da viabilidade das células HCC1806 após exposição a 3 Gy correspondeu a 58,75%, e após exposição a 4 Gy correspondeu a 57,13%. De forma semelhante, para as células HaCaT, a população média de células viáveis foi de 66,00% para uma dose de 4 Gy, e de 51,63 % para uma dose de 5 Gy. Assim, observou-se uma viabilidade superior a 50% quando as células foram irradiadas com a dose correspondente à DL_{50} , ou seja, 3 Gy para as células HCC1806 e de 4 Gy para as células HaCaT. Deste modo, o tempo de avaliação após a exposição a radiação ionizante pode estar na base desta discrepância de resultados. Na verdade, a viabilidade celular em ambas as linhas celulares foi avaliada sete dias após a irradiação, enquanto a avaliação da sobrevivência celular foi avaliada no período de 10 e

de 12 dias para as células HCC1806 e HaCaT, respetivamente. Para além disso, os tempos de duplicação das células também pode justificar esta discrepância de resultados entre ensaios, uma vez que as células viáveis podem sofrer divisão, dando origem a novas células, o que terá influência na sobrevivência e viabilidade celulares.

As linhas celulares linfoblastoides usadas neste estudo foram geradas através da infecção *in vitro* de linfócitos B do sangue periférico de indivíduos portadores e não portadores de mutações nos genes *BRCA1/2* com o vírus *Epstein-Barr*. Este método de obtenção de LCLs é amplamente usado, estando associado a uma elevada taxa de sucesso. Estas linhas celulares apresentaram uma elevada capacidade de proliferação, constituindo uma fonte de DNA ilimitada do indivíduo em causa. Deste modo, recorrendo às LCLs, foi possível continuar a investigação pretendida e, simultaneamente, evitar a constante colheita de sangue. A literatura constata que estas linhas celulares são de fácil manutenção [105]. No entanto, a avaliação da viabilidade e do perfil de morte celular das LCLs utilizadas neste estudo permitiu constatar uma baixa viabilidade destas células, não tendo sido possível continuar a avaliação dos efeitos induzidos pela radiação ionizante nestas linhas celulares. A reduzida viabilidade celular foi acompanhada principalmente por morte celular por apoptose tardia e necrose. Estes resultados parecem contradizer a facilidade associada à cultura e manipulação destas células. No entanto, podem também ser justificados pelo facto de estas células terem sido submetidas a criopreservação. De facto, o descongelamento de células após criopreservação a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pode ser responsável pela indução da morte celular entre 6 horas até alguns dias após o descongelamento, devido ao stresse físico e químico a que as linhas celulares podem estar sujeitas. O descongelamento após criopreservação parece induzir a morte celular por apoptose em vários tipos de células, nomeadamente em fibroblastos e células mononucleares do sangue periférico. Por outro lado, a morte celular por necrose pode ocorrer devido a choque osmótico e hipotermia, podendo estar associada a más práticas de criopreservação [106]. Deste modo, talvez seja relevante proceder a estudos de radiosensibilidade com LCLs após a sua imortalização, antes de proceder à sua criopreservação, ou até mesmo adotar outros protocolos de criopreservação. De denotar que a linha celular LCL 114, proveniente de um indivíduo sem mutação nos genes *BRCA1/2*, foi a que apresentou maior viabilidade celular (70%). Assim, o facto de que as LCLs aqui estudadas seguiram o mesmo protocolo de criopreservação parece indicar que a presença de mutações nos

genes *BRCA1* ou *BRCA2* pode afetar a viabilidade celular, independentemente da influência da radiação ionizante.

Para a linha celular HCC1806 observou-se principalmente um perfil de morte celular associado a apoptose inicial e a apoptose tardia/necrose. Por outro lado, na linha celular HaCaT podemos verificar que ocorreu predominantemente morte por apoptose inicial, que aumentou à medida que aumentou a dose de radiação. Na verdade, neste estudo, a percentagem de células não irradiadas em apoptose correspondeu a $7,00 \pm 2,07\%$, enquanto Qian *et al.* (2020) regista uma percentagem inferior a 5%. Por outro lado, o mesmo estudo, para uma dose de exposição de 8 Gy, regista entre 20 e 25% de células em apoptose, enquanto os resultados por nós obtidos registam esses valores para uma dose de 4 Gy [107].

Postula-se que a desregulação do ciclo celular é o primeiro passo para a carcinogénese. O ciclo celular é composto pela fase G0, pela fase G1, pela fase S, pela fase G2 e pela fase M, sendo a sua progressão regulada pelos denominados *checkpoints*, pontos de controlo presentes entre as diferentes fases. Estes *checkpoints* precisam de garantir determinadas condições para que ocorra progressão no ciclo celular, pelo que falhas nestes pontos de controlo podem desencadear crescimento anormal das células, bloquear a progressão do ciclo celular e levar à morte celular [108,109]. Ao analisar as alterações no ciclo celular induzidas pela exposição a doses de radioterapia, observou-se um bloqueio na fase S para ambas as linhas celulares HaCaT e HCC1806. Para além disso, verificou-se ainda um bloqueio na fase G2/M das células HaCaT. Na linha celular HCC1806, o aumento significativo do pico apoptótico (fase pré-G0) induzido pela exposição a doses de raios-X pode indicar morte celular por apoptose [110], o que corrobora os resultados do perfil de morte celular.

A proteína ATM é ativada em resposta a quebras de cadeia dupla do DNA (DSBs) enquanto a ATR é ativada pela presença de quebras de cadeia simples do DNA (SSBs). Estas proteínas desempenham um papel importante na regulação do ciclo celular durante os *checkpoints*. Quando são detetadas lesões no DNA durante a fase G2, as quinases ATM ou ATR ativam as quinases CHK2 e CHK1, presentes no *checkpoint*, bloqueando a entrada das células na fase M. Deste modo, um bloqueio na fase G2/M é um possível indicador de DSBs e/ou SSBs [111].

O ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese é de extrema importância para a avaliação dos efeitos induzidos pela radiação, permitindo analisar danos

cromossômicos e lesões no DNA. A formação dos micronúcleos, estruturas que resultam de cromossomas ou fragmentos destes que ficam retidos na anáfase, ocorre durante a mitose. Para além disso, este ensaio constitui ainda uma importante ferramenta no ramo da radiobiologia ao possibilitar a aferição de doses de exposição acidental [90,104,112,113].

Os resultados da quantificação de micronúcleos (MN) em células binucleadas com bloqueio da citocinese, 5 dias após exposição à radiação, permitiram constatar que, de um modo geral, para todas as linhas celulares (HCC1806, HaCaT e HCC1395), a exposição a uma dose de 2 Gy de raios-X induziu o aumento da percentagem de células binucleadas com um, dois ou três ou mais micronúcleos.

Em específico, nas células HCC1806 expostas a uma dose de 2 Gy, relativamente às células não irradiadas, foram registados aumentos significativos na percentagem de células binucleadas com um micronúcleo ($p < 0,001$), dois micronúcleos ($p < 0,001$), e pelo menos três micronúcleos ($p < 0,05$). Neste caso, a maior diferença foi registada na população de células com um micronúcleo, passando de $3,03 \pm 1,64\%$ (0 Gy) para $9,73 \pm 2,15\%$ (2 Gy).

Para a linha celular HCC1395, no grupo controlo, estava presente uma elevada percentagem de células com micronúcleos. Embora estes resultados não consigam explicar a reduzida viabilidade associada a estas células, uma vez que a presença de micronúcleos não está associada a morte celular, este ensaio permite aferir acerca da viabilidade celular através da observação da morfologia das células observadas ao microscópio. As células HCC1395 apresentavam características morfológicas que podem ser associadas a morte por apoptose e necrose. Uma grande parte das células apresentavam perturbações na membrana plasmática, que são normalmente associadas a morte celular por apoptose, e rutura da membrana devido ao alargamento dos organelos, associada a morte celular por necrose [114]. A reduzida quantidade de células identificadas nas lâminas também pode estar associada à reduzida viabilidade. Na verdade, apenas foi possível analisar 200 células HCC1395 binucleadas por lâmina.

Comparativamente às células HaCaT não irradiadas, após uma exposição a 2 Gy, a percentagem de células binucleadas com três ou mais micronúcleos aumentou de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Para as células binucleadas com um micronúcleo e dois micronúcleos, embora tenha sido registado um aumento na proporção de células

binucleadas com MN, não foram registadas diferenças significativas entre as condições de irradiação.

Tendo como base a análise comparativa entre as diferentes linhas celulares para uma mesma dose de exposição, verifica-se que, tanto para as células não irradiadas como para as células sujeitas a uma dose de 2 Gy, a quantificação de micronúcleos nas células HCC1806 e HaCaT não se altera de forma estatisticamente significativa.

Considerando que a metastização ocorre quando as células tumorais adquirem a capacidade de invasão e de migração e que esta capacidade pode ser afetada pela exposição à radiação ionizante [115], considerou-se relevante avaliar o efeito induzido pela radiação ionizante. A realização desta avaliação foi conduzida também para as células da pele, visto que este tecido é o primeiro a ser afetado pela exposição à radiação ionizante e que os queratinócitos da pele são células altamente proliferativas responsáveis pela cicatrização de lesões [116].

Para além de mais demorado, o cálculo da fenda através do delineamento manual iria trazer alguns desafios como a necessidade de uma maior interação humana, ou seja, o cálculo iria depender largamente da abordagem da pessoa encarregada de proceder ao delineamento da fenda. A validação do *plugin* utilizado para o cálculo automatizado da área da fenda foi realizada para a linha celular HaCaT, não tendo sido verificadas diferenças significativas entre o método de delineamento manual da fenda e o uso do *plugin* no ImageJ. Apesar de este *plugin* permitir o cálculo simultâneo num conjunto de imagens, de modo a obter resultados mais fidedignos, a avaliação foi realizada imagem a imagem. Para além disso, o *plugin* também permite modificar alguns parâmetros de modo a ajustar-se melhor ao formato da fenda. A validação do *plugin* também foi realizada pelos autores [96].

A migração celular das células HCC1806, avaliada através do ensaio *scratch*, foi mais acentuada para doses de raios-X mais baixas (0 Gy e 2 Gy), ou seja, um aumento da dose de exposição pareceu levar à diminuição da capacidade de migração destas células tumorais ao longo do tempo, especialmente após exposição a uma dose de 4 Gy. De facto, após exposição a 4 Gy, em relação às células não irradiadas, ocorreu uma diminuição significativa da percentagem da oclusão relativa da fenda para todos os tempos de avaliação excetuando às 4 horas. O mesmo foi verificado, de um modo geral, na análise da migração celular das células HaCaT, constatando-se que a exposição a raios-X induziu uma diminuição da migração celular, sendo que este aumento foi estatisticamente

significativo para a dose de 5 Gy em relação às células controle. Por outro lado, a exposição a 2 Gy, em comparação com as células não irradiadas, não pareceu afetar a migração celular das células HCC1395, não se tendo observado diferenças estatisticamente significativas.

A reprodutibilidade no ensaio do *scratch* é essencial, podendo ter um impacto na migração celular [117]. A baixa reprodutibilidade do ensaio do *scratch*, refletida nos elevados valores de erro-padrão registados na análise da oclusão relativa da fenda para as três linhas celulares, pode estar associada à dificuldade de localização exata do local da fenda ao longo dos diferentes períodos de avaliação da migração celular ou ainda à influência da proliferação celular. Poderão ainda ter sido observados restos celulares nos limites da fenda, resultantes da realização da fenda, que poderão ter sido confundidos com células e, conseqüentemente, ter sido realizado um cálculo errado da área da fenda.

Conclusão e perspectivas futuras

O objetivo central deste projeto consistiu em esclarecer o efeito de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em resposta à exposição a radiação ionizante decorrente da radioterapia de fonte externa, em específico a doses de exposição de raios-X com energia de 6 MV. Tendo este objetivo em vista, foram realizados estudos *in vitro* em duas linhas celulares de cancro da mama triplo negativo, com e sem mutação no gene *BRCA1*, e em linhas celulares linfoblastoides (LCLs) imortalizadas de indivíduos portadores e não portadores de mutações nestes genes. Visto que, nesta abordagem terapêutica, a pele é a primeira barreira que a radiação encontra durante o seu percurso, considerou-se, por isso, também importante clarificar os efeitos biológicos induzidos pela exposição em queratinócitos da pele.

Os resultados obtidos constataam que a radiação ionizante induziu uma diminuição da sobrevivência celular, tanto na linha celular de cancro da mama sem mutação no gene *BRCA1* (HCC1806) como na linha celular de queratinócitos da pele (HaCaT), realçando uma maior radiosensibilidade, com significado estatístico, das células de cancro da mama HCC1806. Adicionalmente, a exposição à radiação ionizante (raios-X) levou à diminuição da viabilidade celular em ambas as linhas celulares, sendo esta diminuição proporcional ao aumento da dose de exposição. A diminuição da viabilidade celular estava associada a um aumento da morte celular por apoptose inicial e apoptose tardia/necrose na linha celular de cancro da mama (HCC1806), enquanto, na linha celular de queratinócitos (HaCaT), após exposição às doses de raios-X, o perfil de morte celular correspondeu predominantemente a apoptose inicial. Mesmo após várias tentativas de otimização, nomeadamente da concentração e do tempo de incubação das células semeadas, não foi possível avaliar a sobrevivência da linha celular de cancro da mama com mutação *BRCA1* (HCC1395), uma vez que não demonstraram a capacidade de formação de colónias. Para além disso, a reduzida viabilidade celular das três LCLs em estudo não expostas à radiação, não permitiu a continuidade da avaliação dos efeitos biológicos induzidos pela exposição a raios-X.

A avaliação da genotoxicidade, através da análise da presença de micronúcleos, permitiu concluir que a radiação ionizante conduziu ao aumento do número de micronúcleos observados em ambas as linhas celulares de cancro da mama, HCC1806 e HCC1395, e, ainda, na linha celular não tumoral de queratinócitos. Os resultados associam uma maior genotoxicidade à linha de cancro da mama com mutação *BRCA1* (HCC1395), refletida no elevado número de micronúcleos. No entanto, não é possível

esclarecer se este efeito pode ser explicado pela radiosensibilidade à radiação ionizante, uma vez que o mesmo também acontece em células HCC1395 não expostas à radiação ionizante.

Os efeitos da exposição das células às doses de raios-X em estudo afetou também a capacidade de migração celular das células de cancro da mama sem mutação (HCC1806) e na linha celular de queratinócitos da pele (HaCaT), ao longo do tempo. No que diz respeito à linha celular de cancro da mama com mutação no gene *BRCA1* (HCC1395), a migração celular não foi afetada de forma significativa pela exposição à radiação ionizante. É ainda de realçar que, após a exposição às doses de raios-X em estudo, a presença da mutação no gene *BRCA1* não pareceu afetar a migração celular, o que aponta para uma certa radiorresistência destas células.

Em suma, os ensaios realizados com as linhas celulares humanas de cancro da mama não permitiram clarificar se a mutação nos genes *BRCA1/2* poderá influenciar a resposta à radiação ionizante, dado que não se consegue garantir que os efeitos observados na linha celular HCC1395 (com mutação *BRCA1*) se devem ao impacto da mutação perante a exposição à radiação.

Considerando os resultados obtidos, como perspectiva futura deverá ser incluída uma maior amostra de LCLs, revistas as condições ótimas para a realização de ensaios com estas células, de forma a garantir a viabilidade das células previamente à irradiação e, por consequente, permitindo o estudo da radiosensibilidade. Uma vez que os resultados da viabilidade celular da linha celular de cancro da mama com mutação *BRCA1* não foram favoráveis, torna-se crucial a realização de técnicas alternativas para avaliar a radiosensibilidade desta linha celular. De facto, esta linha celular pode não ter sido a mais adequada para o estudo realizado e talvez seja relevante incluir outras linhas celulares de cancro da mama com mutação nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* e, adicionalmente, linhas não tumorais de tecido mamário, como a linha celular 184B5.

Bibliografia

Bibliografia

1. What Is Cancer? - NCI. Updated October 11, 2021. Accessed January 13, 2023. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
2. Brown GR, Simon M, Wentling C, Spencer DM, Parker AN, Rogers CA. A review of inherited cancer susceptibility syndromes. *JAAPA*. 2020;33(12):10-16. doi:10.1097/01.JAA.0000721648.46099.2C
3. Wang Q. Cancer predisposition genes: molecular mechanisms and clinical impact on personalized cancer care: examples of Lynch and HBOC syndromes. *Acta Pharmacol Sin*. 2016;37(2):143-149. doi:10.1038/APS.2015.89
4. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(4):820-823. doi:10.1073/PNAS.68.4.820
5. De G, Terapêutica O. Para cuidar de si! INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DO PORTO FRANCISCO GENTIL, EPE.
6. Paluch-Shimon S, Cardoso F, Sessa C, et al. Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention and screening. *Ann Oncol*. 2016;27(suppl 5):v103-v110. doi:10.1093/ANNONC/MDW327
7. Yoshida R. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): review of its molecular characteristics, screening, treatment, and prognosis. *Breast Cancer*. 2021;28(6):1167-1180. doi:10.1007/S12282-020-01148-2
8. Berger ER, Golshan M. Surgical Management of Hereditary Breast Cancer. *Genes (Basel)*. 2021;12(9). doi:10.3390/GENES12091371
9. Clark SL, Rodriguez AM, Snyder RR, Hankins GDV, Boehning D. Structure-Function of the Tumor Suppressor BRCA1. *Comput Struct Biotechnol J*. 2012;1(1):e201204005. doi:10.5936/CSBJ.201204005
10. Allain DC. Genetic Counseling and Testing for Common Hereditary Breast Cancer Syndromes: A Paper from the 2007 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J Mol Diagn*. 2008;10(5):383. doi:10.2353/JMOLDX.2008.070161
11. Vicente R, Alpuim Costa D, Vitorino M, Mendes AD, Santos C, Fontes-Sousa M. Mutation Patterns in Portuguese Families with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. *Cancers (Basel)*. 2022;14(19). doi:10.3390/CANCERS14194717
12. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2019;30(8):1194-1220. doi:10.1093/ANNONC/MDZ173
13. Yamauchi H, Takei J. Management of hereditary breast and ovarian cancer. *Int J Clin Oncol*. 2018;23(1):45-51. doi:10.1007/S10147-017-1208-9
14. Huber-Keener KJ. Cancer genetics and breast cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2022;82:3-11. doi:10.1016/j.bpobgyn.2022.01.007

Bibliografia

15. Sessa C, Balmaña J, Bober SL, et al. Risk reduction and screening of cancer in hereditary breast-ovarian cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guideline ☆. *Annals of Oncology*. 2023;34(1):33-47. doi:10.1016/J.ANNONC.2022.10.004/ATTACHMENT/305287EE-1213-417F-9A4C-2BB82CBE94CA/MMC1.PDF
16. Mohan Shankar G, Swetha M, Keerthana CK, Rayginia TP, Anto RJ. Cancer Chemoprevention: A Strategic Approach Using Phytochemicals. *Front Pharmacol*. 2022;12. doi:10.3389/FPHAR.2021.809308
17. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(18):1371-1388. doi:10.1093/JNCI/90.18.1371
18. Cuzick J, Sestak I, Bonanni B, et al. Selective oestrogen receptor modulators in prevention of breast cancer: an updated meta-analysis of individual participant data. *Lancet*. 2013;381(9880):1827-1834. doi:10.1016/S0140-6736(13)60140-3
19. Goss PE, Ingle JN, Alés-Martínez JE, et al. Exemestane for breast-cancer prevention in postmenopausal women. *N Engl J Med*. 2011;364(25):2381-2391. doi:10.1056/NEJMOA1103507
20. Huber-Keener KJ. Cancer genetics and breast cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2022;82:3-11. doi:10.1016/j.bpobgyn.2022.01.007
21. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci*. 2004;95(11):866-871. doi:10.1111/J.1349-7006.2004.TB02195.X
22. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994;266(5182):66-71. doi:10.1126/SCIENCE.7545954
23. Chakraborty S, Mazumder TH, Uddin A. Compositional dynamics and codon usage pattern of BRCA1 gene across nine mammalian species. *Genomics*. 2019;111(2):167-176. doi:10.1016/J.YGENO.2018.01.013
24. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995;378(6559):789-792. doi:10.1038/378789A0
25. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*. 1994;265(5181):2088-2090. doi:10.1126/SCIENCE.8091231
26. Gonçalves D, Pires AS, Marques IA, et al. An Overview on Radiation Sensitivity in Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. *Cancers (Basel)*. 2022;14(13). doi:10.3390/CANCERS14133254
27. Le HP, Heyer WD, Liu J. Guardians of the Genome: BRCA2 and Its Partners. *Genes (Basel)*. 2021;12(8):1229. doi:10.3390/GENES12081229
28. Cetin B, Wabl CA, Gumusay O. The DNA damaging revolution. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020;156. doi:10.1016/J.CRITREVONC.2020.103117
29. Gorodetska I, Kozeretska I, Dubrovskaya A. BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. *J Cancer*. 2019;10(9):2109-2127. doi:10.7150/JCA.30410

Bibliografia

30. Beyzadeoglu M, Ozyigit G, Ebruli C. *Basic Radiation Oncology*. Springer; 2010:1-575. doi:10.1007/978-3-642-11666-7/COVER
31. Podgorsak EB. *Radiation Physics for Medical Physicists*. 3rd ed. Springer; 2016. doi:10.1007/978-3-319-25382-4
32. Jokar S, Marques IA, Khazaei S, et al. The Footprint of Exosomes in the Radiation-Induced Bystander Effects. *Bioengineering* 2022, Vol 9, Page 243. 2022;9(6):243. doi:10.3390/BIOENGINEERING9060243
33. Marques IA, Neves AR, Abrantes AM, et al. Targeted alpha therapy using Radium-223: From physics to biological effects. *Cancer Treat Rev*. 2018;68:47-54. doi:10.1016/j.ctrv.2018.05.011
34. IAEA. *Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students*. IAEA; 2010.
35. Kasuya G, Tsuji H. Carbon Ion Radiotherapy. *Nihon Rinsho*. 2010;74:1511-1522. doi:10.1016/B978-1-4160-5897-7.00072-X
36. Chang DS, Lasley FD, Das IJ, Mendonca MS, Dynlacht JR. *Basic Radiotherapy Physics and Biology*. 2nd ed. Springer; 2021.
37. Omer H. Radiobiological effects and medical applications of non-ionizing radiation. *Saudi J Biol Sci*. 2021;28(10):5585. doi:10.1016/J.SJBS.2021.05.071
38. Burgio E, Piscitelli P, Migliore L. Ionizing Radiation and Human Health: Reviewing Models of Exposure and Mechanisms of Cellular Damage. An Epigenetic Perspective. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(9). doi:10.3390/IJERPH15091971
39. Chadwick KH, Leenhouts HP. A molecular theory of cell survival. *Phys Med Biol*. 1973;18(1):78-87. doi:10.1088/0031-9155/18/1/007
40. Desouky O, Ding N, Zhou G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *J Radiat Res Appl Sci*. 2015;8(2):247-254. doi:10.1016/J.JRRAS.2015.03.003
41. Wilkinson B, Hill MA, Parsons JL. The Cellular Response to Complex DNA Damage Induced by Ionising Radiation. *Int J Mol Sci*. 2023;24(5). doi:10.3390/IJMS24054920
42. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2017;58(5):235. doi:10.1002/EM.22087
43. Huang R, Zhou PK. DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1). doi:10.1038/S41392-021-00648-7
44. McMahon SJ. The linear quadratic model: usage, interpretation and challenges. *Phys Med Biol*. 2018;64(1). doi:10.1088/1361-6560/AAF26A
45. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci*. 2012;9(3):193-199. doi:10.7150/IJMS.3635
46. Lindberg J, Nilvebrant J, Nygren PÅ, Lehmann F. Progress and Future Directions with Peptide-Drug Conjugates for Targeted Cancer Therapy. *Molecules*. 2021;26(19). doi:10.3390/MOLECULES26196042
47. Dunne-Daly CF. Principles of radiotherapy and radiobiology. *Semin Oncol Nurs*. 1999;15(4):250-259. doi:10.1016/S0749-2081(99)80054-0
48. Joiner MC, van der Kogel, AJ. *Basic Clinical Radiobiology*. 5th ed. CRC Press; 2019.

Bibliografia

49. Mehta SR, Suhag V, Semwal M, Sharma N. Radiotherapy: Basic Concepts and Recent Advances. *Med J Armed Forces India*. 2010;66(2):158. doi:10.1016/S0377-1237(10)80132-7
50. Mott JHL, Daniel JM. Interactions of Electromagnetic Radiation and Subatomic Particles with Matter - Part 1. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2021;33(7):451-454. doi:10.1016/J.CLON.2021.02.004
51. Langlands FE, Horgan K, Ddodwell D, Smith L. Breast cancer subtypes: response to radiotherapy and potential radiosensitisation. *Br J Radiol*. 2013;86(1023). doi:10.1259/BJR.20120601
52. Rutqvist LE. Breast cancer. *Acta Oncol*. 1996;35 Suppl 7(SUPPL. 7):54-63. doi:10.3109/02841869609101663
53. Bennardo L, Passante M, Cameli N, et al. Skin Manifestations after Ionizing Radiation Exposure: A Systematic Review. *Bioengineering*. 2021;8(11). doi:10.3390/BIOENGINEERING8110153
54. Yang X, Ren H, Guo X, Hu C, Fu J. Radiation-induced skin injury: pathogenesis, treatment, and management. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(22):23379. doi:10.18632/AGING.103932
55. Russo J, Russo IH. *The Etiopathogenesis of Breast Cancer Prevention*. Vol 90.; 1995.
56. Kolak A, Kamińska M, Sygit K, et al. Primary and secondary prevention of breast cancer. *Ann Agric Environ Med*. 2017;24(4):549-553. doi:10.26444/AAEM/75943
57. Sheikh A, Hussain SA, Ghori Q, et al. The spectrum of genetic mutations in breast cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015;16(6):2177-2185. doi:10.7314/APJCP.2015.16.6.2177
58. Polyak K. On the birth of breast cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1552(1):1-13. doi:10.1016/S0304-419X(01)00029-4
59. Adrada BE, Candelaria R, Rauch GM. MRI for the Staging and Evaluation of Response to Therapy in Breast Cancer. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*. 2017;26(5):211-218. doi:10.1097/RMR.0000000000000147
60. Nounou MI, Elamrawy F, Ahmed N, Abdelraouf K, Goda S, Syed-Sha-Qhattal H. Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. *Breast Cancer (Auckl)*. 2015;9(Suppl 2):17. doi:10.4137/BCBCR.S29420
61. Radhakrishna S, Agarwal S, Parikh PM, et al. Role of magnetic resonance imaging in breast cancer management. *South Asian J Cancer*. 2018;7(2):69. doi:10.4103/SAJC.SAJC_104_18
62. Afzal S, Hassan M, Ullah S, Abbas H, Tawakkal F, Khan MA. Breast Cancer; Discovery of Novel Diagnostic Biomarkers, Drug Resistance, and Therapeutic Implications. *Front Mol Biosci*. 2022;9. doi:10.3389/FMOLB.2022.783450
63. Guo R, Lu G, Qin B, Fei B. Ultrasound Imaging Technologies for Breast Cancer Detection and Management: A Review. *Ultrasound Med Biol*. 2018;44(1):37-70. doi:10.1016/J.ULTRASMEDBIO.2017.09.012
64. Rong Y, Ren H, Ding X. MRI and Bone Scintigraphy for Breast Cancer Bone Metastase: A Meta-analysis. *Open Medicine*. 2019;14(1):317. doi:10.1515/MED-2019-0029
65. Bychkovsky BL, Lin NU. Imaging in the evaluation and follow-up of early and advanced breast cancer: When, why, and how often? *Breast*. 2017;31:318-324. doi:10.1016/J.BREAST.2016.06.017

Bibliografia

66. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther.* 2010;10(10):955. doi:10.4161/CBT.10.10.13879
67. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol.* 2020;84. doi:10.1016/j.intimp.2020.106535
68. Nascimento RG do, Otoni KM. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? *Mastology (Online).* 2020;30:1-8. doi:10.29289/25945394202020200024
69. Cocco S, Piezzo M, Calabrese A, et al. Biomarkers in Triple-Negative Breast Cancer: State-of-the-Art and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2020;21(13):1-33. doi:10.3390/IJMS21134579
70. Yan S, Imam M. Progress and prospects in research and clinical practice of hormone receptor-positive, HER-2-negative breast cancer with BRCA1/2 mutations. *Discover Oncology.* 2023;14(1). doi:10.1007/S12672-023-00732-0
71. Stevens KN, Vachon CM, Couch FJ. Genetic susceptibility to triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* 2013;73(7):2025-2030. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1699
72. BRCA-associated Breast Cancer: Absence of a Characteristic Immunophenotype1 | Cancer Research | American Association for Cancer Research. Accessed July 18, 2023. <https://aacrjournals.org/cancerres/article/58/9/1839/505047/BRCA-associated-Breast-Cancer-Absence-of-a>
73. Atchley DP, Albarracin CT, Lopez A, et al. Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(26):4282-4288. doi:10.1200/JCO.2008.16.6231
74. Nacer DF, Vallon-Christersson J, Nordborg N, et al. Molecular characteristics of breast tumors in patients screened for germline predisposition from a population-based observational study. *Genome Med.* 2023;15(1):1-20. doi:10.1186/S13073-023-01177-4/FIGURES/7
75. Andrieu N, Easton DF, Chang-Claude J, et al. Effect of chest X-rays on the risk of breast cancer among BRCA1/2 mutation carriers in the international BRCA1/2 carrier cohort study: a report from the EMBRACE, GENEPSO, GEO-HEBON, and IBCCS Collaborators' Group. *J Clin Oncol.* 2006;24(21):3361-3366. doi:10.1200/JCO.2005.03.3126
76. Pijpe A, Andrieu N, Easton DF, 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;345(7878). doi:10.1136/BMJ.E5660
77. Menes TS, Terry MB, Goldgar D, et al. Second primary breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: 10-year cumulative incidence in the Breast Cancer Family Registry. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;151(3):653-660. doi:10.1007/S10549-015-3419-Y
78. Schmidt MK, Van Den Broek AJ, Tollenaar RAEM, et al. Breast Cancer Survival of BRCA1/BRCA2 Mutation Carriers in a Hospital-Based Cohort of Young Women. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109(8). doi:10.1093/JNCI/DJW329
79. Colin C, Foray N, Di Leo G, Sardanelli F. Radiation induced breast cancer risk in BRCA mutation carriers from low-dose radiological exposures: a systematic review. *Radioprotection.* 2017;52(4):231-240. doi:10.1051/RADIOPRO/2017034

Bibliografia

80. Gonçalves DP. Suscetibilidade dos indivíduos portadores de mutações BRCA1/2 à radiação de diagnóstico. *Suscetibilidade dos indivíduos portadores de mutações BRCA1/2 à radiação de diagnóstico*. Published online October 17, 2022. Accessed August 19, 2023. <https://estudogeral.uc.pt/handle/10316/102960>
81. Klein EE, Chin LM, Rice RK, Mijnheer BJ. The influence of air cavities on interface doses for photon beams. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1993;27(2):419-427. doi:10.1016/0360-3016(93)90255-T
82. Mahdavi BF, Taheri A, Hejazi SH, Talebi A, Shokrani P. A protocol for irradiation of cell lines cultured in multi-well plates: effect of air inhomogeneity on irradiated cell survival. *Int J Radiat Biol*. 2019;95(11):1543-1546. doi:10.1080/09553002.2019.1642541
83. Sellakumar P, Arun C, Sanjay SS, Ramesh SB. Comparison of monitor units calculated by radiotherapy treatment planning system and an independent monitor unit verification software. *Phys Med*. 2011;27(1):21-29. doi:10.1016/J.EJMP.2010.01.006
84. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2315-2319. doi:10.1038/NPROT.2006.339
85. Spoormans K, Crabbé M, Struelens L, De Saint-Hubert M, Koole M. A Review on Tumor Control Probability (TCP) and Preclinical Dosimetry in Targeted Radionuclide Therapy (TRT). *Pharmaceutics* 2022, Vol 14, Page 2007. 2022;14(10):2007. doi:10.3390/PHARMACEUTICS14102007
86. van Leeuwen CM, Oei AL, Crezee J, et al. The alfa and beta of tumours: a review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies. *Radiat Oncol*. 2018;13(1). doi:10.1186/S13014-018-1040-Z
87. Pietkiewicz S, Schmidt JH, Lavrik IN. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *J Immunol Methods*. 2015;423:99-103. doi:10.1016/J.JIM.2015.04.025
88. Ligasová A, Frydrych I, Koberna K. Basic Methods of Cell Cycle Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol 24, Page 3674. 2023;24(4):3674. doi:10.3390/IJMS24043674
89. Darzynkiewicz Z. Critical Aspects in Analysis of Cellular DNA Content. *Current protocols in cytometry / editorial board, J Paul Robinson, managing editor . [et al]*. 2011;CHAPTER(SUPPL. 56):Unit. doi:10.1002/0471142956.CY0702S56
90. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2007 2:5. 2007;2(5):1084-1104. doi:10.1038/nprot.2007.77
91. Vral A, Fenech M, Thierens H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis*. 2011;26(1):11-17. doi:10.1093/MUTAGE/GEQ078
92. Vilalta M, Rafat M, Graves EE. Effects of Radiation on Metastasis and Tumor Cell Migration. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(16):2999. doi:10.1007/S00018-016-2210-5
93. Haubner F, Ohmann E, Pohl F, Strutz J, Gassner HG. Wound healing after radiation therapy: review of the literature. *Radiat Oncol*. 2012;7(1). doi:10.1186/1748-717X-7-162

Bibliografia

94. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* 2007 2:2. 2007;2(2):329-333. doi:10.1038/nprot.2007.30
95. Suarez-Arnedo A, Figueroa FT, Clavijo C, Arbeláez P, Cruz JC, Muñoz-Camargo C. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS One*. 2020;15(7). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0232565
96. Suarez-Arnedo A, Figueroa FT, Clavijo C, Arbeláez P, Cruz JC, Muñoz-Camargo C. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS One*. 2020;15(7):e0232565. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0232565
97. Lazzari G, Buono G, Zannino B, Silvano G. Breast Cancer Adjuvant Radiotherapy in BRCA1/2, TP53, ATM Genes Mutations: Are There Solved Issues? *Breast Cancer : Targets and Therapy*. 2021;13:299. doi:10.2147/BCTT.S306075
98. Burnet NG, Elliott RM, Dunning A, West CML. Radiosensitivity, Radiogenomics and RAPPER. *Clin Oncol*. 2006;18(7):525-528. doi:10.1016/j.clon.2006.05.007
99. Yorke E, Gelblum D, Ford E, Yorke E, Gelblum D, Ford E. Patient Safety in External Beam Radiation Therapy. <https://doi.org/102214/AJR106006>. 2012;196(4):768-772. doi:10.2214/AJR.10.6006
100. Pouliliou SE, Lialiaris TS, Dimitriou T, et al. Survival Fraction at 2 Gy and γ H2AX Expression Kinetics in Peripheral Blood Lymphocytes From Cancer Patients: Relationship With Acute Radiation-Induced Toxicities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2015;92(3):667-674. doi:10.1016/J.IJROBP.2015.02.023
101. Schröder-Heurich B, Bogdanova N, Wieland B, et al. Functional deficiency of NBN, the Nijmegen breakage syndrome protein, in a p.R215W mutant breast cancer cell line. *BMC Cancer*. 2014;14(1). doi:10.1186/1471-2407-14-434
102. Spoormans K, Crabbé M, Struelens L, De Saint-Hubert M, Koole M. A Review on Tumor Control Probability (TCP) and Preclinical Dosimetry in Targeted Radionuclide Therapy (TRT). *Pharmaceutics* 2022, Vol 14, Page 2007. 2022;14(10):2007. doi:10.3390/PHARMACEUTICS14102007
103. van Leeuwen CM, Oei AL, Crezee J, et al. The alfa and beta of tumours: A review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies. *Radiation Oncology*. 2018;13(1):1-11. doi:10.1186/S13014-018-1040-Z/FIGURES/3
104. Chumsuwan N, Khongkow P, Kaewsuwan S, Kanokwiroon K. Interruptin C, a Radioprotective Agent, Derived from *Cyclosorus terminans* Protect Normal Breast MCF-10A and Human Keratinocyte HaCaT Cells against Radiation-Induced Damage. *Molecules*. 2022;27(10). doi:10.3390/MOLECULES27103298/S1
105. Sie L, Loong S, Tan EK. Utility of lymphoblastoid cell lines. *J Neurosci Res*. 2009;87(9):1953-1959. doi:10.1002/JNR.22000
106. Bissoyi A, Nayak B, Pramanik K, Sarangi SK. Targeting cryopreservation-induced cell death: a review. *Biopreserv Biobank*. 2014;12(1):23-34. doi:10.1089/BIO.2013.0032

Bibliografia

107. Qian X, Wang Z, Ning J, et al. Protecting HaCaT cells from ionizing radiation using persimmon tannin-Aloe gel composite. *Pharm Biol.* 2020;58(1):510. doi:10.1080/13880209.2020.1767158
108. Zhu Q, Hu J, Meng H, Shen Y, Zhou J, Zhu Z. S-Phase Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and Molecular Mechanisms of Aplasia Ras homolog Member I-Induced Human Ovarian Cancer SKOV3 Cell Lines. *International Journal of Gynecological Cancer.* 2014;24(4):629. doi:10.1097/IGC.000000000000105
109. Ligasová A, Frydrych I, Koberna K. Basic Methods of Cell Cycle Analysis. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4):3674. doi:10.3390/IJMS24043674
110. Guo M, Lu B, Gan J, Wang S, Jiang X, Li H. Apoptosis detection: a purpose-dependent approach selection. *Cell Cycle.* 2021;20(11):1033. doi:10.1080/15384101.2021.1919830
111. Fernando M, Duijf PHG, Proctor M, et al. Dysregulated G2 phase checkpoint recovery pathway reduces DNA repair efficiency and increases chromosomal instability in a wide range of tumours. *Oncogenesis* 2021 10:5. 2021;10(5):1-11. doi:10.1038/s41389-021-00329-8
112. Vijayalakshmi J, Chaurasia RK, Srinivas KS, et al. Establishment of ex vivo calibration curve for X-ray induced “dicentric + ring” and micronuclei in human peripheral lymphocytes for biodosimetry during radiological emergencies, and validation with dose blinded samples. *Heliyon.* 2023;9(6):e17068. doi:10.1016/J.HELIYON.2023.E17068
113. Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4). doi:10.3390/IJMS21041534
114. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation* 2009 16:1. 2008;16(1):3-11. doi:10.1038/cdd.2008.150
115. Vilalta M, Rafat M, Graves EE. Effects of Radiation on Metastasis and Tumor Cell Migration. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(16):2999. doi:10.1007/S00018-016-2210-5
116. Haubner F, Ohmann E, Pohl F, Strutz J, Gassner HG. Wound healing after radiation therapy: Review of the literature. *Radiat Oncol.* 2012;7(1):162. doi:10.1186/1748-717X-7-162
117. Grada A, Otero-Vinas M, Prieto-Castrillo F, Obagi Z, Falanga V. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *Journal of Investigative Dermatology.* 2017;137(2):e11-e16. doi:10.1016/j.jid.2016.11.020