



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

[RUI PEDRO CAETANO MOREIRA DE OLIVEIRA]

***[EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE EM
CULTURAS CELULARES DE AMNIÓCITOS
HUMANOS]***

[ARTIGO CIENTÍFICO]

ÁREA CIENTÍFICA DE BIOFÍSICA/BIOMATEMÁTICA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
[PROFESSORA DOUTORA MARIA FILOMENA BOTELHO]
[PROFESSORA DOUTORA ISABEL MARQUES CARREIRA]**

[ABRIL/2011]

Efeitos da radiação ionizante em culturas celulares de amniócitos humanos

R Oliveira¹, AM Abrantes^{1,2}, J Rio³, CA Gonçalves^{2,4}, AB Sarmiento-Ribeiro^{2,4}, B Oliveiros¹,
IM Carreira^{2,5}, MF Botelho^{1,2,3}

1 Instituto de Biofísica e Biomatemática, IBILI, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

2 Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia (CIMAGO), Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

3 Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS), Universidade de Coimbra

4 Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

5 Instituto de Biologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

Autor correspondente:

Rui Pedro Caetano Moreira de Oliveira

Rua do Emigrante, nº 39

4520 – 013 Escapães

Tel: 961903894/256286700

E-mail: ruipedrocoliveira@hotmail.com



Resumo

Introdução: Desde a descoberta dos raios X no início do século 20, os efeitos da radiação sobre as células vivas têm sido objecto de intensa pesquisa. Células, quando expostas à radiação, sofrem alterações físicas, químicas e biológicas. Dos diferentes tipos de radiação, a ionizante é potencialmente perigosa, devido à sua capacidade de produção de iões causadores de danos biológicos.

Objectivo: O objectivo deste trabalho é estudar os efeitos da radiação ionizante em linhas celulares.

Metodologia: A irradiação das linhas celulares foi realizada em linfoblastos humanos (ATCC-RPMI-7666), amniócitos humanos obtidos de culturas primárias e células de adenocarcinoma colorretal (ATCC-CCL-218/WiDr). Essas células foram expostas à radiação ionizante de uma fonte externa de *tecnécio-99*-metaestável (^{99m}Tc), com doses variáveis de exposição. Os efeitos da radiação foram avaliados através da metodologia de citometria de fluxo utilizando diferentes fluorocromos. Um ensaio clonogénico também foi realizado para estudar a sobrevivência celular nos amniócitos e nas células WiDr. O estudo dos efeitos *bystander* foi realizado nas células WiDr usando um protocolo de transferência de meio.

Resultados: Através da citometria de fluxo, observou-se uma diminuição da viabilidade celular, dependente do tempo, por mecanismos dependentes de apoptose/necrose, com uma percentagem mais elevada em linfoblastos; as espécies reactivas de oxigénio aumentam com o tempo após a irradiação, enquanto as defesas oxidantes aumentaram apenas até quatro horas depois, com posterior diminuição; houve um aumento na proporção de monómeros/agregados dependente do tempo que está relacionada com a redução do potencial



de membrana mitocondrial. No ensaio clonogénico registou-se uma diminuição da sobrevivência celular. Para o efeito *bystander* observamos uma tendência de diminuição do SF nas células WiDr, relacionada com a dose de exposição. A radiação não parece afectar o crescimento celular, visto que as culturas de amniócitos mantiveram a sua confluência.

Conclusão: A radiação ionizante induz efeitos idênticos em amniócitos e linfoblastos, embora os amniócitos sejam menos sensíveis à radiação. Estes efeitos são mais evidentes após a irradiação. Há uma diminuição da viabilidade celular, que está correlacionada com a dose de exposição de radiação.

Palavras-chave: Radiação ionizante, amniócitos humanos, WiDr, viabilidade celular, ensaio clonogénico, efeito *bystander*.



Abstract

Introduction: Since the discovery of the X rays in the beginning of the 20th Century, the effects of radiation on living cells have been subject of intense research. Cells, when exposed to radiation, undergo chemical, physical and biological alterations. From the different types of radiation, the ionizing is potentially dangerous because its capacity of production ions inducers of biological damage.

Aim: The aim of this work is to study ionizing radiation cell effects in cellular lines.

Material and Methods: Cellular irradiation was performed using a human lymphoblast cell line (ATCC–RPMI-7666), human amniocytes and colorectal adenocarcinoma cells (ATCC-CCL-218/WiDr). These cells were exposed to ionizing radiation from an external source of ^{99m}Tc, with variables exposure doses. The radiation effects were evaluated through flow cytometry methodology using different fluorocromes. A clonogenic assay was also performed to study the cellular survival in the amniocytes and WiDr cells. The study of bystander effects was performed in the WiDr cells using a medium transfer protocol.

Results: Through flow cytometry we observed a decrease on cell viability time dependent by mechanisms of apoptosis/necrosis, with a higher percentage in lymphoblasts; reactive oxygen species increase with time after irradiation while oxidant defenses increase only until 4 hours after, and then decrease; an increase of monomers/aggregates ratio time dependent which is correlated with a mitochondrial membrane potential decrease. In the clonogenic assay it was reported a diminution of the cellular survival. For the bystander effect we observed a SF diminution tendency in the WiDr cells, correlated with the exposure dose. Radiation did not seem to affect growth since amniocytes cultures kept their confluency.



Conclusion: Ionizing radiation induces identical effects in amniocytes comparing with lymphoblasts, although amniocytes are less sensible to radiation. These observed effects are more evident right after irradiation. There is a decrease of cell viability that is correlated with the exposure dose of radiation.

Keywords: Ionizing radiation, human amniocytes, WiDr, cellular viability, clonogenic assay, bystander effect.



Introdução

No último século assistiu-se a modificações no conhecimento científico, no domínio da radioactividade, definida como a(s) transformação(ões) que os núcleos atómicos sofrem, acompanhada(s) de emissão(ões) de diferentes tipos de radiação, podendo nesse processo originarem-se novos elementos. (Saha GB *et al.*, 2004)

O presente trabalho incide sobre os efeitos de um tipo particular de radiação, a radiação ionizante.

As células, quando expostas à radiação, sofrem alterações químicas (ruptura de ligações entre átomos; formação de radicais livres), físicas (ionização e excitação dos átomos) e biológicas (alteração das funções celulares). As alterações celulares reflectem-se no organismo que as integra. Dos vários tipos de radiação, a ionizante revela-se potencialmente perigosa pela sua capacidade de produção de iões, causadores de danos biológicos no organismo. (Mayer-Kuckuk, 1984; Povh B *et al.*, 1995; Botelho MF, 2006; “Braustein S *et al.*, 2009)

Os efeitos da radiação ionizante sobre as células podem ser directos ou indirectos, a curto e/ou a longo prazo. Assim, o efeito directo será a interacção da radiação com uma macromolécula, ionizando-a e produzindo lesão; indirecto, será um fenómeno inicial, não crítico, que ocorre numa molécula, levando frequentemente a uma transferência de energia para outra molécula à distância; a curto prazo, efeitos verificados nas células irradiadas; a longo prazo serão os efeitos nas linhas celulares subsequentes. (Saha GB *et al.*, 2004; Jena NR *et al.*, 2009)

Os efeitos celulares da radiação dependem da radiosensibilidade das células, sendo mais radiosensíveis quanto menor for o seu grau de diferenciação, menor tempo médio de



vida e maior número de divisões que realizem (lei de Bergonie e Tribondeau). (Salgueiro L and Ferreira JG, 1991; Lima JJP, 2005; Botelho MF, 2006; Ochub-Marcinek A *et al.*, 2009)

Existem factores que afectam a resposta celular, como a transferência linear de energia (LET – do inglês *linear energy transfer*), que corresponde à energia transferida por unidade de comprimento; a eficiência biológica relativa (RBE – do inglês *relative biological efficiency*), que descreve quantitativamente o efeito relativo da LET; a relação do enriquecimento em oxigénio (OER – do inglês *oxygen evolution relation*), que descreve numericamente o efeito oxigénio. A resposta dos tecidos biológicos à radiação ionizante é maior quando são irradiados em situações aeróbias. (Mayer-Kuckuk, 1984; Salgueiro L and Ferreira JG, 1991; Botelho MF, 2006)

Nos últimos anos assistiu-se a um renovado interesse no estudo dos efeitos da radiação, nomeadamente naqueles que não são atribuídos a dano directo no DNA. Hoje sabemos que há efeitos que se manifestam em células que não sofreram acção directa da radiação. (Zheng X *et al.*, 2001; Caires HRF, 2009; Rzeszowska-Wolny J *et al.*, 2009)

Tais efeitos são transmitidos por um sinal designado de *bystander*, semelhante a um efeito mediado por citocinas, mas que nem sempre necessita das *gap junctions* para transferir o sinal de célula em célula. (Mothersill C and Seymour C, 1998) Os efeitos provocados por este processo são diversos, podendo induzir apoptose, instabilidade genómica, atrasar os processos de morte celular, ou mesmo mutações. (Wright EG *et al.*, 2004; Sowa M and Morgan B 2009; Jacob P *et al.*, 2010)

Experiências com transferência de meio, mostraram que a produção deste sinal e a sua captação, podem ser distinguidos como processos separados e aparentemente p53 independentes, embora possam requerer uma via p53 funcional. (Mothersill and Seymour, 1998; Azzam EI *et al.*, 1998; Mothersill C and Seymour C, 2003; Xia J *et al.*, 2009; Zhang Y *et al.*, 2009; Sowa M and Morgan B, 2010)



É pretensão do presente estudo determinar os efeitos da radiação ionizante sobre as células, comparando os resultados com outras experiências no âmbito da radiação ionizante.

Material e Métodos

Estudos em culturas celulares. De modo a realizar os estudos celulares utilizamos amniócitos humanos provenientes de culturas primárias (Laboratório de Citogenética e Genómica do Instituto de Biologia), linfoblastos humanos (ATCC-RPMI-7666) e células de adenocarcinoma colorrectal (ATCC-CCL-218/WiDr)

Análise por Citometria de Fluxo. No sentido de se analisar e caracterizar o ambiente intracelular, após irradiação das células e em condições basais, determinamos por citometria de fluxo a viabilidade celular, a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e a alteração do potencial membranar mitocondrial. A análise foi efectuada usando um citómetro de fluxo FACSCalibur de quatro cores e seis parâmetros (Becton Dickinson, San Jose, CA) equipado com um laser de árgon de 15 nW. Para cada medição foram utilizadas 10^6 células e obtida informação de pelo menos 10 000 eventos usando software Cell Quest (Becton Dickinson) e analisado usando um software Paint-a-Gate (Becton Dickinson).

Viabilidade celular. No sentido de se avaliar a viabilidade e morte celular utilizamos um ensaio de dupla marcação com anexina V/iodeto de propídio. Uma das grandes características da morte celular por apoptose é a redistribuição da fosfatidilserina da membrana plasmática. Em células apoptóticas, este fosfolípido, é translocado do folheto interno para o folheto externo da membrana plasmática e liga-se à anexina V. De modo complementar o iodeto de propídeo, que não permeia em células viáveis, liga-se ao DNA, intercalando entre as bases nas fases finais de células apoptóticas e necróticas (Aubry *et al.*, 1999). Neste ensaio utilizamos



10⁶ células, que foram incubadas durante 15 minutos de modo a se ligarem a um tampão contendo 1 µL de anexina V (Kit Immnotech) e 5 µL de iodeto de propídeo (Kit Immnotech). Subsequentemente as células foram excitadas com luz de comprimento de onda de 525 nm para a anexina V e 640 nm para o iodeto de propídeo, sendo registados 10 000 eventos de modo a obter a percentagem de células viáveis, apoptóticas, necróticas e apoptóticas/necróticas tardias. (Falanga J *et al.*, 2004)

Detecção e quantificação de espécies reactivas de oxigénio (ROS). De modo a analisar a produção de ROS utilizamos o corante diacetato de 2', 7' - dicloro-dihidrofluoresceína (DCFH₂-DA) (Sigma). Este corante é um composto lipídico não fluorescente permeável que, após clivagem do componente diacetato por esterases intracelulares, é oxidado pelos ROS intracelulares formando um composto impermeável fluorescente (DCF) que emite uma fluorescência verde, após excitação com luz de comprimento de onda de 488 nm, proporcional à quantidade intracelular de ROS. Uma suspensão de 10⁶ células foi incubada com 5 µL de DCFH₂-DA durante uma hora no escuro. Após lavagem das células com PBS, a análise foi efectuada com uma luz de comprimento de onda excitante de 504 nm, sendo o comprimento de onda da emissão resultante de 529 nm. Resultados são apresentados como valores de Intensidade Média de Fluorescência (MIF). (Halliwell and Whitman, 2004; Roy L *et al.*, 2009)

Medições do potencial membranal mitocondrial. A avaliação do potencial membranal mitocondrial (MMP – do inglês *mitochondrial membrane potential*) foi efectuada utilizando um corante lipofílico catiónico, o iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzamidazolcarbocianina (JC-1) (Molecular Probes, Invitrogen, USA). Esta sonda é uma molécula capaz de entrar selectivamente na mitocôndria. Na sua forma monomérica, JC-1, emite uma fluorescência verde de 527 nm após excitação com luz de comprimento de onda



de 490 nm. No entanto, quando a membrana mitocondrial fica polarizada, a JC-1 torna-se capaz de formar agregados J cuja luz de emissão tem 590 nm de comprimento de onda. De modo a avaliar a incorporação de JC-1, as células foram incubadas numa concentração final de 5 µg/ml durante 15 minutos a 37°C no escuro. Subsequentemente as células foram lavadas com PBS e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados apresentam-se sobre a forma de uma relação monómeros/agregados. (Roy L *et al.*, 2009)

Ensaio clonogénico. O ensaio clonogénico corresponde a um estudo de sobrevivência celular *in vitro* baseado na capacidade de uma única célula crescer e gerar uma colónia. O termo clonogénico refere-se ao facto de estas células serem “clones” umas das outras. Para este ensaio as células foram cultivadas até atingirem uma confluência de cerca de 70%, e submetidas a diferentes exposições (0,5, 1, 2, 6 e 12 *Gray* - Gy). As células, após a irradiação, foram lavadas com solução salina com tampão fosfato (PBS), colhidas após clivagem das ligações entre a arginina e a lisina, permitindo às células soltarem-se da superfície de aderência, por meio do uso de 1ml de uma solução de 0.25% de tripsina/EDTA, e posteriormente semeadas em caixas de cultura de seis poços. O número de células semeadas foi variável em função da dose de exposição, ou seja 100 células para os grupos de controlo e o grupo que foi exposto a 0,5 Gy, 150 células para os grupos que foram expostos a 1 e a 2 Gy, 200 células para o grupo exposto a 6 Gy e 250 células para o grupo exposto a 12 Gy. As células foram semeadas em 3 ml de meio Ham F-10 suplementado com 11% de soro bovino fetal (FBS), 1% de penicilina e estreptomicina e 1% de glutamina (para um total de 500 ml de meio de cultura temos 440 de meio Ham F-10, 50 ml de FBS, 5 ml de antibiótico e 5 ml de glutamina). As células foram então incubadas a 37°C e 95% ar e 5% CO₂. Ao 5º dia o meio foi mudado e ao 12º dia foi contado o número de colónias existentes nas placas de cultura. Foi então calculada a eficiência de placa (PE) que consiste numa relação entre o número de colónias contadas e o número de colónias semeadas e o factor de sobrevivência (SF) que é



uma relação entre a PE da amostra e a PE do grupo de controlo. Com base neste último valor é possível obter uma representação gráfica da sobrevivência em função da dose de radiação ionizante chamada curva de sobrevivência celular. (Plumb JA, 1999; Kawada K *et al.*, 2002; Franken NP *et al.*, 2006; Grillo CA *et al.*, 2009)

Estudo do efeito *bystander*. A teoria do efeito *bystander* pressupõe a libertação de substâncias das células para o meio envolvente, logo, por encadeamento de ideias, o meio de cultura sem células, que seja irradiado, não irá ter esse efeito. Nesse sentido, para o estudo do efeito *bystander*, utilizamos 2 tipos de meio: um meio “simples”, que consiste em meio de cultura sem células que é irradiado e posteriormente transferido, e um meio “complexo”, que é um meio de cultura com células exposto a uma dose de radiação ionizante e posteriormente submetido a um protocolo de transferência de meio. Em ambas as situações, o meio é colhido uma hora após a irradiação, sendo depois submetido ao protocolo de transferência. Este protocolo consiste numa filtração do meio por um filtro com porosidade de 0,22 μm de diâmetro, de forma a garantir que nenhuma célula esteja presente. O meio de cultura é então removido dos frascos designados para receber o meio irradiado, frascos de cultura com células não irradiadas aos quais é removido o meio de cultura, sendo então o filtrado adicionado a esses frascos. Então as células são expostas ao novo meio por um período de 1h, sendo certo que as doses de exposição foram de 2 e de 6 Gy. De seguida realizou-se um ensaio clonogénico que permite verificar a existência, ou não, de alterações na curva de sobrevivência celular. (Mothersill C and Seymour C, 1997)

Análise estatística. Os resultados foram analisados usando o programa STATISTICA package, versão 7, com um nível de significância de 5%. Os resultados foram obtidos usando um modelo linear geral (medições ANOVA repetidas ao longo do tempo e com um factor: nível de oxigénio) para os estudos de *uptake* e o teste t de Student para duas amostras



independentes na citometria de fluxo após confirmação de uma distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para o ensaio clonogénico foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas pelo teste de Mann-Whitney ajustado com correcção de Bonferroni, dado o número de casos. No estudo do efeito *bystander* usamos o teste de Kruskal-Wallis para comparar os 4 grupos (“simples” 2 Gy, “simples” 6 Gy, “composto” 2 Gy, “composto” 6 Gy), o teste de Mann-Whitney para comparar as exposições de 2 Gy vs. 6 Gy em meio simples e em meio “composto”, e o teste de Mann-Whitney para comparar a utilização de meio simples vs meio “composto” quer com exposições de 2 Gy, quer com exposições de 6 Gy.

Resultados

A avaliação da produção de ROS nos amniócitos humanos e nos linfoblastos mostrou um aumento da produção deste tipo de espécies, em contraste com as defesas anti-oxidantes que aumentam apenas até 4 horas após a irradiação e depois registam uma diminuição (Fig. 1).

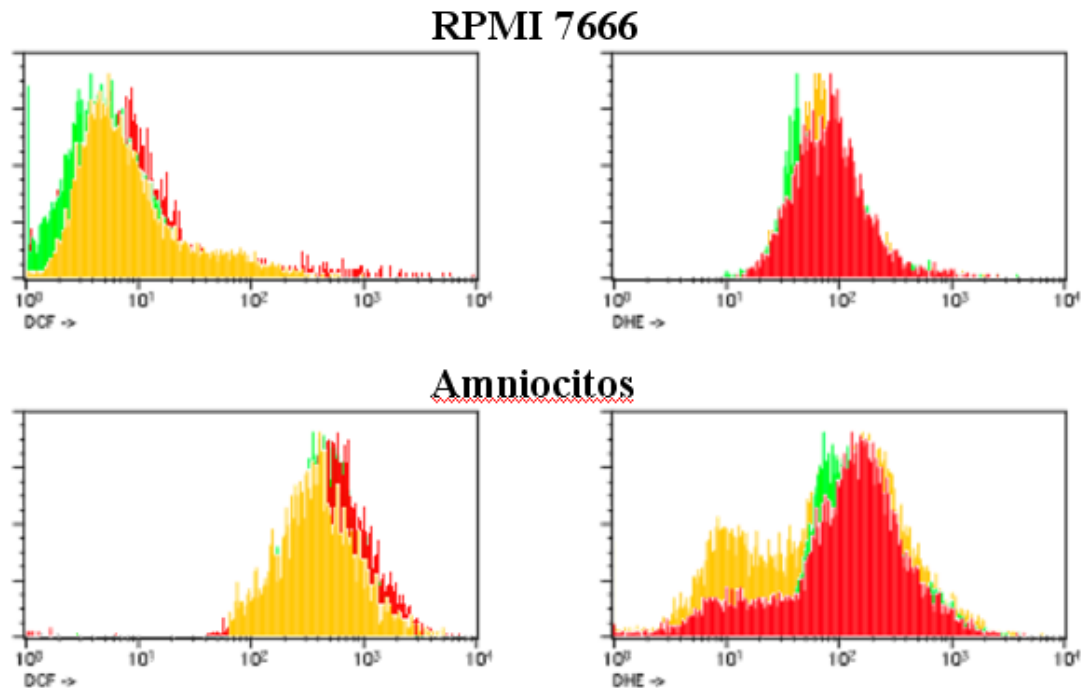


Fig. 1 – Análise da produção de espécies reactivas de oxigénio por citometria de fluxo. A verde estão representados os valores de ROS antes da irradiação, a vermelho 4 horas após a irradiação, e em amarelo os valores para 96 horas após a irradiação, nos amniócitos, e 120 horas após a irradiação, nos linfoblastos. As células foram marcadas com DCFH₂-DA. Os resultados analíticos são expressos em intensidade média de fluorescência (MIF).

A nível do potencial membranar mitocondrial verificou-se um aumento da relação monómeros/agregados dependente do tempo nas linhas de amniócitos humanos e linfoblastos. Este aumento está relacionado com o decréscimo do potencial membranar (Fig.2 e 3).

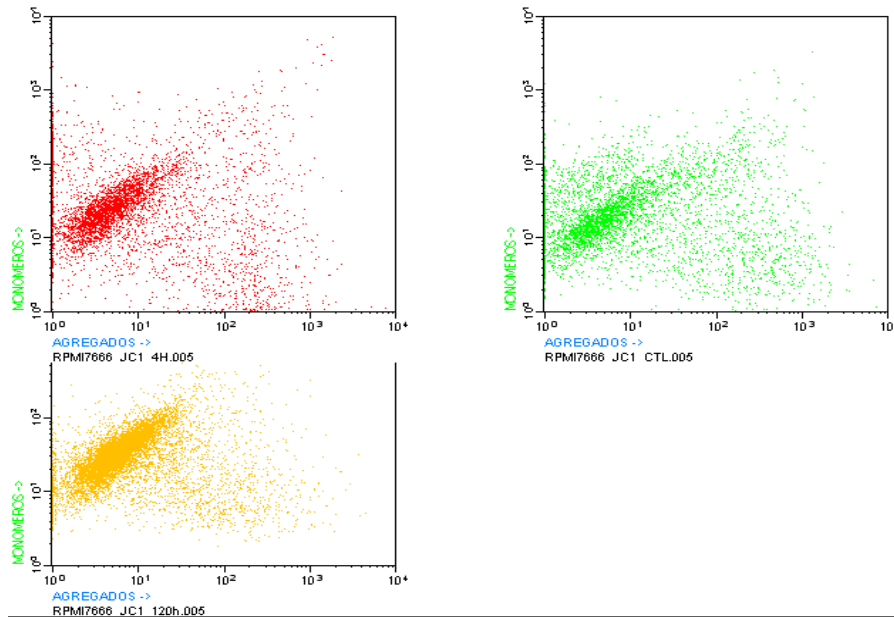


Fig. 2 – Estudo do potencial membranar mitocondrial nos linfoblastos (ATCC-RPMI-7666). O gráfico representa o número de agregados (eixo das abcissas), em função do número de monómeros (eixo das ordenadas). As células foram marcadas com JC-1, e por citometria de fluxo observa-se uma maior quantidade de monómeros do que agregados. Estes resultados traduzem alterações no MMP.

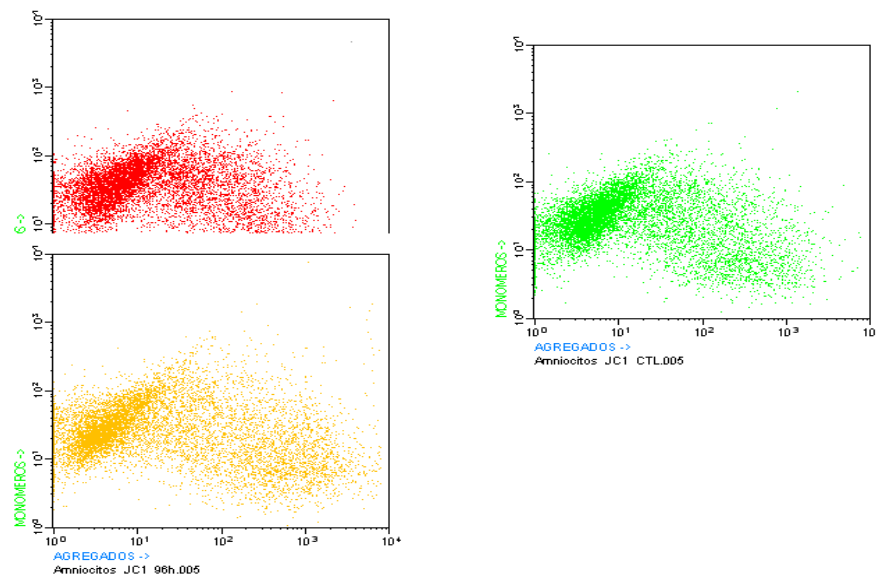




Fig.3 – Estudo do potencial membranar mitocondrial nos amniócitos. O gráfico representa o número de agregados (eixo das abcissas), em função do número de monómeros (eixo das ordenadas). As células foram marcadas com JC-1, e por citometria de fluxo observa-se uma maior quantidade de monómeros do que agregados, tal como já tinha ocorrido de modo semelhante nos linfoblastos. Estas alterações traduzem alterações no MMP.

Relativamente à viabilidade celular, em ambas as linhas celulares, registou-se uma diminuição da viabilidade celular dependente do tempo. Houve um maior número de morte celular por apoptose/necrose às 96, nos amniócitos, e 120 horas, nos linfoblastos, após irradiação, sendo que nos linfoblastos esta morte celular foi mais marcada (Fig. 4 e 5).

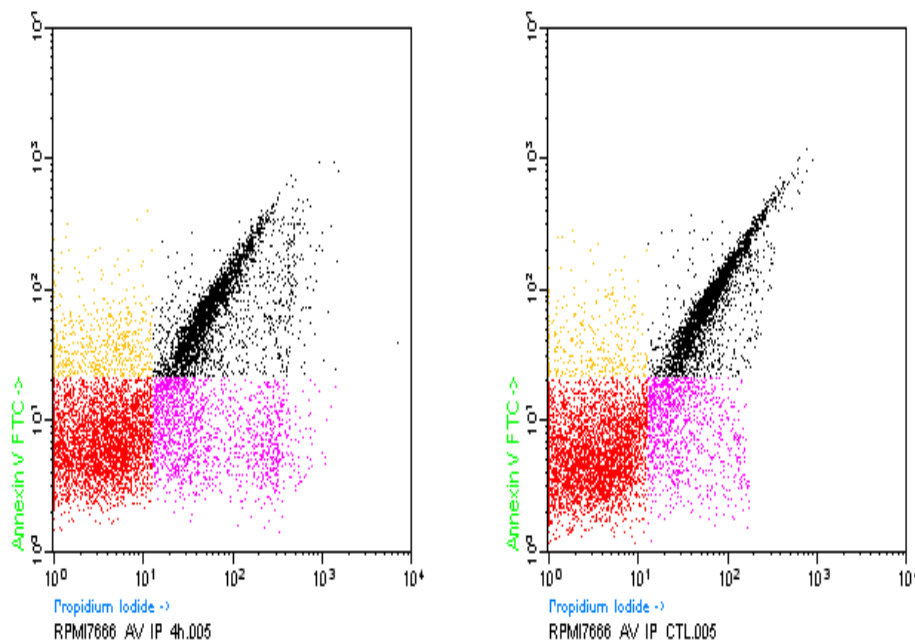


Fig. 4 – Viabilidade celular por citometria de fluxo dos linfoblastos (ATCC-RPMI-7666). O gráfico representa o número de marcações positivas com iodeto de propídeo (eixo das abcissas), em função do número de marcações positivas com anexina V (eixo das ordenadas).



Por citometria de fluxo registou-se um aumento da expressão, tanto de anexina V, como de iodeto de propídeo, que traduzem um aumento do número de células apoptóticas/necróticas.

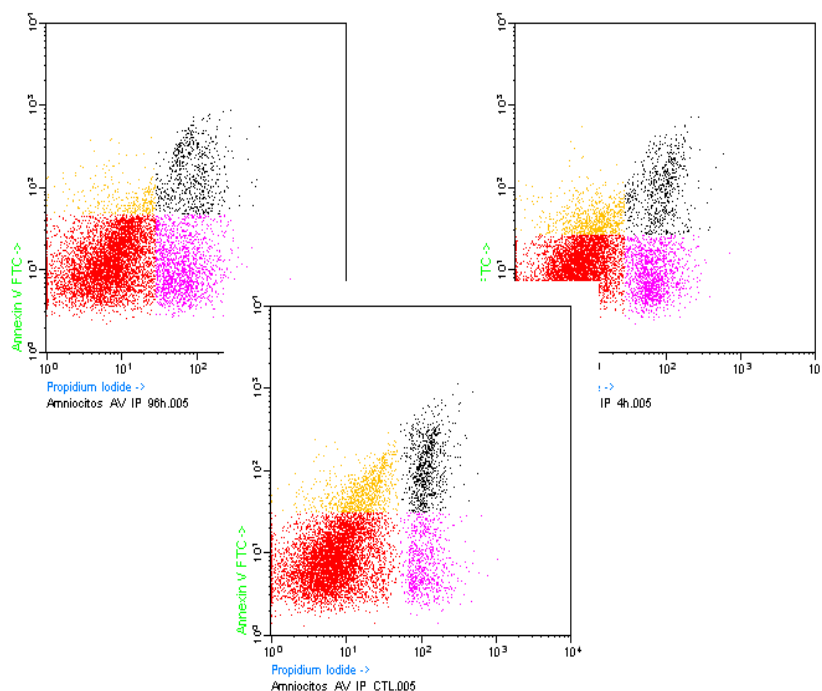


Fig. 5 – Viabilidade celular por citometria de fluxo dos amniócitos. O gráfico representa o número de marcações positivas com iodeto de propídeo (eixo das abcissas), em função do número de marcações positivas com anexina V (eixo das ordenadas). De um modo similar aos linfoblastos, nos amniócitos foram registados aumentos na expressão de anexina V e iodeto de propídeo, tradutores de um incremento no número de células em estado de apoptose/necrose.

No ensaio clonogénico após a contabilização do número de colónias visíveis e do cálculo de PE e SF foi possível a realização de uma curva de sobrevivência celular em função da dose de exposição. Observou-se então uma diminuição do SF em ambas as linhas celulares (amniócitos e Widr) em função do aumento da dose de exposição, sendo obtidos valores baixos para uma dose de exposição de 0,5 Gy nos amniócitos. (Fig. 6 e 7).

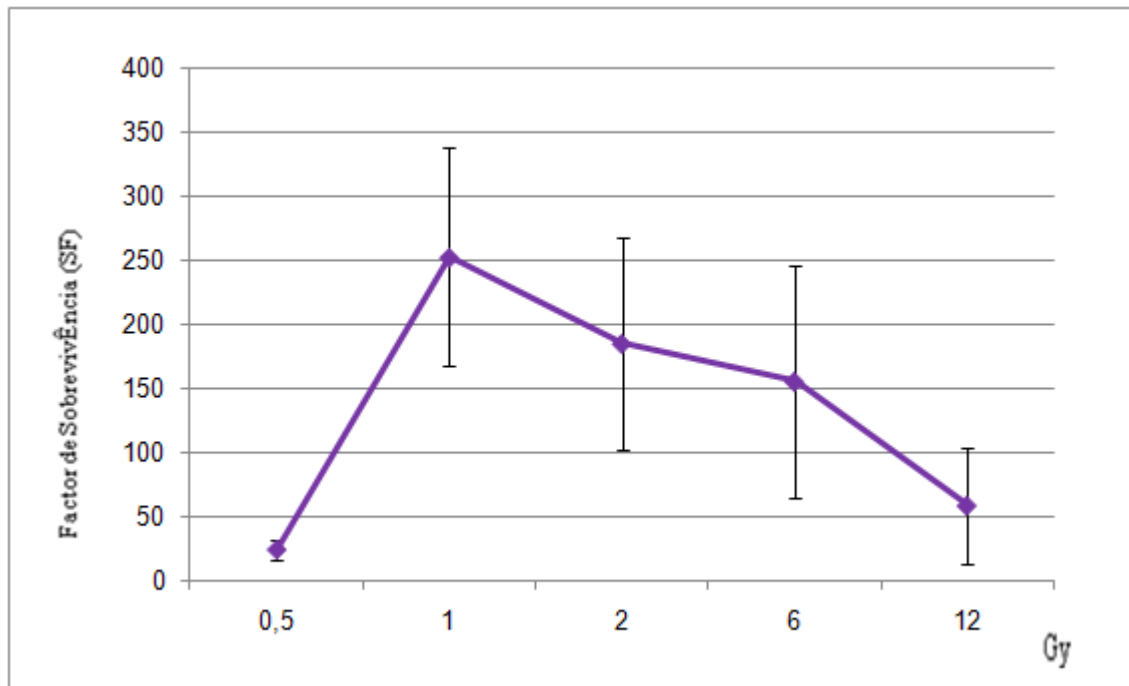


Fig. 6 – Representação gráfica do factor de sobrevivência em função da dose de exposição nos amniócitos humanos. O efeito observado é a tendência para a redução com o aumento da dose, observando-se diferença estatisticamente significativa entre 1 e 12 Gy ($p < 0,05$). O efeito de uma dose de 1, 2, ou 6 Gy é idêntico, embora se observe uma redução média; contudo, a diferença de 1 para 2 e 6 Gy não é significativa. Parece observar-se ainda uma tendência para a redução da variabilidade com o aumento da dose. O traçado gráfico corresponde à modificação da viabilidade, sendo que para cada dose de exposição as experiências foram realizadas com um $n=6$.

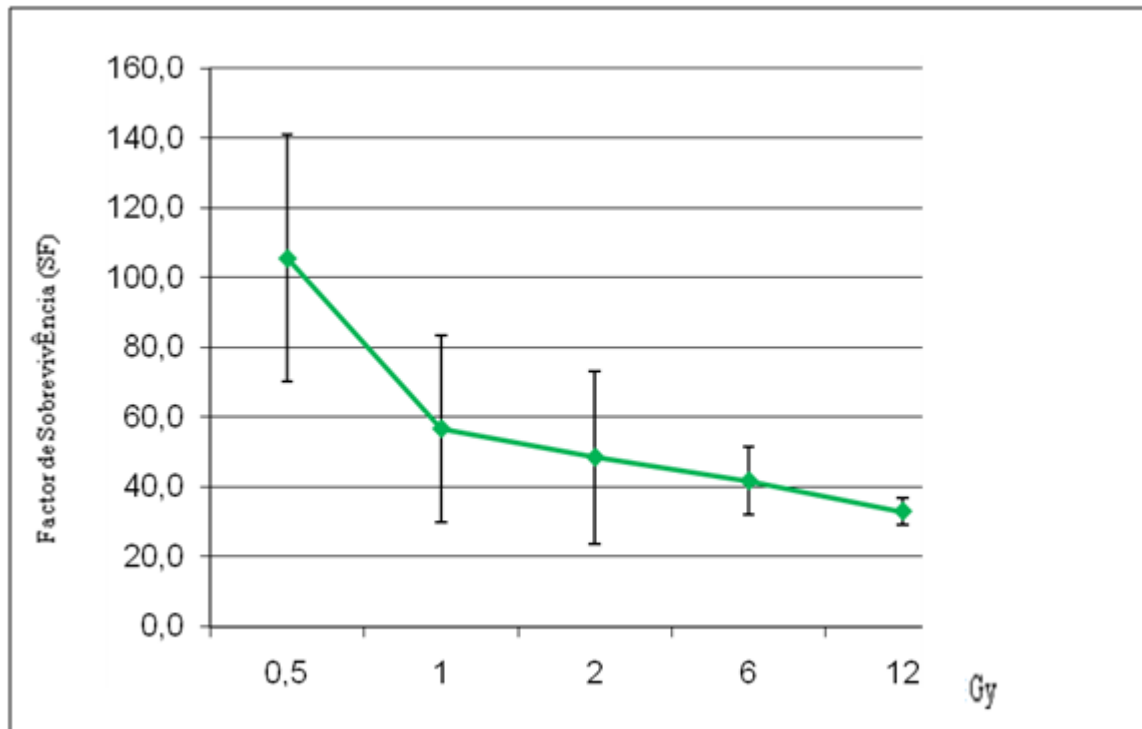


Fig. 7 – Representação gráfica do factor de sobrevivência em função da dose de exposição nas células WiDr. O efeito observado é a tendência para a redução com o aumento da dose, observando-se diferença estatisticamente significativa entre 0,5 e 6 Gy e entre 0,5 e 12 Gy ($p < 0,05$); o efeito de uma dose de 0,5, 1, ou 2 Gy é idêntico, embora se observe uma redução média; contudo, a diferença de 0,5 para 1 e 2 Gy não é significativa dada a elevada variabilidade observada com 0,5 Gy. Parece observar-se ainda uma tendência para a redução da variabilidade com o aumento da dose. O traçado gráfico corresponde a modificação da viabilidade, sendo que para cada dose de exposição as experiências foram realizadas com um $n=6$.

No que diz respeito ao estudo do efeito *bystander*, foi possível verificar uma tendência para a diminuição do SF nas WiDr, expostas por uma hora ao meio irradiado (tanto “simples” como “composto”), em função da dose de exposição, sendo mais visível com o meio “composto”. No entanto a tendência não teve tradução estatística significativa. (Fig. 8)

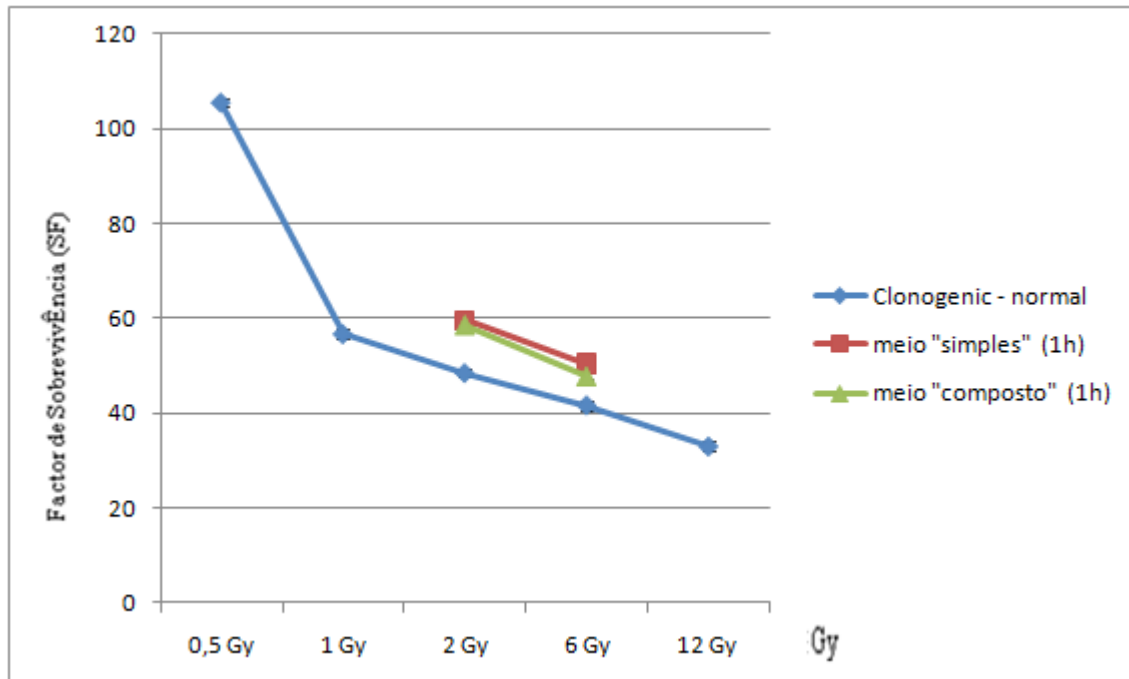


Fig. 8 – Representação gráfica do factor de sobrevivência, no estudo do efeito *bystander*, em função da dose de exposição nas células WiDr. Não existe diferença estatisticamente significativa segundo a dose, em cada meio (“simples” vs. “composto”), nem segundo o meio, com cada dose (2 Gy vs. 6 Gy). Globalmente, não existe diferença estatisticamente significativa entre os 4 grupos ($p > 0,05$). O traçado gráfico corresponde a modificação da viabilidade, sendo que para cada dose de exposição as experiências foram realizadas com um $n=6$.



Discussão e Conclusão

Como seria expectável observamos efeitos da radiação ionizante nas linhas celulares.

Ocorreu um aumento da produção de ROS, devido à interacção da radiação com a água do meio intracelular, sendo este aumento registado por citometria de fluxo através de DCFH₂-DA. O aumento das defesas anti-oxidantes foi apenas até às 4 horas após a irradiação tendo-se registado posteriormente uma diminuição deste tipo de defesas. Este facto poderá dever-se a um esgotamento dessas defesas que após atingirem o seu pico de acção registam uma diminuição, por terem sido consumidas (Mothersill C and Seymour C, 2006)

A membrana mitocondrial registou alterações no seu potencial membranar. Numa situação normal a membrana ao se polarizar forma complexos com o JC-1, revelando uma relação monómeros/agregados baixa devido ao facto de existirem mais agregados que monómeros. No nosso trabalho o que aconteceu foi de certa forma o inverso. A radiação ionizante induz alterações no MMP, e conseqüentemente na polarização da membrana mitocondrial, que se traduz num aumento da relação monómeros/agregados. (Mothersill C and Seymour C, 2006)

A nível de viabilidade celular o estudo com anexina V/iodeto de propídio revelou, por citometria de fluxo, uma diminuição da viabilidade celular dependente do tempo. Observamos que houve um maior número de morte celular por apoptose/necrose 96 horas após a irradiação (para os amniócitos) e 120 horas após irradiação (para os linfoblastos). Dos dois tipos de linhas celulares os linfoblastos foram os que registaram uma maior morte celular. (Falanga J *et al.*, 2004)

O ensaio clonogénico demonstrou uma diminuição da viabilidade e sobrevivência celular, tanto dos amniócitos, como das células WiDr, dependente da dose de exposição. Após contagem do número de colónias formadas e cálculo da PE (*plate efficiency*) e do SF



(*surviving factor*) foi possível obter a curva de sobrevivência celular, onde foi demonstrada uma diminuição do SF dependente da dose de exposição. (Grenman R *et al.*, 1989; Van der Maazen RWM *et al.*, 1990; Lu F and Wong CS, 2005; Mirzayan R *et al.*, 2007; Simone NL *et al.*, 2009) Neste ensaio destaca-se também a existência de um baixo SF para o grupo que foi exposto a uma dose de exposição de 0,5 Gy nos amniócitos. Na literatura existem referências que baixas doses de radiação ionizante podem causar danos celulares relativamente graves, podendo até ser mais perigosos que doses de 1 ou 2 Gy. Este tipo de interações levaria a considerar, numa curva de resposta à radiação, um formato designado em U. (Jacop P *et al.*, 2010) Neste tipo de resposta, as baixas doses funcionariam de um modo protector para a população celular, pois induziriam a remoção de células com o chamado “*background damage*”, que corresponde ao dano existente nas células, antes da irradiação. Este efeito, que pode suavizar ou exacerbar os efeitos directos da radiação, e que domina os resultados em doses de exposição inferiores a 0,5 Gy, e que foi registado em doses até 0,5 cGy, é designado de resposta adaptativa. O efeito de resposta adaptativa para valores de 0,5 cGy pode ser traduzido pelas células de modo diferente. Para doses elevadas, onde muitas células estão danificadas e a integridade do tecido está comprometida, este efeito seria do tipo nocivo, e mais uma componente a adicionar às condições adversas para o meio celular. (Wolff S, 1998; Mothersill C and Seymour C, 2006)

No que diz respeito ao estudo do efeito *bystander*, foi visível uma tendência para a diminuição do SF, nos grupos celulares expostos durante 1h, relacionada com a dose de exposição, com o protocolo de transferência de meio. (Watson GE *et al.*, 2000; Mothersill C *et al.*, 2002; Sawant SG *et al.*, 2002; “Mothersill C and Seymour C 2006) Esta diminuição não foi tão evidente como a diminuição provocada num ensaio clonogénico simples, o que reforça a ideia que o efeito *bystander* é apenas um de vários efeitos na resposta à radiação.



(Mothersill C and Seymour C, 2003); Esta diminuição, no entanto, não teve tradução estatística.

Devemos ter em conta que os efeitos observados nas linhas celulares estudadas podem ser diferentes dos efeitos observados noutras linhas celulares, e como tal não é fácil inferir um efeito universal deste tipo de exposição. Estudos em células RKO36, derivadas de células de carcinoma colorectal humano RKO, não evidenciaram resposta adaptativa nem efeito *bystander*. (Huang L *et al.*, 2007) Outros estudos foram reveladores da existência de um efeito *bystander* em células epiteliais, e da ausência desse efeito *bystander* em fibroblastos. Um dado relevante desses estudos é que as células epiteliais produziam um efeito *bystander*, capaz de induzir diminuição da viabilidade e morte celular nos fibroblastos. Postula-se que deverá existir um “*death factor*” que é produzido por um clone da linha celular, e que tem potencial citotóxico para as células da mesma linha, bem como para células de diferentes linhas celulares. (Mothersill C and Seymour C, 1997; Mothersill C and Seymour C, 1998; Zhao W *et al.*, 2006) A manifestação do efeito *bystander* é influenciada por múltiplos factores, tais como existência de patologia tumoral na linha celular, tecido proveniente de um espécime masculino e linhagem celular obtida de um fumador. (Mothersill C *et al.*, 2002)

Concluindo, com este trabalho foi-nos possível determinar que a radiação ionizante induz efeitos semelhantes em amniócitos e linfoblastos, embora os amniócitos pareçam menos sensíveis à radiação. Os efeitos observados são mais evidentes logo após a irradiação. Há uma diminuição da viabilidade celular que está relacionada com o aumento da dose de exposição.

Estamos perante uma interacção que tem o potencial de produzir uma variada quantidade de efeitos, diversificados em função do tipo de tecido atingido. Se aceitarmos o modelo *bystander* como o resultado de uma resposta generalizada a um stress aos qual as células são submetidas, quais serão as implicações deste novo modo de encarar o efeito das radiações ionizantes? Irá alterar o todo um modelo e sistema de radioprotecção, colocando em



causa o modelo *Linear-No-Threshold* (LNT), e introduzindo questões fundamentais, como a resposta adaptativa e o efeito *bystander*.

Num sistema complexo como o corpo humano, onde existe uma quantidade extraordinária de variações nos sistemas celulares e imensuráveis interações entre eles, será inadequado realizar a extrapolação dos efeitos aqui registados para um tal sistema. Assim, numa sociedade onde as radiações são uma constante diária, e o seu uso em técnicas de diagnóstico e terapêutica aumenta de modo exponencial, continua a assustar a população mundial, nomeadamente na utilização de radiações para a produção de energia. É fundamental investir em estudos contínuos que documentem a interação da radiação com a matéria.



Bibliografia.

Azzam EI, Toledo SM, Gooding T and Little JB. (1998) Intercellular Communication is Involved in the Bystander Regulation of Gene Expression in Human Cells Exposed to Very Low Fluencies of Alpha Particles. *Rad Res.* Vol 150: 497 – 504.

Botelho MF (2006) Apontamentos das Aulas de Dosimetria da Radiação.

Braunstein S, badura ML, Xi Q, Formenti SC and Schneider RJ. (2009) Regulation of Protein Synthesis by Ionizing Radiation. *Mol Cell Bio.* 29(21): 5645-56.

Caires HRF (2009) Hormese vista sob uma perspectiva radiobiológica. Escola Superior da Tecnologia e Saúde do Porto.

Falanga J, Fiore D, Kouttab N, Paiva C, Carson P and Yufit T. (2004) Viability and Apoptosis of Wound Fibroblasts after Cryopreservation. *Wounds.* 16(3).

Franken NP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J and van Bree C. (2006) Clonogenic Assay of Cell In Vitro. *Nat Protocols.* 11: 2315-9.

Grenman R, Burk D and Virolainen E. (1989) Clonogenic Cell Assay for Anchorage-Dependent Squamous Carcinoma Cell Lines Using Limiting Dilution. *Int J Cancer;* 44(1): 131-6.

Grillo CA, Mirífico MV, Morales ML, Reigosa MA and de Mele MFL. (2009) Assessment of Cytotoxic and Cytogenetic Effects of a 1,2,5-Thiadiazole Derivative on CHO-K1 Cell. Its Application as Corrosion Inhibitor. *J of Hazardous Mat.* 170(2-3): 1173-8.



Halliwell B and Whitman M (2004) Measuring Reactive Species and Oxidative Damage in Vivo and in Cell Culture: How Should you Do It and What Do the Results Mean? *Br J Pharmacol.* 142: 231-55.

Huang L, Kim PM, Nickloff JA and Morgan WF (2007) Targeted and Nontargeted Effects of Low-Dose Ionizing Radiation on Delayed Genomic Instability in Human Cells. *Cancer Res.* 67: 1099-104.

Jacob P, Meckbach R, Kaiser JC and Sokolnikov M. (2010). Possible Expressions of Radiation-Induced Genomic Instability, Bystander Effects or Low-Dose Hypersensitivity in Cancer Epidemiology. *Mutat Resh/Fund and Mol Mechs of Mutagenesis.* 687(1-2): 34-39.

Jeggo, PA. (2009) Risks From Low Dose/Dose Rate Radiation: What An Understanding of Dna Damage Response Mechanisms Can Tell Us. *Health Phys.* 97(5): 416-425.

Jena NR, Misra PC and Suhai S. (2009) Protection Against Radiation-Induced DNA Damage by Amino Acids: a DFT Study. *J Phys Chem Bio.* 111(16): 5633-44.

Kawada K, Yonei T, Ueoka H, Kiura K, Tabata M, Takigawa N, Harada M and Tanimoto M. (2002) Comparison of Chemosensitivity Tests: Clonogenic Assay Versus MTT Assay. *Acta Med.* 56(3): 129-34.

Lima JJP (2005) *Biofísica Médica.* Coimbra – Imprensa da Universidade: 535-41; 574-81; 592-601.

Lu F and Wong CS (2005) A Clonogenic Survival Assay of Neural Stem Cells in Rat Spinal Cord After Exposure to Ionizing Radiation. *Rad Res.* 163(1): 63-71.

Mayer-Kuckuk T (1984) *Física Nuclear.* Fundação Calouste Gulbenkian. 27-29; 109-10; 401-7.



Mirzayan R, Andrais B, Scott A, Tessier A and Murray D. (2007) A Sensitive Assay for the Evaluation of Cytotoxic and its Pharmacologic Modulation in Human Solid Tumor-Derived Cell Lines Exposed to Cancer-Therapeutics Agents. *J Pharm Sci.* 10(2): 298-311.

Mothersill C and Seymour C. (1997) Medium from Irradiated Human Epithelial Cells but not Human Fibroblasts Reduces the Clonogenic Survival of Unirradiated Cells. *Int J of Rad Bio.* 71(4): 421-7.

Mothersill C and Seymour C. (1998) Cell-Cell Contact During Gamma Irradiation is not Required to Induce a Bystander Effect in Normal Human Keratinocytes: Evidence for Release During Irradiation of a Signal Controlling Survival into the Medium. *Rad Res.* 149: 256-62.

Mothersill C and Seymour C. (2003) Radiation-Induced Bystander Effects, Carcinogenesis and Models. *Oncogene.* 22: 7028-33.

Mothersill C and Seymour C. (2006) Radiation-Induced Bystander Effects: Evidence for an Adaptive Response to Low Dose Exposures. *Dose Res.* 4: 283-90.

Mothersill C, Seymour C and O'Malley K. (2002) Characterizations of a Bystander Effect Induced in Human Tissue Explants Cultures by Low LET Radiation. *Rad Protect Dos.* 99(1-4): 163-67.

Ochub-Marcinek A, Ewa GN, Elena N and Sylvia R. (2009) Modeling Radiation-Induced Cell Cycle Delays. *Rad and Environ Biophys.* 48(4): 361-70.

Plumb JA (1999) Cell Sensitivity Assay: Clonogenica Assay. *Meths in Mol Med.* 28: 17-23.

Povh B, Rith K, Scholz C, Zetsche F and Lavelle M. (1995) Particles and Nuclei – An Introduction to the Physical Concepts. Springer 11-13; 25-31.



Roy L, Gruel G and Vaurijoux A. (2009) Cell Response to Ionising Radiation Analysed by Gene Expression Patterns. *Ann Ist Super Sanità.* 45(3): 272-7.

Rzeszowska-Wolny J, Przybyszewski, WM and Widel M (2009) Ionizing Radiation-Induced Bystander Effects, Potential Targets for Modulations of Radiotherapy. *Eur J Pharmacol.* 625: 156-64.

Saha GB (2004) *Fundamentals of Nuclear Pharmacy* 5th edition. Springer 1-3; 11-15.

Salgueiro L, Ferreira JG (1991) *Introdução á Biofísica.* Fundação Calouste Gulbenkian – Lisboa: Pp 359-362; 403-12; 445-56.

Sawant SG, Zheng W, Hopkins KM, Randers-Pehrson G Lieberman HB and Hall EJ. (2002) The Radiation Induced Bystander Effect for Clonogenic Survival. *Rad Res.* 157: 361-4.

Simone NL, Soule BP, Ly D, Saleh AD, Savage JE, DeGraff W, Cook J, Harris CC, Gius D and Mitchell JB. (2009) Ionizing Radiation-Induced Oxidative Stress Alters miRNA Expression; *PLoS ONE.* 4(7); 63-77.

Sowa M and Morgan B (2009) Non-Targeted Effects of Ionizing Radiation: Implications for Risk Assessment and the Radiation Dose Response Profile. *Health Phys:* 97(5): 426-32.

Sowa M and Morgan B. (2010) Are Radiation-Induced Bystander Effects a Universal Phenomenon? Studies on Human Cell Fail to find Low-LET Radiation-Induced Damage in Untargeted Cells. *Bio Sci Div Res High:* 65.

Stoilov LM, Mullenders LHF, Darroudi F and Natarajan AT. (2007) Adaptive Response to DNA and Chromosomal Damage Induced by X-rays in Human Blood Lymphocytes. *Oxford J, Life, Sci & Med. Mutagenesis* 22(2): 117-22.



Tompkins JD, Wu X, Chu YL and Her C. (2009) Evidence for a Direct Involvement of hMSH5 in Promoting Ionizing Radiation Induced Apoptosis. *Exp Cell Res.* 315(14): 2420-32.

Ugenskiene R, Prise K, Folkard M, Lekki J, Stachura Z, Zazula M and Stachura J. (2009) Dose Response and Kinetics of Foci Disappearance Following Exposure to High and Low LET Ionizing Radiation. *Inter J of Rad Bio.* 85(10): 872-82.

Van der Maazen RWM, verhagen I and van der Kogel AJ . (1990). An In Vitro Clonogenic Assay to Assess Radiation Damage in Rat CNS Glial Progenitor Cells. *Int J of Rad Bio;* 58(5): 835-45.

Wang Z, Li WJ, Zhang H, Yang JS, Qui R and Wang X. (2006) Comparison of Clonogenic Assay with Premature Chromosome Condensation Assay in Prediction of Human Cell Radiosensitivity. *World J Gastroenterol;* 12: 2601-5.

Watson GE, Lorimore A, Macdonald DA and Wright EG. (2000) Chromosomal instability in Unirradiated Cells Induced in vivo by a Bystander Effect of Ionizing Radiation. *Cancer Res.* 60: 5608-11.

Williams JR, Zhang Y, Zhou H, Gridley DS, Koch CJ, Slater JM and Little JB. (2008) Overview of Radiosensitivity of Human Tumor Cells to Low-Dose-Rate Irradiation. *Int. J Radiation Oncology Biol Phys.* 72(3): 909-17.

Wolff S. (1998) The Adaptive Response in Radiobiology: Evolving Insights an Implications. *Environ Health Perspective.* 106: 277-28.

Wright EG. (2004) Commentary on Radiation Induced Bystander Effects. *Human & Experimental Toxicology.* 23: 91-4.



Xia J, Liu L, Xue J, Wang Y and Wu L. (2009) Modeling of Radiation-Induced Bystander Effect using Monte Carlo Methods. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. 267(6): 1015-8.

Zhang Y, Zhou J, Baldwin J, Held KD, Prise KM, Redmond RW and Liber HL. (2009) Ionizing Radiation-Induced Bystander Mutagenesis and Adaptation: Quantitative and Temporal Aspects. Mut Res/Fund and Mol Mechanisms of Mutagenesis. 671(1-2): 20-5.

Zhao W, Chuang EY, Mishra M, Awwad R, Bisht K, Sun L, Nguyen P, Pennington JD, Wang TJ, Bradbury CM, Huang L, Chen Z, Bar-sela G, Robbins ME and Gius D. (2006) Distinct Effect of Ionizing Radiation on In Vivo Murine Kidney and Brain Normal Tissue Gene Expression. Clin Cancer Res 12: 3823-30.

Zheng X, Johansson M and Karlsson A. (2001) Bystander Effect of Cancer Cell Lines Transduced with the Multisubstrate Deoxyribonucleoside Kinase of Drosophila Melanogaster and Synergistic Enhancement by Hydroxyurea. Mol Pharmacol. 60(2): 262-6.



Agradecimentos

Aos meus pais, a quem devo tudo.

Ao meu avô António, por um apoio enorme a 7000 km de distância.

À professora doutora Filomena Botelho e à professora doutora Isabel Carreira pela sua orientação e sábios conselhos.

À Joana pela sua paciência, ajuda, compreensão e inspiração.

À Alexandra por tudo o que me ensinou ao longo da minha vida.

À Margarida e à Ana Lourenço pela sua ajuda, conselhos, e acima de tudo, infinita paciência.

Aos meus amigos que me apoiaram e incentivaram a cumprir este projecto.

E a todos, que de um modo, ou outro, estiveram comigo nesta etapa.

"A ciência tem as raízes amargas, porém os frutos são doces." (Aristóteles)