

**Irradiação da linha celular de linfoma difuso
de grandes células B em dose única: efeitos
celulares e moleculares**

Fernando Mendes, Cátia Domingues, Susann Schugk, Ana
Margarida Abrantes, Ana Cristina Gonçalves, Tiago Sales,
Ricardo Teixeira, Rita Silva, Jéssica Estrela, Mafalda Laranjo, João
Casalta-Lopes, Clara Rocha, Paulo César Simões, Ana Bela
Sarmiento, Maria Filomena Botelho & Manuel Santos Rosa

Artigo integrado na
Parte 3 "Domínio das Ciências da Saúde"
da publicação.

Páginas do artigo
189 a 231

Título da Publicação
Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

Coordenação
Susana Gonçalves, Helena Almeida, Paula Fonseca, Cândida Malça,
Fátima Neves, Carlos Dias Pereira e Marco Veloso

Data de publicação
Fevereiro de 2017

Editor
CINEP/IPC

ISBN (impresso) 978-989-99463-0-9

ISBN(ebook) 978-989-99463-1-6

Nota biográfica

Fernando **Mendes**

Doutor em Ciências da Saúde, ramo Tecnologias da Saúde pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (2016), é Mestre em Biologia Celular e Molecular pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (2010), licenciado em Análises Clínicas e Saúde Pública (2002) e bacharel em Análises Clínicas e Saúde Pública pela ESTeSC-Coimbra Health School. É Professor Adjunto no Politécnico de Coimbra, na ESTeSC-Coimbra Health School no Departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais e coordenador do European Joint Master Degree in Biomedical Laboratory Sciences. Leciona no curso de Licenciatura em Ciências Biomédicas Laboratoriais.

Cátia **Domingues**

É investigador integrado no CNC-IBILI e CIMAGO, grupo da imunoinflamação. Do seu currículo destacam-se várias apresentações de trabalhos em congressos nacionais e internacionais, é autor em um pedido de patente, tendo publicado diversos artigos em revistas e edições científicas. É General Secretary na European Association for Professions in Biomedical Laboratory Sciences e integra ainda o painel de avaliadores externos do ensino superior na Irlanda.

Susann **Schugk**

Employee at Norra Älvsborgs county hospital, Trollhättan/ Sweden since 2013, maj. Position as 2nd in charge at Hematology department since 2015 october. Initiated master program of Biomedical Laboratory science, 120 ECTS, University of Gothenburg/ Sweden since 2013. Master thesis "Effects of Ionizing Radiation on cell lines of Lung cancer and B-cell lymphoma." was fulfilled at the Faculty of Medicine, University of Coimbra and IBILI - Institute for Biomedical Imaging and Life Science, Coimbra. Advanced molecular biology and bioinformatics, 15 ECTS, University of Kristianstad. Applied statistics in health science, 7.5 ECTS, University of Kristianstad. Bachelor degree of 180 ECTS in Biomedical Laboratory science at University of Gothenburg, Sahlgrenska Academy in 2013.



Ana Margarida **Abrantes**

Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Doutorada em Ciências da Saúde pela faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, mestre em Biologia Celular e Molecular pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e licenciada em Medicina Nuclear pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto publicou até à data 64 artigos em revistas nacionais e internacionais com arbitragem científica. A atividade científica que desenvolve tem como principais áreas de investigação a biofísica, a radiação, a imagem molecular, o cancro e os modelos animais de doenças humanas.

Ana Cristina **Gonçalves**

Doutorada em Ciências da Saúde, ramo Ciências Biomédicas pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (2016), é Mestre em Nutrição clínica pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (2009), licenciado em Biologia Microbiana e Genética pela Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (2004). Leciona no Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e no Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. É investigadora no CNC-IBILI (Grupo Biologia do cancro e terapias direcionadas) e CIMAGO (Grupo Cell Signalling, Clinics and Therapeutics in Cancer). É autora e co-autora de diversos artigos publicados em revistas internacionais e de várias apresentações em congressos nacionais e internacionais.

Tiago **Sales**

Licenciado em Bioquímica pela Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro e Mestre em Bioquímica pela Universidade de Coimbra. Foi co-autor em vários artigos científicos e apresentou trabalhos em diversos congressos. Encontra-se neste momento a frequentar o Mestrado de Gestão da Faculdade de Economia da Universidade de Coimbra. Frequentou também o curso de Competências Empreendedoras de Base tecnológica –CEBT Ibérico 2014. Venceu vários concursos de empreendedorismo como as duas versões do Bioempreende. Promotor do projeto pHControl que neste momento está em fase de pedido de patente provisório.

Ricardo **Teixo**

Licenciado em Bioquímica e Mestre em bioquímica pela Universidade de Coimbra, é atualmente doutorando do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde da Universidade de Coimbra. Possui diversas publicações em revistas e edições científicas, bem como diversas comunicações em congressos internacionais e nacionais. Possui dois pedidos de patente, tendo também frequentado um curso de empreendedorismo de base tecnológica.

Rita **Silva**

Mestre em Engenharia Biomédica pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (2012). Frequentou uma bolsa de Investigação em Neurociências no Domínio de Neurociências (NeRD) do Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde (ICVS) em Braga, designada "The role of brain lipid metabolism in the modulation of chronic stress effects". Da bolsa de Investigação resultaram participações em meetings, apresentações de posters científicos e um artigo científico, "The impact of chronic stress on the rat brain lipidome" 2015, publicado na revista *Molecular Psychiatry*. Actualmente é consultora integrante da equipa de soluções de Billing da Celfocus, na Vodafone Turquia.

Jéssica **Estrela**

Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública pela ESTeSC - Coimbra Health School (2015). É técnica de Análises Clínicas e Saúde Pública no Hospital Arcebispo João Crisóstomo - Cantanhede e no Grupo Beatriz Godinho. Do seu currículo destacam-se apresentações de posters científicos e várias publicações de artigos científicos em diversas revistas e edições científicas.

Mafalda **Laranjo**

Concluiu Biologia (BSc Hon) e Biologia Celular e Molecular (MSc) pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Obteve o grau de Doutor em Ciências da Saúde (pré-Bolonha), ramo Ciências Biomédicas pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra em 2014. Desenvolve a sua actividade científica na Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina desde 2007. Publicou 38 artigos em revistas especializadas e 136 trabalhos em



actas de eventos. Possui 142 itens de produção técnica. Co-orientou 3 dissertações de mestrado na área de Ciências da Saúde, além de ter orientado 1 trabalho de conclusão de curso de bach./licenciatura. Recebeu 9 prêmios e/ou homenagens. Entre 2009 e 2013 participou em 8 projectos de investigação, sendo que coordenou 1 destes. Actualmente participa em 4 projectos de investigação. Actua na área de Ciências Médicas com ênfase em Ciências da Saúde.

João **Casalta-Lopes**

Mestre em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, exerce funções como assistente hospitalar de Radioncologia no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. É ainda assistente convidado das unidades curriculares de Biofísica e Oncologia na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e de Oncologia e Estudo de Casos em Radioterapia na Escola Superior de Tecnologia da Saúde.

Clara **Rocha**

Doutoramento em Gestão – Ciência Aplicada à Decisão pela Faculdade de Economia da Universidade de Coimbra (2012), Mestrado em Gestão da Informação nas Organizações pela Faculdade de Economia da Universidade de Coimbra (2006), licenciatura em Matemática (ramo Investigação Operacional) realizado na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (1994). É Professora Adjunta no Instituto Politécnico de Coimbra, na ESTeSC-Coimbra Health School no Departamento das Ciências Complementares. É investigadora no INESC Coimbra (Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores) desde 2005.

Paulo César **Simões**

Licenciatura em Engenharia Física (ramo de Instrumentação), pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (FCTUC), em Setembro de 1991. Mestrado em Física (área de Física Tecnológica), pelo Departamento de Física da FCTUC, em Maio de 1995. Título de Especialista em Física Médica na área de Radioterapia, emitido pelo Ministério da Saúde em 28 de fevereiro de 2014. Trabalha actualmente e desde janeiro de 2001 como Técnico Superior de Saúde – Ramo de Física Hospitalar, no Serviço de Radioterapia dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

Ana Bela **Sarmiento**

Formação académica e profissional: Licenciatura em Medicina, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra (FMUC) (1984); Doutoramento em Medicina, FMUC (2002); Especialidade de Hematologia Clínica (2004); Agregação em Hematologia, FMUC (2015) Actualmente é Professora Associada com Agregação de nomeação definitiva em regime de tenure, FMUC. Regente das Unidades Curriculares de Hematologia e de Biologia Molecular Aplicada do Mestrado Integrado em Medicina, FMUC. Professora da Unidade Curricular de Hematologia do Mestrado em Análises Clínicas, FFUC. Investigadora e Membro da comissão coordenadora do Centro de Investigação em Meio Ambiente Genética e Oncobiologia (CIMAGO), FMUC; Investigador (membro integrado) do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC). IBILI (CNC.IBILI). Coordenadora dos cursos de Oncologia do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde da FMUC. Assistente Hospitalar de hematologia do CHUC

Maria Filomena **Botelho**

Médica, professora catedrática de Biofísica da Faculdade de Medicina da UC. Directora do Instituto de Biofísica/Biomatemática da FMUC e Responsável pelo Biotério do IBILI-Sub-Unidade 1 da FMUC e membro do ORBEA. Presidente da Comissão de Ética da Escola Superior de Enfermagem de Coimbra. Especialista em Medicina Nuclear e Competência em Patologia Experimental pela Ordem dos Médicos. Certificada pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária como Investigador Coordenador para Experimentação Animal. Áreas de ensino: Biofísica, Dosimetria da Radiação, Radiobiologia e Modelos Animais de Doença Investigadora do consórcio CNC.IBILI e do CIMAGO. Principais áreas de investigação: Biofísica, Desenvolvimento de modelos animais de Doenças Humanas, Oncologia Molecular (da biologia molecular à imagem molecular), terapia fotodinâmica em modelos in vitro e in vivo, Radiofarmácia, Efeitos biológicos da radiação (modelos in vitro e in vivo). Orientação de alunos de mestrado, de doutoramento e bolsiros de pós-doutoramento tanto nacionais com estrangeiros. Actividades científicas: 180 artigos publicados em revistas científicas indexadas com factor de impacto, 6 capítulos de livros, 740 artigos publicados sob a forma de resumos em revistas nacionais e internacionais, 907 apresentações em congressos sob a forma de conferências,



comunicações orais e pósteres. Foi premiada, desde 1988, com 47 prémios, 24 dos quais nos últimos 5 anos.

Manuel Santos **Rosa**

Licenciou-se em Medicina, pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC), em 1975, e doutorou-se pela mesma Faculdade em 1989 em Ciências Médicas, 3o Grupo de disciplinas, especialidade de Patologia Geral (Imunologia), por unanimidade, com distinção e louvor. Prestou provas para obtenção do Título de Agregado em Medicina do 3o Grupo, Subgrupo de Imunologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, em 1999, tendo sido aprovado por unanimidade. É, desde 2004, Professor Catedrático do 4o Grupo de Disciplinas (Imunologia) e é Regente da Unidade Curricular de Imunologia do Mestrado Integrado em Medicina e colabora em vários mestrados e cursos de pós-graduação.

Exerceu cargos qualificados na Universidade de Coimbra (UC): Membro do Conselho Diretivo da FMUC e Vice-Presidente do Conselho Diretivo (1999-2009); Diretor da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (2009-2012); Diretor e Responsável do Centro, Instituto e Serviço de Imunologia da FMUC (2000-2015); Responsável pelo Laboratório e Plataforma de Citometria de Fluxo e Separação Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; Membro da Comissão Científica do Programa de Doutoramento da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; Coordenador Científico e pedagógico do programa de Saúde sem Fronteiras do Centro de Estudos Ibéricos (Universidades de Coimbra e Salamanca); Diretor da Biblioteca das Ciências da Saúde da UC (2012-2015).



Irradiação da linha celular de linfoma difuso de grandes células B em dose única: efeitos celulares e moleculares

Fernando Mendes, Cátia Domingues, Susann Schugk,
Ana Margarida Abrantes, Ana Cristina Gonçalves,
Tiago Sales, Ricardo Teixo, Rita Silva, Jéssica Estrela,
Mafalda Laranjo, João Casalta-Lopes, Clara Rocha,
Paulo César Simões, Ana Bela Sarmento,
Maria Filomena Botelho & Manuel Santos Rosa

O linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) é reconhecido como um grupo heterogéneo de doenças hematológicas malignas, que constituem coletivamente o tipo mais comum e agressivo de linfoma não-Hodgkin (LNH) (Ba, 2013; Mendes, Domingues, *et al.*, 2015). Esta patologia constitui cerca de 25% a 40% de todos os diagnósticos de LNH. Ao longo das últimas décadas, a incidência desta neoplasia tem vindo a aumentar cerca de 3% a 4% ao ano (Ba, 2013; Campo *et al.*, 2011; Morton *et al.*, 2006; Ng, 2007; Persky & Miller, 2009). No momento do diagnóstico, cerca de 25% a 50% dos doentes com LDGCB encontra-se nos estádios I ou II (Campo *et al.*, 2011; Ng, 2007; Persky & Miller, 2009; Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, 2008).

A radioterapia (RT), à semelhança de outros linfomas constituiu o único tratamento de base para doença localizada, e permite atingir elevadas taxas de resposta completa e sobrevivência livre de doença, a longo prazo, em 40% a 45% dos doentes (Hudson, Hudson, Maclennan, Anderson, & Linch, 1994; Kaminski, Coleman, Colby, Cox, & Rosenberg, 1986; Monfardini *et al.*, 1980; Nissen *et al.*, 1983).

Os LDGCB não especificados foram subdivididos, segundo perfis de expressão génica, em subtipo do centro germinativo de célula B, em subtipo de células

B ativadas, e em subtipo sem classificação. Este subtipo representa 15%, e parece dever-se a diferentes estádios de diferenciação linfoide (Alizadeh *et al.*, 2000; Rosenwald *et al.*, 2002). A distinção molecular tem implicações no prognóstico, uma vez que o LDGCB, subtipo de células B ativadas apresenta, por norma, um pior resultado do que o LDGCB, do subtipo centro germinativo de célula B (Mendes, Domingues, *et al.*, 2015).

A RT continua a ser a primeira opção de tratamento, de acordo com o *Nacional Comprehensive Cancer Network*, para os doentes não elegíveis para quimioterapia (QT), devido à existência concomitante de patologias impeditivas ou para o caso de linfomas refratários (Horning *et al.*, 2004; Persky *et al.*, 2008; Phan *et al.*, 2010). Atualmente cerca de 80% a 90% dos doentes em estágio precoce de LDGCB, estádios I e II, permanecem livres da doença após o tratamento com R-CHOP e com RT de consolidação (Persky *et al.*, 2008; Phan *et al.*, 2010). A RT de consolidação após a QT contribui para a diminuição do risco de recidiva nos locais tratados. Várias evidências têm demonstrado que a RT de consolidação apresenta melhores resultados nos doentes em estágio inicial da doença (Ballonoff *et al.*, 2008; Bonnet *et al.*, 2007; Horning *et al.*, 2004; Martinelli *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 1998). No entanto, é particularmente eficaz na maior parte dos casos de patologia não amplamente disseminada (Mendes, Domingues, *et al.*, 2015). Contudo, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ação anticancerígena da RT, assim como as repercussões no sistema imune, não se encontram totalmente clarificados. Perante esta constatação constituiu objetivo deste trabalho a caracterização, do ponto de vista celular e molecular, dos efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante (RI) numa linha celular de LDGCB.

Materiais e Métodos

Cultura celular

A linha celular Farage é uma linha celular de LDGCB, estabelecida em 1990,



a partir de uma biópsia ganglionar de uma doente caucasiana. Estas células crescem em suspensão em meio de cultura RPMI complementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS do inglês, *fetal bovine serum*), 400 mM de piruvato de sódio e 1% de antibiótico/antimicótico (Ben-Bassat *et al.*, 1992).

Radiação ionizante

A irradiação das culturas celulares foi realizada no acelerador linear de raios X, descrito abaixo. Para a irradiação prepararam-se suspensões celulares das células Farage na densidade de $0,5 \times 10^6$ células/mL, no volume necessário para realizar todas as experiências pretendidas. As doses de radiação usadas foram de 0,5 Gy a 60 Gy. De forma a garantir uma irradiação reprodutível, fiável e com deposição homogénea de dose em todo o volume, recorreu-se a uma caixa de irradiação em acrílico com paredes de 1 cm de espessura, com dimensões e referências para o posicionamento gravadas em relevo e em tudo compatíveis com as condições habituais de operação do acelerador linear e para as quais se encontra certificada. Assim, foi possível garantir condições de posicionamento e de acondicionamento reprodutíveis, bem como a homogeneidade da dose depositada. A caixa de irradiação foi concebida e construída no Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, e foi realizado o estudo dosimétrico, através de imagens de tomografia computadorizada da mesma, equivalente ao efetuado aos doentes submetidos a tratamento por RT.

O acelerador linear utilizado para a irradiação foi um acelerador *Varian Clinac 600C* (Varian), com raios-X de energia de 4 MeV, utilizado na rotina clínica de tratamento de RT externa. O procedimento de irradiação foi realizado com o apoio de um engenheiro físico-médico e de um técnico de RT. Cada sessão de irradiação iniciou-se pela colocação da caixa de irradiação vazia sobre o tampo da mesa de tratamento e distribuição dos tubos *falcon* com as culturas celulares, preparados previamente, identificados para as diferentes doses de irradiação. Os tubos controlo foram mantidos fora da sala. As doses administradas

estão descritas na Tabela 1 Para cada sessão de irradiação o acelerador foi disponibilizado por cerca de 20 a 30 minutos, com período efetivo de feixe de 20 minutos.

Tabela 1. *Doses administradas às amostras, na caixa de irradiação. Unidades de motor (MU, do inglês monitor units; 1MU=0,022 Gy).*

Dose	0,5 Gy	5 Gy (2+3)	8 Gy (5+3)	12 Gy (8+4)	15 Gy (12+3)	30 Gy (15+15)
Lado direito	23 MU	133 MU	133 MU	178 MU	133 MU	669 MU
Lado esquerdo	23 MU	134 MU	134 MU	179 MU	134 MU	669 MU

Ensaio clonogénico

O ensaio clonogénico é um teste capaz de avaliar a capacidade de uma célula dar origem a uma colónia de células, pelo que permite determinar a sobrevivência celular e inferir acerca da viabilidade celular. Este ensaio permite-nos avaliar o resultado final da agressão celular induzida pela radiação e é considerado o *gold standard* dos testes de sensibilidade a citostáticos e de avaliação dos efeitos da radiação (Buch *et al.*, 2012; Franken, Rodermond, Stap, Haveman, & van Bree, 2006; Rafahi *et al.*, 2011).

As células Farage controlo (não sujeitas a radiação) e após radiação foram mantidas em cultura conforme descrito anteriormente. Adicionou-se um número conhecido de células tratadas com cada dose de radiação (número de células semeadas) conforme descrito na Tabela 2 e perfez-se com meio de cultura enriquecido com metilcelulose (M7027, *Sigma-Aldrich*®) na concentração de 1%, até perfazer o volume de 3 mL. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, durante sete dias, momento em que se realizou a coloração com uma solução de violeta de cristal (C3886, *Sigma-Aldrich*®) na concentração de 0,5% em solução de metanol (32213, *Sigma-Aldrich*®) e posterior contagem das colónias formadas.

Com este procedimento foi possível calcular a eficiência da placa (PE, do inglês *plate efficiency*) e o fator de sobrevivência (SF, do inglês *surviving factor*) de

acordo com a Equação 1 e com a Equação 2, respetivamente (Balça-Silva *et al.*, 2012; Franken *et al.*, 2006)

$$\text{Eficiência da placa (\%)} = \frac{\text{Número de colónias contadas}}{\text{Número de células semeadas}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{Fator de Sobrevivência (\%)} = \frac{\text{PE das amostras tratadas}}{\text{PE das amostras controlo}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Tabela 2. Número de células plaqueadas após irradiação, por dose e por linha celular.

	Controlo	0,5 Gy	2 Gy	5Gy	8Gy	12Gy	15 Gy	30 Gy	60Gy
Farage	4x10 ⁵	4x10 ⁵	6x10 ⁵	6x10 ⁵	6x10 ⁵	8x10 ⁵	8x10 ⁵	8x10 ⁵	1x10 ⁵

Através dos resultados obtidos foi possível estabelecer curvas de dose-resposta, que relacionam a dose de radiação com o fator de sobrevivência celular para cada linha celular. Os resultados experimentais obtidos com os ensaios clonogénicos foram ajustados a um modelo linear-quadrático (Franken *et al.*, 2006; Mamede *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014).

Em algumas situações, o ajuste aos dados experimentais pôde ser otimizado quando $\beta=0$, sendo a resposta determinada apenas pela componente linear da equação, assim o modelo de ajuste correspondeu ao modelo de um só alvo e um só toque, onde D representa a dose de radiação e D_0 , a dose letal média. Neste modelo, $D_0=1/\alpha$ com $\beta=0$.

Viabilidade e Proliferação Celular

A viabilidade das células das diferentes linhas celulares determinou-se com recurso ao método de exclusão do azul de tripano (GIBCO®) (Weisenthal, Marsden, Dill, Macaluso, & Cindy, 1983). Este método baseia-se no princípio de que as células viáveis, uma vez que possuem a membrana celular intata, são

impermeáveis ao azul de tripano, pelo que se mantêm claras e/ou brilhantes. Quando as células não são viáveis, as propriedades de barreira da sua membrana estão alteradas, pelo que se torna permeável ao azul de tripano, corando-as de azul (Gonçalves, Barbosa-Ribeiro, Alves, Silva, & Sarmento-Ribeiro, 2013; Gonçalves, Alves, *et al.*, 2013).

Para a realização deste ensaio homogeneizaram-se volumes iguais de cada suspensão celular e de solução de azul de tripano numa concentração de 0,02% e contaram-se as células brancas e as azuis observadas na esquadria da câmara de *neubauer*. A contagem das células realizou-se num microscópio ótico invertido *Motic AE31* com ampliação 100x (*Motic*®) e com recurso a um hemocítmetro (BOECO and Co). Os estudos foram realizados 24, 48, 72 e 96 horas após a irradiação. A viabilidade celular foi calculada como a percentagem de células viáveis e a proliferação celular foi determinada pelo número de células viáveis.

Viabilidade e Morte Celular

A avaliação do tipo de morte celular foi analisada pelas características morfológicas com recurso à microscopia ótica após coloração das células com meio May-Grünwald Giemsa. Para a realização da coloração *May-Grünwald Giemsa*, de modo a avaliar as citomorfológicas de morte celular, foram realizados esfregaços com as diferentes suspensões celulares previamente irradiadas. Aos esfregaços, depois de secos ao ar, adicionaram-se 1,5 mL de solução de *May-Grünwald* durante 3 minutos e, posteriormente, pipetou-se igual volume de água destilada que ficou a atuar durante 1 minuto. Por fim, decantou-se e acrescentaram-se 3 a 4 gotas da solução de Giemsa, que se deixaram atuar durante 15 minutos. Terminado este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e observadas ao microscópio ótico *Axioskop 2* (*Zeiss, Munich, Alemanha*) (Gonçalves, Alves, *et al.*, 2013).

As fotografias foram obtidas a partir da câmara *AxioCam 1Cc3* (*Zeiss, Munich, Alemanha*) acoplada ao microscópio e, posteriormente, as imagens foram analisadas com recurso ao software *AxioVision* (*Zeiss, Munich, Alemanha*) para



Windows da Microsoft. Os estudos foram realizados 48 horas após a irradiação.

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo (CF) permite contar, examinar e classificar células ou outras partículas microscópicas suspensas em meio líquido. Esta técnica permite analisar de forma rápida, várias características físicas e químicas de células em suspensão através de um equipamento de detecção ótico-eletrónico.

Quarenta e oito horas após a irradiação $0,5 \times 10^6$ células/mL Todas as suspensões celulares obtidas foram centrifugadas a 500xG durante 5 minutos, suspendeu-se o sedimento em 1 mL de PBS (do inglês, *phosphate buffer saline*) e transferiu-se para tubos de citometria (BD Falcon™ 352054). Centrifugou-se novamente a suspensão celular a 500xG durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Os sedimentos ficaram prontos para ser submetidos às marcações de interesse, descritas de seguida. Para todos os estudos de citometria de fluxo o número de eventos considerado foi igual a 10.000, obtidos através do programa *CellQuest™* (Spectroncorp). Para a análise e a quantificação da informação, utilizou-se o programa específico *Paint-a-Gate 3.02*, *Machintosh Software* (BD Biosciences) que corre em computador dedicado.

Para caracterizar o tipo de morte celular recorreu-se à dupla marcação com anexina V (AV) e iodeto de propídeo (IP) (*FITC Annexin V Apoptosis Detection kit I*, *BD Pharmingen*). Após suspensão do sedimento celular obtido, tal como descrito, em 100 µL de tampão de ligação, constituído por HEPES (Sigma H7523) na concentração de 0,01 M, NaCl (Sigma S7653) na concentração 0,14 M, CaCl₂ (Sigma C4901) na concentração de 0,25 mM, adicionaram-se 5 µL de AV marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês fluorescein isothiocyanate) e 2 µL de iodeto de propídeo e incubou-se durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Posteriormente adicionaram-se 400 µL de tampão de ligação e procedeu-se à análise no citómetro *FACSCalibur* (BD Biosciences) utilizando os comprimentos de onda de excitação de 494 nm e de emissão de 519 nm para a AV-FITC e os comprimentos de onda de excitação

de 351 nm e de emissão de 617 nm para o IP. Os resultados foram apresentados sob a forma de percentagem de células em cada grupo (Gonçalves, Barbosa-Ribeiro, *et al.*, 2013; Gonçalves, Alves, *et al.*, 2013; Laranjo *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2014).

Expressão de moléculas pró e anti-apoptóticas

Para a avaliação da relação entre a expressão de BAX (do inglês, *Bcl-2-associated X protein*) e de BCL-2 (do inglês, *B cell lymphoma 2*), as células foram preparadas como descrito anteriormente. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 100 µL de solução de fixação (*Immunostep, Intracell Kit*) e incubou-se durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente.

Posteriormente adicionaram-se 2 mL de PBS, centrifugou-se novamente a 500xG durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. De seguida, adicionaram-se 100 µL de solução de permeabilização (*Immunostep, Intracell Kit*), 1 µg de anticorpo contra a BAX, marcado com ficoeritrina (BAX-PE; Santa Cruz, sc-20067PE) e a mesma quantidade de anticorpo contra a BCL-2, marcado com isotiocianato de fluoresceína (BCL-2-FITC; Santa Cruz, sc-509FITC). Agitou-se cada tubo em vortéx, seguindo-se de incubação no escuro e à temperatura ambiente durante 15 minutos. Após este período de incubação com os anticorpos, lavou-se com 2 mL de PBS e centrifugou-se a 500xG durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 400 µL de PBS. Após homogeneização em vortéx, analisou-se no citómetro utilizando os comprimentos de onda de excitação de 494 nm e de emissão de 519 nm para a fluorescência do FITC e os comprimentos de onda de excitação de 496 nm e de emissão de 578 nm para a fluorescência do PE (Gonçalves, Barbosa-Ribeiro, *et al.*, 2013; Gonçalves, Alves, *et al.*, 2013).



Potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado com recurso à sonda fluorescente *5,5',6,6'-tetrachloro-1,18,3,3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide* (JC1). O JC1 é um catião lipofílico que se pode apresentar sob duas formas, em monómeros (M) ou em agregados (A), consoante o estado de polarização ou de despolarização da membrana mitocondrial, o que determina a emissão de fluorescência com comprimentos de onda diferentes.

Desta forma, a razão entre a fluorescência verde e vermelha, ou seja a razão entre monómeros e agregados (razão M/A) permite inferir acerca do potencial de membrana mitocondrial (Gonçalves, Alves, *et al.*, 2013; Laranjo *et al.*, 2013).

Para a realização destes estudos, uma solução de cerca de 10^6 células em PBS foram centrifugadas durante 5 minutos a $500\times G$ e, posteriormente, suspensas num 1 mL do mesmo tampão. As suspensões celulares foram incubadas durante 15 minutos à temperatura de $37^\circ C$ e ao abrigo da luz com 1 μL de JC1 (Sigma T4069), preparado na concentração de 5 mg/mL em dimetilsulfóxido. De seguida, realizou-se nova lavagem com PBS com recurso a centrifugação e suspenderam-se as células em 400 μL do mesmo tampão. A deteção foi efetuada no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences).

Os resultados obtidos correspondem à média da intensidade de fluorescência (MIF) para os agregados e para os monómeros e são apresentados sob a forma de razão M/A para cada condição experimental.

Stresse oxidativo - peróxidos, anião superóxido e glutatona reduzida

O stresse oxidativo foi avaliado pelos níveis de espécies reativas de oxigénio e da defesa antioxidante GSH. A sonda *2',7'-dichlorofluorescein-diacetate* (DCFH2-DA) permite a deteção de peróxidos intracelulares, uma vez que a sua concentração é diretamente proporcional à intensidade da fluorescência emitida pela sonda.

As suspensões celulares foram centrifugadas a 500xG durante 5 minutos, recuperado o sedimento, ao qual se adicionou 1 mL de PBS. A esta suspensão foi adicionado 1 μ L da sonda DCFH₂-DA (Molecular Probes, Invitrogen), na concentração de 5 mM diluída em dimetilformamida. A incubação foi realizada durante 45 minutos, na ausência de luz e à temperatura de 37°C (Laranjo, 2010). Após o período de incubação, realizou-se uma lavagem com PBS com recurso a centrifugação a 500xG durante 5 minutos após o que o sedimento foi suspenso em 400 μ L de PBS. Após agitação em vortéx, analisou-se no citómetro utilizando os comprimentos de onda de excitação 494 nm e de emissão de 519 nm. Os resultados são apresentados em média de intensidade de fluorescência normalizados relativamente ao controlo (Gonçalves, Alves, *et al.*, 2013; Laranjo *et al.*, 2013).

O dihidroetídio (DHE) é uma sonda utilizada para a deteção de espécies reativas de oxigénio, visto que, após oxidação pelo radical superóxido e da sua intercalação no DNA, emite uma fluorescência na zona do vermelho.

Para esta avaliação as suspensões celulares foram centrifugadas a 500xG durante 5 minutos e o sedimento foi suspenso em 1 mL de PBS. Posteriormente, a suspensão foi incubada com a sonda DHE (Sigma-Aldrich) na concentração de 5 μ M em dimetilsulfóxido, a 37°C, na ausência de luz, durante 15 minutos. De seguida a suspensão foi lavada com centrifugação a 500xG durante 5 minutos. A análise foi realizada no citómetro com um comprimento de onda de excitação de 496 nm e de emissão de 578 nm (Gonçalves, Alves, *et al.*, 2013; Laranjo *et al.*, 2013). Os resultados apresentam-se expressos em média de intensidade de fluorescência normalizados relativamente ao controlo.

A glutatona reduzida (GSH) é um nucleófilo forte que confere proteção das células contra lesão induzida por radicais livres, oxidantes e eletrófilos.

Para a deteção, as suspensões celulares com aproximadamente 3×10^6 células foram centrifugadas a 500xG, durante 5 minutos e suspendeu-se o sedimento um 1 mL de PBS. Adicionou-se o alaranjado de mercúrio (Sigma) de modo a obter uma concentração de 40 μ M e incubou-se à temperatura de 37°C,

na ausência de luz, durante 15 minutos. Após a marcação, as células foram lavadas com centrifugação a 500xG, durante 5 minutos e suspendeu-se o sedimento em 400 µL de PBS. A deteção foi efetuada com o comprimento de onda de excitação de 496nm e de emissão de 578 nm (Gonçalves, Barbosa-Ribeiro, *et al.*, 2013). Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência e posteriormente normalizados relativamente ao controlo.

Avaliação do Ciclo celular

Para este procedimento, as células ($1,0 \times 10^6$ células/ml) foram centrifugadas a 200xG durante 5 minutos, após o que se descartou o sobrenadante. Adicionaram-se 200 µL de etanol a 70%, agitaram-se as células em vortéx e incubaram-se durante 30 minutos a 4°C, no escuro. Posteriormente lavaram-se as células com 2 mL de PBS e centrifugaram-se a 500xg durante 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, adicionaram-se 500 µL de uma solução de *PI/RNase* ficando a incubar durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. A deteção foi feita utilizando o comprimento de onda de excitação de 351 nm e de emissão de 617 nm (Balça-Silva *et al.*, 2015). Para este estudo foram obtidos 50.000 eventos através do programa *CellQuest™* (Spectroncorp). Para a análise e a quantificação da informação, utilizou-se o programa específico *MOD FIT* (BD Biosciences).

Genotoxicidade

A eletroforese em microgel de agarose ou ensaio cometa, como é mais comumente designado, permite avaliar a lesão induzida nas cadeias do ADN.

As células Farage foram transferidas para *falcons* devidamente identificados e suspensas de modo a obter uma concentração de 50.000 células/mL.

O controlo positivo foi preparado a partir da cultura celular controlo (0 Gy). As células foram expostas a peróxido de hidrogénio numa concentração de 20 nM, durante 15 minutos a 4°C. Após esse período, as células foram

centrifugadas a 500xG por 5 minutos e suspensas em PBS, de forma a manter a concentração celular de 50.000 células/mL.

Utilizaram-se lâminas de vidro *StarFrost*[®] (26x76mm) previamente revestidas com uma fina camada de agarose de ponto de fusão normal, na concentração de 1% (A-2790, Sigma Aldrich[®]). Preparou-se uma solução de agarose+ de baixo ponto de fusão na concentração de 1% (A-9414, Sigma Aldrich[®]) e adicionaram-se iguais quantidades da suspensão celular previamente preparada e da agarose de baixo ponto de fusão. Esta suspensão foi homogeneizada e espalhou-se 1 mL sobre as lâminas pré-revestidas com agarose. Seguidamente cobriu-se a suspensão celular com uma lamela, o que proporcionou a formação de uma camada homogênea. Após cerca de 30 minutos a 4°C as lamelas foram removidas delicadamente.

As lâminas foram incubadas durante a noite, a 4°C, em solução de lise alcalina, constituída por NaCl na concentração de 2,5 M, por EDTA na concentração de 100 mM, por Tris na concentração de 10 mM, por DMSO na concentração de 10% e por *Triton* X-100 na concentração de 1%. As lâminas foram equilibradas durante 1 hora em tampão de eletroforese, preparado de fresco, constituído por NaOH na concentração de 300 mM e por EDTA na concentração de 1 mM com pH>13.

A eletroforese foi realizada durante 15 minutos com uma diferença de potencial de 25 V e com corrente de 1 A. Terminada a eletroforese, as lâminas foram submersas em solução de neutralização constituída por Tris na concentração de 0,4 M durante 5 minutos, processo que foi repetido duas vezes.

Com o auxílio de uma pipeta, dispensaram-se algumas gotas de brometo de etídio (Bio-Rad) na concentração de 25 µg/mL sobre as lâminas e manteve-se ao abrigo da luz, durante 20 minutos, à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água ultrapura, com o objetivo de remover o excesso de brometo de etídio e deixadas secar.

A análise e aquisição de imagens foram efetuadas num microscópio de

fluorescência *Motic AE31 (Motic®)*, equipado com um filtro de excitação de 546 nm e com uma lâmpada de mercúrio de 100W. A emissão de fluorescência foi monitorizada no comprimento de onda de 580 nm no refletor com um filtro de 590 nm (Olive & Banáth, 2006). A observação foi realizada com uma ampliação de 250X e a aquisição de imagem foi realizada no *software Motic Images versão 2.0 (Microscope World, EUA)*. A análise dos cometas foi feita com recurso ao *software Tritex CometScore™ Freeware v.1.5 (Tritexcorp)*.

Expressão da P53 e de P53 fosforilada

A avaliação da expressão e da ativação da P53, uma proteína importante na resposta à RT, foi realizada por *western blot*.

Para esta avaliação foi necessário a preparação de extratos de proteína total, cultivadas durante 48 horas após irradiação com 0,5 Gy, com 15 Gy ou com 30 Gy.

Neste sentido findo o tempo de incubação, as células foram transferidas centrifugadas a 1000xG durante 5 minutos. Após centrifugação, descartou-se o meio e adicionou-se 350 µL de tampão de lise para radioimunoprecipitação (RIPA, do inglês *radio-immunoprecipitation assay buffer*), constituído por NaCl na concentração de 150 mM, Tris na concentração de 50 mM, ácido tetracético etileno glicol (EGTA, do inglês *ethylene glycol tetraacetic acid*) na concentração de 5 mM, Triton na concentração de 1%, desoxicolato de sódio na concentração de 0,5% e SDS na concentração de 1%, suplementado no momento de uso com uma mistura de inibidores de proteases, *cOmplete Mini* na concentração recomendada (Roche 11836153001) e com ditioneitol (DTT, do inglês *dithiothreitol*) na concentração de 1 µM. Para a preparação dos extratos para a quantificação da proteína P53 fosforilada à solução previamente mencionada adicionou-se *PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail* na concentração recomendada (Roche 04906837001). Com o auxílio de raspadores, foi possível soltar as células da superfície do frasco e facilitar a lise.

Os lisados foram transferidos para microtubos previamente identificados que

foram mantidos em gelo. Após agitação em vortéx as amostras foram sonicadas três vezes durante cerca de 10 segundos, utilizando uma amplitude de 30% de um sonicador *Vibra Cell (Sonic and Materials inc. EUA, modelo: VC50 de 240 V, 50 W e 20 KHz)*. De seguida, centrifugaram-se as amostras a 14000g, durante 15 minutos mantendo a temperatura a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos e as amostras foram guardadas numa arca congeladora a uma temperatura de -80°C, para posterior processamento.

A quantificação de proteína total foi realizada pelo método do ácido bicinonínico [BCA, do inglês *bicinchoninic acid (BCA™ Protein Assay kit, Pierce)*].

Posteriormente, as amostras foram desnaturadas a 100°C durante 5 minutos após solubilização em solução desnaturante constituída por Tris-HCl na concentração de 250 mM, pH 7,4, glicerol na concentração de 30%, SDS na concentração de 10%, β-mercaptoetanol na concentração de 10 mM e azul de bromofenol na concentração de 0,05%.

Para a realização da separação de proteínas em gel de eletroforese de poli(acrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE, do inglês *sodium dodecyl sulphate – poly-acrilamide gel electrophoresis*) foram preparados géis de acrilamida na concentração de 10%. Os géis foram colocados na tina de eletroforese com tampão constituído por Tris na concentração de 25 mM, glicina na concentração de 192 mM e SDS na concentração de 0,1%, com pH acertado a 8,3 (Bio-Rad, EUA) e, seguidamente, procedeu-se à colocação das amostras e do padrão de pesos moleculares (*Precision PlusStandards, Dual Color, Bio-rad, EUA*). O protocolo de eletroforese consistiu na aplicação de uma diferença de potencial de 80 V durante cerca de 30 minutos que passou depois a 150 V durante 95 minutos.

Terminado o período de eletroforese, os géis foram colocados em contacto direto com as membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês *polyvinylidene fluoride*; Bio-Rad, EUA), previamente ativadas com metanol. A eletrotransferência realizou-se em tampão de ácido N-ciclo-hexil-3-aminopropanossulfónico (CAPS, do inglês *N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic*

acid, Sigma) na concentração de 100 mM, com pH=11, e de metanol na concentração de 10%, com uma diferença de potencial de 100 V, durante uma hora.

As membranas foram imediatamente bloqueadas com solução de albumina sérica bovina na concentração de 4% preparada em TBS-T (do inglês, *Tris buffer saline Tween-20*).

Posteriormente, as membranas foram incubadas, respetivamente, com os anticorpos primários, anti-P53 (DO-7; SC-47698, Santa Cruz *Biotech*, California, EUA) e anti-fosfo-P53 (P53-18; SC-13580, Santa Cruz *Biotech*, California, EUA), ambos preparados em ratinho, durante a noite e a 4°C, sob agitação constante. No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário anti-ratinho (anti-mouse: RPN5781 GE Healthcare), durante uma hora, à temperatura ambiente e sob agitação constante. No final da incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas e, posteriormente, incubadas com substrato enzimático, ECF (ECF *Western Blotting Reagent Pack*, Amersham Biosciences, Reino Unido) durante aproximadamente cinco minutos e reveladas utilizando um leitor de fluorescência (*Typhoon FLSA 9000*, Suécia).

Todas as membranas foram posteriormente ativadas e submetidas à imunodeteção com o anticorpo anti-actina (clone AC-15, A5441 – Sigma) conforme o procedimento descrito para o anticorpo anterior.

Após a aquisição das imagens, o processamento das bandas foi realizado, recorrendo ao *software ImageQuant 5.0* (*Molecular Dynamics*, EUA), através do desenho de regiões de interesse sobre as bandas com peso molecular correspondente às proteínas de interesse, P53 e P53 fosforilada (-53kDa). Para além destas bandas, foram ainda desenhadas regiões de interesse nas bandas de actina (-42kDa). Posteriormente, foi realizado o cálculo da razão entre a intensidade da banda da proteína de interesse, P53 e P53 fosforilada, e a intensidade da banda da actina, respetivamente (Santos *et al.*, 2014). Para cada linha celular a condição de controlo (0 Gy) foi considerada como padrão.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao software IBM SPSS® v.22 e os gráficos foram construídos através de *GraphPad Prism* versão 5.0. Na análise descritiva foram determinadas medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio-padrão e amplitude interquartil) para as variáveis quantitativas.

Para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis recorreu-se ao teste *Shapiro-Wilk*. Para variáveis com distribuição normal foram utilizados testes paramétricos; caso contrário os testes utilizados foram não paramétricos.

A comparação de variáveis quantitativas entre dois grupos foi realizada com recurso ao teste de *U Mann-Whitney* (não paramétrico). A comparação de variáveis quantitativas entre mais de dois grupos foi obtida com recurso ao teste de Kruskal-Wallis (teste não paramétrico) ou com recurso ao teste ANOVA de um fator (teste paramétrico). As comparações múltiplas foram realizadas considerando a correção de *Bonferroni*.

A comparação dos resultados dos ensaios clonogénicos com o respetivo controlo foi feita pela determinação do intervalo de confiança a 95% (IConf 95%) do valor da condição, considerando-se significativamente diferente do controlo caso o IConf 95% não englobasse o valor 1.

As curvas de dose-resposta para os estudos de citotoxicidade foram obtidas através do ajuste dos dados experimentais a uma curva sigmoideal, com recurso ao software OriginPro utilizando o modelo “DoseResp”. As curvas referentes aos ensaios clonogénicos foram obtidas considerando os seguintes modelos: linear quadrático ($SF=e^{-(\alpha D-\beta D^2)}$) e o modelo linear de agressão celular ($SF=e^{-(D/D^0)}$), com recurso ao mesmo software. Foi considerado um nível de significância de 5%.

Resultados

Avaliação da viabilidade, proliferação e sobrevivência



As células Farage expostas à RI sofreram uma diminuição da sua viabilidade e proliferação, de forma dependente da dose e do tempo após exposição, tal como representado na Figura 1.

A viabilidade celular, após exposição, diminuiu significativamente após exposição a todas as doses em estudo ($p < 0,05$ para 0,5 Gy e $p < 0,001$ para 15, 30 e 60 Gy). Verificou-se que a dose que induz a diminuição da viabilidade em 50% foi de cerca de 30 Gy, como pode ser visto na Figura 1A.

Por outro lado, no que diz respeito à proliferação celular ao longo do tempo, verificaram-se comportamentos diferentes dependendo das doses. Assim, com exposição à dose de 0,5 Gy foi observado um crescimento modesto das células Farage durante as primeiras 24 horas, que é mantida para todos os tempos considerados. Para as restantes doses de radiação estudadas (15, 30 e 60 Gy) foi observada uma diminuição contínua e significativa para todos os tempos ($p < 0,001$), comparando com os controlos (Figura 1B).

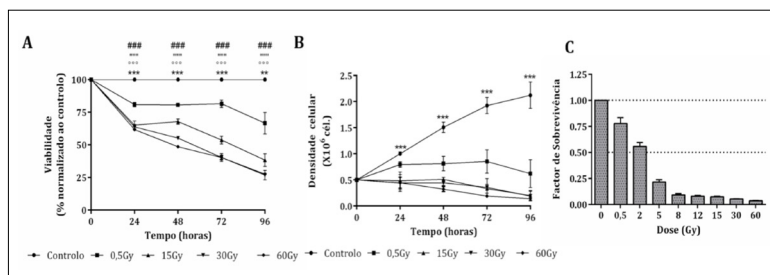


Figura 1. Viabilidade celular (A), proliferação (B) e sobrevivência celular (C) após a exposição a RI. (A) Curvas de dose-resposta das células Farage após exposição a RI, por ensaio de exclusão com Trypan Blue, avaliada 24h, 48h, 72h e 96h após exposição. Os resultados são expressos como percentagem de viabilidade, normalizada ao controlo. A significância estatística é representada para cada dose em relação ao controlo: 0,5 Gy * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,001$; 15 Gy ^{ooo} $p < 0,001$; 30 Gy ^{ooo} $p < 0,001$; 60 Gy ^{###} $p < 0,001$). (B) A proliferação celular das células Farage após exposição a RI, por ensaio de exclusão com Trypan Blue, avaliada 24h, 48h, 72h e 96h após exposição. Os resultados são expressos como densidade celular (número de células). A significância estatística é representada para cada dose em relação ao controlo: 0,5 Gy * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,001$. (C) Representação do fator de sobrevivência, avaliado pelo ensaio clonogénico, 7 dias após a exposição à radiação ionizante. Os resultados de RI são expressos como fator de sobrevivência, normalizado ao controlo, como a média \pm SEM de, pelo menos, seis experiências independentes.

No que diz respeito à sobrevivência celular, verificou-se uma diminuição significativa do SF, após a exposição a todas as doses de radiação estudadas, de forma dependente da dose. A dose letal média (DL_{50}) foi de $1,73 \pm 0,27$ Gy, calculada aplicando o modelo de agressão celular linear-quadrático.

Avaliação da morte celular

A morte celular foi avaliada recorrendo a duas metodologias distintas, a fim de compreender quais os mecanismos envolvidos, 48 horas após a exposição à radiação (Figura 2).

As características morfológicas das células Farage foram determinadas pela coloração May-Grunwald-Giemsa, tal como representado na Figura 2A. Os estudos de morfologia demonstraram que a exposição a doses de RI mais baixas induziu um aumento no número de células que sofrem características morfológicas de morte celular por apoptose, tais como formação de *blebs*, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos (Figura 2A-B e A-C). Além disso, a exposição a doses mais elevadas apresentou um aumento no número de células em morte celular por necrose, tal como observado na Figura 2A-D e 2A-E.

De facto, tal como podemos observar na Figura 2B, comparativamente ao controlo ($85,80 \pm 0,92\%$), verificou-se uma diminuição do número de células viáveis após exposição às doses de 0,5 Gy ($66,50 \pm 1,73\%$, $p < 0,001$), 15 Gy ($55,40 \pm 2,14\%$, $p < 0,001$), 30 Gy ($49,20 \pm 3,09\%$, $p < 0,001$) e 60 Gy ($41,60 \pm 2,16\%$, $p < 0,001$). Para além disso, a diminuição da viabilidade celular induzida pela RI é devida a um aumento significativo das células em morte celular por apoptose em comparação com o controlo ($6,60 \pm 0,51\%$), após exposição a 0,5 Gy ($22,17 \pm 1,14\%$, $p < 0,001$), 15 Gy ($31,80 \pm 1,66\%$, $p < 0,001$), 30 Gy ($38,00 \pm 2,65\%$, $p < 0,001$) e 60 Gy ($33,80 \pm 0,58\%$, $p < 0,001$).

Verificou-se igualmente um aumento significativo da população celular em morte celular por apoptose tardia/necrose comparativamente ao controlo

($1,20 \pm 0,20\%$) após exposição às doses de 0,5 Gy ($7,83 \pm 1,19\%$, $p=0,038$), 15 Gy ($9,60 \pm 1,44\%$, $p=0,009$), 30 Gy ($9,00 \pm 1,70\%$, $p=0,029$) e 60 Gy ($9,20 \pm 0,66\%$, $p=0,0013$).

Paralelamente, foram avaliados mecanismos de modulação da morte celular por apoptose após exposição à RI, através do estudo da razão BAX/BCL-2, por citometria de fluxo. Tal como observado na Figura 2C, verificou-se que um aumento da dose de RI induziu um aumento significativo da razão BAX/BCL-2 em comparação com o controlo, após exposição às doses de 0,5 Gy ($1,24 \pm 0,06$, $p=0,014$), 15 Gy ($1,57 \pm 0,07$, $p=0,001$), 30 Gy ($1,75 \pm 0,05$, $p=0,001$) e 60 Gy ($1,90 \pm 0,12$, $p=0,005$).

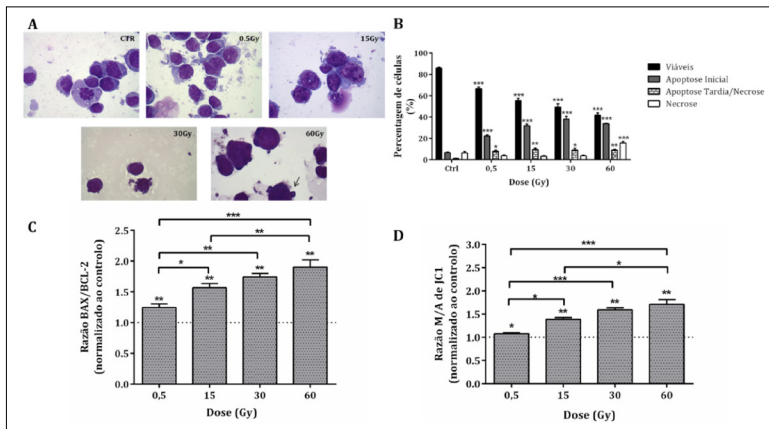


Figura 2. Avaliação da morte celular e os mecanismos de morte celular: (A) Avaliação das características morfológicas das células Farage por coloração May-Grunwald Giemsa, após a exposição RI. Imagens representativas de células controlo, e células expostas às doses de 0,5 Gy, 15 Gy, 30 Gy e 60 Gy. As setas representam a formação de blebbings. Amplificação de 400X. (B) A viabilidade e tipos de morte celular das células Farage, 48h após a exposição a RI, avaliada por citometria de fluxo por dupla marcação de Anexina V/iodeto de propídio. Os resultados são expressos como a média±SEM da percentagem de células viáveis e células que sofrem morte celular por apoptose inicial, apoptose tardia/necrose e necrose, de pelo menos quatro experiências independentes. (C) Avaliação da razão de BAX/BCL-2 em células Farage, 48h após a exposição RI. Os resultados são expressos como a média±SEM da intensidade média de fluorescência, normalizada ao controlo de, pelo menos, quatro experiências independentes. (D) Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por avaliação da razão Monómeros/Agregados (M/A) de JC-1, por citometria de fluxo, nas células Farage, 48h após a exposição a RI. Os resultados são expressos como a média±SEM da intensidade média de fluorescência da razão M/A, normalizada ao controlo, de pelo menos quatro experiências independentes. A significância estatística é expressa em relação ao controlo: $p<0,05$, $**p<0,01$ e $***p<0,001$.

Para além disso, de forma a confirmar o envolvimento mitocondrial na morte celular induzida pela RI, o potencial de membrana mitocondrial foi avaliado por FC usando a sonda JC1. Em células apoptóticas, o potencial de membrana mitocondrial colapsa e a sonda JC1 não se acumula na mitocôndria, permanecendo na sua forma monomérica no citoplasma. Os nossos resultados demonstraram um aumento da razão M/A de JC1, proporcional ao aumento das doses de RI, refletindo um decréscimo no potencial de membrana mitocondrial. Assim, tal como na Figura 2D, a razão M/A aumenta com exposição às doses de 0,5 Gy ($1,07 \pm 0,002$, $p=0,045$), 15 Gy ($1,39 \pm 0,04$, $p=0,002$), 30 Gy ($1,59 \pm 0,04$, $p=0,001$) e 60 Gy ($1,71 \pm 0,10$, $p=0,006$).

Avaliação do ciclo celular e stresse oxidativo

Foram avaliados os efeitos da exposição à RI no que toca ao ciclo celular nas células da linha celular Farage, sendo que os resultados estão representados na Figura 3A.

Observou-se que, 48h após exposição à RI, se verificou um aumento significativo do pico pré-apoptótico pré- G_0 comparativamente ao controlo ($2,60 \pm 0,51\%$), após exposição às doses de 15 Gy ($12,50 \pm 1,57\%$, $p<0,001$), 30 Gy ($19,33 \pm 0,99\%$, $p<0,001$) e 60 Gy ($12,25 \pm 1,60\%$, $p<0,001$). Observou-se igualmente uma diminuição significativa da população celular na fase G_0/G_1 comparativamente ao controlo ($64,20 \pm 1,6\%$), após exposição às doses de 15 Gy ($31,00 \pm 1,93\%$; $p<0,001$), 30 Gy ($32,33 \pm 2,39\%$, $p<0,001$) e 60 Gy ($41,50 \pm 0,96\%$, $p<0,001$). Verificou-se também um aumento significativo do bloqueio do ciclo celular na fase G_2/M , comparativamente ao controlo ($10,40 \pm 1,72\%$) após exposição às doses de 15 Gy ($29,00 \pm 3,54\%$, $p<0,001$), 30 Gy ($25,33 \pm 3,54\%$, $p<0,001$) e 60 Gy ($42,25 \pm 2,75\%$, $p<0,001$).

Além disso, os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigénio (peróxidos e anião superóxido), foram determinados por citometria de fluxo recorrendo às sondas DCFH-DA e DHE, bem como a defesa antioxidante GSH. Geralmente, e tal como demonstrado na Figura 3B-D, a produção de ROS aumenta significativamente após exposição à RI. De facto, verificou-se um aumento significativo dos níveis intracelulares de peróxidos comparativamente

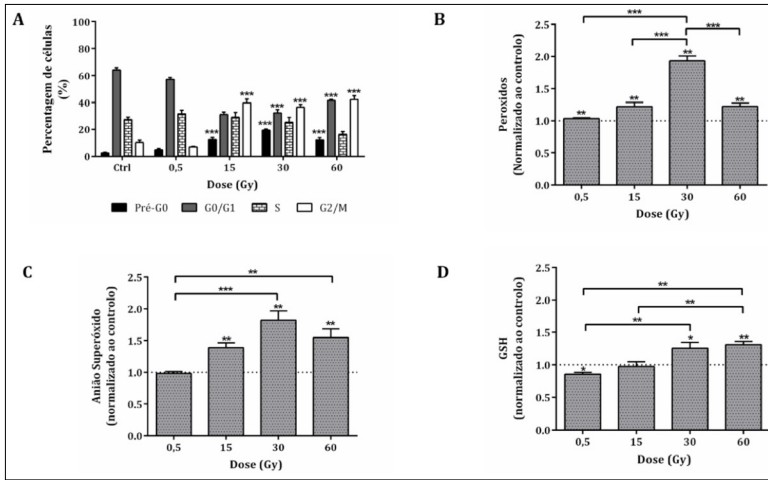


Figura 3. Avaliação das alterações no ciclo celular e stress oxidativo após a exposição à radiação ionizante. (A) avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo e representação gráfica das fases do ciclo celular nas células Farage, 48h após exposição à RI. Os resultados são expressos como a média±SEM da percentagem de células identificadas para cada fase do ciclo celular de, pelo menos, quatro experiências independentes. Avaliação do stress oxidativo por citometria de fluxo por meio da avaliação dos níveis intracelulares de peróxidos (B), anião superóxido (C) e de GSH (D) nas células Farage 48h após exposição à RI. Os resultados são expressos como a média±SEM da intensidade de fluorescência de, pelo menos, quatro experiências independentes. A significância estatística é expressa em relação ao controlo: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$.

ao controlo, após exposição às doses de 15 Gy ($1,22\pm 0,07$, $p=0,043$), 30 Gy ($1,93\pm 0,08$, $p<0,001$) e 60 Gy ($1,22\pm 0,05$, $p=0,024$) (Figura 3B). Resultados similares foram observados nos níveis intracelulares de anião superóxido, com um aumento significativo comparativamente ao controlo, com exposição às doses de 15 Gy ($1,39\pm 0,08$, $p=0,016$), 30 Gy ($1,82\pm 0,15$, $p=0,011$) e 60 Gy ($1,55\pm 0,13$, $p=0,024$), como demonstrado na Figura 3C. Foi também observado um aumento significativo nos níveis intracelulares da defesa antioxidante GSH após exposição às doses de 30 Gy ($1,26\pm 0,09$, $p=0,046$) e 60 Gy ($1,31\pm 0,05$, $p=0,004$), como mostrado na Figura 3D..

Avaliação de lesões no DNA

A RI está, geralmente, relacionada com mono e/ou bi-alkilação de DNA e, consequentemente, a morte celular. Tal como descrito na Figura 4A, observou-se um aumento do número de cometas mais pronunciados após exposição à dose de 30 Gy. Observou-se um aumento significativo do momento da cauda em relação ao controlo após exposição às doses de 15 Gy ($p<0,001$), 30 Gy ($p<0,001$) e 60 Gy ($p<0,001$), conforme mostrado na Figura 4B.

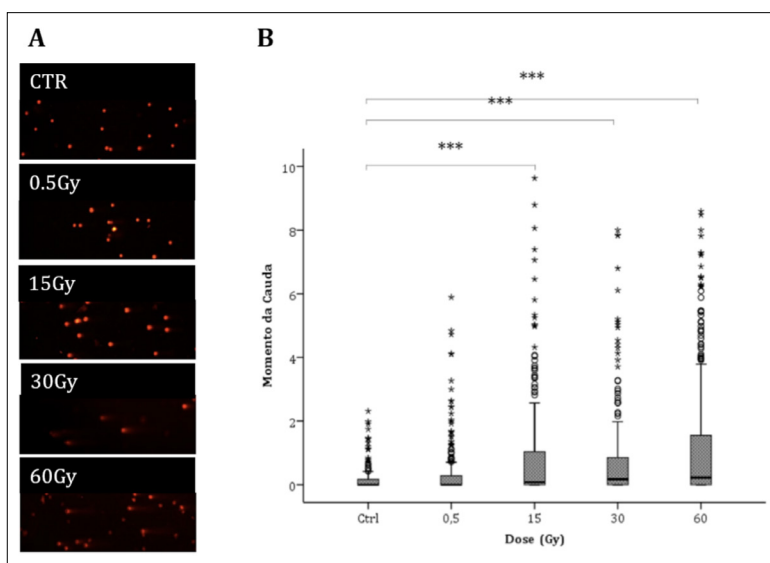


Figura 4. Genotoxicidade induzida nas células Farage, após exposição à RI. (A) Fotografias ilustrativas da eletroforese em gel de célula única (comumente ensaio cometa) na linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage, 48h após a exposição à RI, com as doses de 0,5 Gy, 15 Gy, 30 Gy, 60 Gy, controlo (CTR) e controlo positivo (CTR+). (B) Representação do momento da cauda, determinado pelo ensaio cometa, 48h após a exposição à RI. Os resultados são expressos como média±SEM de seis experiências independentes ($n = 6$), com um mínimo de 100 cometas para cada condição. A significância estatística é expressa em relação ao controlo: *** $p<0,001$

Avaliação da expressão de P53

A proteína P53 desempenha um papel crucial na regulação de vários mecanismos celulares. Alterações nesta proteína podem levar a perturbações na regulação de células normais. Tal como pode ser observado na Figura 5A, a RI induz um aumento significativo nos níveis de expressão de P53 total em comparação com o controlo, após exposição às doses de 15 Gy ($1,90 \pm 0,11$, $p=0,001$) e 30 Gy ($2,74 \pm 0,26$, $p=0,001$). Do mesmo modo, verificaram-se níveis aumentados da proteína P53 fosforilada nas células Farage em comparação com o controlo, quando as células foram expostas às doses de 0,5 Gy ($1,22 \pm 0,07$, $p=0,044$), 15 Gy ($1,64 \pm 0,16$, $p=0,007$) e 30 Gy ($2,66 \pm 0,24$, $p=0,006$), como descrito na Figura 5B.

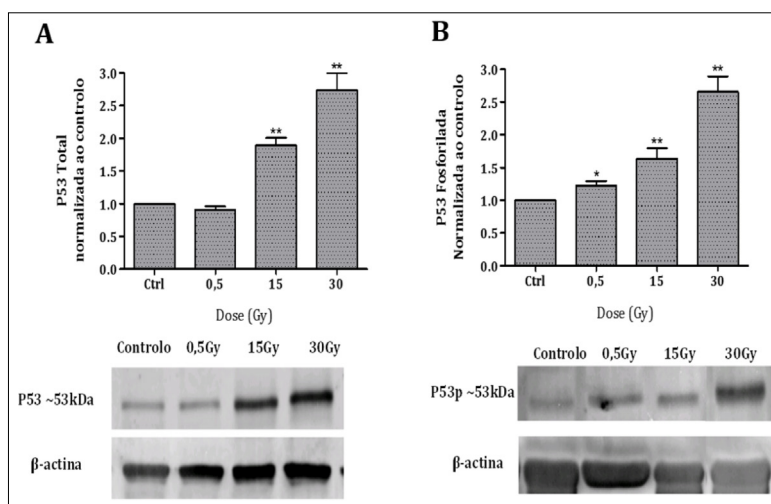


Figura 5. Expressão da proteína P53 total (A) e P53 fosforilada (B) nas células da linha celular Farage, 48h após a exposição à RI. Os resultados são expressos como a média da intensidade de fluorescência da razão P53 total/actina (A) e da razão P53p/actina (B), normalizada ao controlo, após a exposição às doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e 30 Gy. Gráficos representam a média±SEM, de quatro experiências independentes. As figuras consistem em imagens representativas da imunotransferência da expressão de P53 total, pP53 e β -actina para cada condição experimental. Significância estatística é representada em relação ao controlo * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

Discussão

A radiorresistência permanece como uma barreira fundamental que limita a eficácia da RT no tratamento do cancro. Evidências recentes sugerem que a radiorresistência é devido ao repovoamento do tumor e envolve várias vias de sinalização. Assim, uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares induzidos pela RI pode contribuir, no futuro próximo, para reduzir o número de casos de radiorresistência (Mendes *et al.*, 2015). Embora a RT esteja a ser substituída progressivamente por outras estratégias de tratamento, tais como QT, é ainda um tratamento bastante importante. O estabelecimento de RT, como uma possível estratégia de tratamento em LDGCB, poderia proporcionar vantagens no que concerne ao prognóstico, na fase inicial ou no caso de doença localizada (Mendes *et al.*, 2015).

Até à data, a realização do tratamento de RT com recurso a elevadas doses individuais, não tem sido extensivamente estudado, muito devido às recentes inovações em termos de novos dispositivos de irradiação e ao uso de imagem funcional tridimensional, que começam a ser usados em determinados regimes de tratamento (Mendes *et al.*, 2015). Assim, torna-se essencial estudar os efeitos da RT, nomeadamente na proliferação e viabilidade celular, o tipo de morte celular induzida, lesão no ADN de células expostas a diferentes doses únicas de RI.

Os nossos resultados mostraram que a RI induz efeitos citotóxicos e antiproliferativos nas células Farage, de uma forma dependente da dose e do tempo de exposição (até 96 horas). No entanto, estes resultados fornecem uma avaliação a curto tempo dos efeitos da RI, pelo que recorremos ao ensaio clonogénico, que é o *gold standard* para a avaliação do fator de sobrevivência ao longo tempo. Desta forma, verificámos uma DL_{50} para células Farage de $1,73 \pm 0,61$ Gy, sendo uma DL_{50} relativamente baixa, em comparação com outras linhas celulares, nomeadamente em tumores sólidos, tais como as determinadas nas linhas celulares A549 e H460, recorrendo a um Shepherd Mark 1 68 Irradiator, (137Cs Irradiator) (JL Shepherd, San Fernando, CA,



USA, numa taxa de dose de 70,6 rad/min, à temperatura ambiente (Gomez-Casal *et al.*, 2013), e em comparação com os resultados obtidos por nós num estudo realizado em três linhas celulares de cancro de pulmão (Mendes, Sales, *et al.*, 2015). De facto, a RI induz a ativação de vários mecanismos intracelulares, tais como lesões no ADN, interrupção do ciclo celular e a produção de ROS (Mendes *et al.*, 2015). No nosso estudo, observou-se que a RI induziu morte celular nas células da linha celular Farage de forma dependente da dose, sendo que a morte celular ocorre principalmente por apoptose, como observado pelo aumento das populações de células em morte celular por apoptose e pelo aumento das razões BAX/BCL-2 e M/A. Estes resultados também foram observados pela nossa equipa nas células da linha celular A549, cujas células apresentam uma expressão P53^{Wild} (Mendes *et al.*, 2015).

Estes resultados poderão estar relacionados com um aumento significativo da produção de ROS, nomeadamente pelo aumento do anião superóxido e de peróxidos, que foram também avaliados por outros autores (Lee, Kim, Kil, & Park, 2007; Yamaguchi & Kashiwakura, 2013; Yamamori *et al.*, 2012). Por outro lado, após a exposição à RI, as células Farage tentam recuperar do desequilíbrio existente no ambiente oxidativo através de um aumento significativo dos níveis de GSH. Outros autores evidenciaram a existência de duas fases distintas da produção de ROS após exposição à RI, sendo que um está associado com um decréscimo tardio dos níveis de ROS por sua vez associado a GSH reduzida e potencial de membrana mitocondrial reduzido, e um segundo relacionado com a produção exógena de ROS que induz libertação de citocromo c diretamente em mitocôndrias isoladas que indicam que a produção tardia de ROS está correlacionada com funções mitocondriais críticas. Estas funções estão provavelmente estritamente ligadas à libertação de citocromo c e ativação da via das caspases (Q. Chen *et al.*, 2003). Para além disso, no nosso estudo observou-se que a participação das vias mitocondriais é altamente regulado por um equilíbrio entre a proteína pro-apoptótica BAX e a proteína anti-apoptótica BCL-2 que é crucial nos mecanismos induzidos pela RI (Loriot *et al.*, 2014; Mendes, Sales, *et al.*, 2015).

A exposição à RI também induziu um bloqueio do ciclo celular das células Farage na fase G₂/M, que poderá estar relacionado com o aumento significativo na produção de ROS e lesões no ADN, seguidos por uma grande e concomitante aumento dos níveis de proteína P53 total e fosforilada, que desempenha um papel crucial na regulação da apoptose e no bloqueio do ciclo celular, tal como observado na linha celular de cancro do pulmão A549 (Mendes, Sales, *et al.*, 2015). De facto, a ativação da P53 é conhecida como sendo reguladora da morte celular apoptótica após exposição a insultos celulares, incluindo lesões no ADN, ativação de oncogenes ou hipoxia (Montero, Dutta, van Bodegom, Weinstock, & Letai, 2013; She, Bode, & Ma, 2001; Wu, 2004).

Após lesões no ADN, a P53^{wild} é ativada, promovendo bloqueio do ciclo celular, transativação de enzimas reparadoras e, se a lesão não puder ser reparado, apoptose (Montero *et al.*, 2013; She *et al.*, 2001; Wu, 2004). Devido a estas alterações, tais como mutações e expressões alteradas, a P53 promove o crescimento de vantagens e assegura a sobrevivência em células tumorais pela inibição da resposta apoptótica necessária para a supressão tumoral (X. Chen *et al.*, 2014; Lien *et al.*, 2015; Yamamori *et al.*, 2012). Montero *et al.*, (2013) demonstraram que a P53 pode também controlar morte celular não apoptótica e que pode ser selecionada por células tumorais que promovem não só a sua resistência à apoptose mas também a necrose, e este mecanismo pode explicar a resistência a quimio e RT mesmo quando conduz a mecanismos não apoptóticos.

Em resumo, os nossos resultados demonstraram que a RI induz morte celular de forma dependente da dose e do tempo após exposição. O estudo do tipo de morte celular e os mecanismos subjacentes nesta linha celular revelaram que a RI, nas células Farage, induz lesões que levam a morte celular pela via intrínseca da apoptose. Desta forma, a morte celular pode ocorrer preferencialmente por apoptose ou apoptose tardia/necrose com um significativo aumento da produção de ROS, lesões no ADN conduzindo à expressão elevada e consequente expressão de P53, resultando em bloqueio celular na fase G₂/M.

Os nossos resultados demonstraram que os efeitos da RI pode alterar um

Irradiação da linha celular de linfoma... | F. Mendes, C. Domingues, S. Schugk, A. Abrantes, A. Gonçalves, T. Sales, R. Teixeira, R. Silva, J. Estrela, M. Laranjo, J. Casalta-Lopes, C. Rocha, P. Simões, A. Sarmiento, M. Botelho & M. Rosa

número significativo de alvos moleculares e celulares e que a sua compreensão é essencial de forma a enaltecer a importância da RI no tratamento de LDGCB..

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro (Projeto Estratégico Pest-C/SAU/UI3282/2013 e UID/NEUE/04539/2013, COMPETIR-FEDER) e ao Serviço de RT do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

Referências

- Alizadeh, a a, Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, a, ... Staudt, L. M. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403(February), 503–511. doi:10.1038/35000501
- Ba, C. (2013). The Role of Radiation Therapy in the Treatment of Stage I-II Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep*, 8 (3), 236–242. doi:10.1007/s11899-013-0170-5
- Balça-Silva, J., Matias, D., do Carmo, A., Girão, H., Moura-Neto, V., Sarmiento-Ribeiro, A. B., & Lopes, M. C. (2015). Tamoxifen in combination with temozolomide induce a synergistic inhibition of PKC-pan in GBM cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(4), 722–732. doi:10.1016/j.bbagen.2014.12.022
- Balça-Silva, J., Neves, S. S., Gonçalves, A. C., Abrantes, A. M., Casalta-Lopes, J., Botelho, M. F., ... Silva, H. C. (2012). Effect of miR-34b overexpression on the radiosensitivity of non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Research*, 32(5), 1603–1610. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22593438> \n<http://ar.iiarjournals.org/content/32/5/1603.long>
- Ballonoff, A., Rusthoven, K. E., Schwer, A., McCammon, R., Kavanagh, B., Bassetti, M., ... Rabinovitch, R. (2008). Outcomes and Effect of Radiotherapy in Patients With Stage I or II Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Surveillance, Epidemiology, and End Results Analysis. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 72(5), 1465–1471. doi:10.1016/j.ijrobp.2008.02.068
- Ben-Bassat, H., Polliack, A., Shlomain, Z., Kohn, G., Hadar, R., Rabinowitz, R., ... Schlesinger, M. (1992). Farage, a Novel Early B Cell Lymphoma Cell Line with Trisomy 11. *Leukemia and Lymphoma*, 6(6), 513–521. doi:10.3109/10428199209053591



- Bonnet, C., Fillet, G., Mounier, N., Ganem, G., Molina, T. J., Thiéblemont, C., ... Reyes, F. (2007). CHOP alone compared with CHOP plus radiotherapy for localized aggressive lymphoma in elderly patients: A study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Journal of Clinical Oncology*, 25(7), 787–792. doi:10.1200/JCO.2006.07.0722
- Buch, K., Peters, T., Nawroth, T., Sängler, M., Schmidberger, H., & Langguth, P. (2012). Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - A comparative study. *Radiation Oncology*, 7, 1. doi:10.1186/1748-717X-7-1
- Campo, E., Swerdlow, S. H., Harris, N. L., Pileri, S., Stein, H., & Jaffe, E. S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: Evolving concepts and practical applications. *Blood*, 117(19), 5019–5032. doi:10.1182/blood-2011-01-293050
- Chen, Q., Chai, Y.-C., Mazumder, S., Jiang, C., Macklis, R. M., Chisolm, G. M., & Almasan, A. (2003). The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction. *Cell Death and Differentiation*, 10(3), 323–334. doi:10.1038/sj.cdd.4401148
- Chen, X., Liao, C., Chu, Q., Zhou, G., Lin, X., Li, X., ... Yue, Z. (2014). Dissecting the molecular mechanism of ionizing radiation-induced tissue damage in the feather follicle. *PloS One*, 9(2), e89234. doi:10.1371/journal.pone.0089234
- Franken, N. a P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319. doi:10.1038/nprot.2006.339
- Gonçalves, A. C., Alves, V., Silva, T., Carvalho, C., Oliveira, C. R. De, & Sarmiento-Ribeiro, A. B. (2013). Oxidative stress mediates apoptotic effects of ascorbate and dehydroascorbate in human Myelodysplasia cells in vitro. *Toxicology in Vitro*, 27(5), 1542–1549. doi:10.1016/j.tiv.2013.03.009

- Gonçalves, A. C., Barbosa-Ribeiro, A., Alves, V., Silva, T., & Sarmiento-Ribeiro, A. B. (2013). Selenium Compounds Induced ROS-Dependent Apoptosis in Myelodysplasia Cells. *Biological Trace Element Research*, 154(3), 440–447. doi:10.1007/s12011-013-9749-x
- Horning, S. J., Weller, E., Kim, K., Earle, J. D., O’Connell, M. J., Habermann, T. M., & Glick, J. H. (2004). Chemotherapy with or without radiotherapy in limited-stage diffuse aggressive non-Hodgkin’s lymphoma: Eastern Cooperative Oncology Group Study 1484. *Journal of Clinical Oncology*, 22(15), 3032–3038. doi:10.1200/JCO.2004.06.088
- Hudson, B., Hudson, G., Maclennan, K., Anderson, L., & Linch, D. (1994). Clinical Stage-1 Non-Hodgkins-Lymphoma - Long-Term Follow-Up of Patients Treated By the British National Lymphoma Investigation With Radiotherapy Alone As Initial Therapy. *British Journal of Cancer*, (69), 1088–1093. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/42259/>
- Kaminski, M. S., Coleman, C. N., Colby, T. V., Cox, R. S., & Rosenberg, S. a. (1986). Factors predicting survival in adults with stage I and II large-cell lymphoma treated with primary radiation therapy. *Annals of Internal Medicine*, 104(6), 747–756. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3518561>
- Laranjo, M., Serra, A. C., Abrantes, M., Piñeiro, M., Gonçalves, A. C., Casalta-Lopes, J., ... Botelho, F. (2013). 2-Bromo-5-hydroxyphenylporphyrins for photodynamic therapy: Photosensitization efficiency, subcellular localization and in vivo studies. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 10(1), 51–61. doi:10.1016/j.pdpdt.2012.05.003
- Lee, J. H., Kim, S. Y., Kil, I. S., & Park, J.-W. (2007). Regulation of ionizing radiation-induced apoptosis by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(18), 13385–94. doi:10.1074/jbc.M700303200



Lien, J.-C., Huang, C.-C., Lu, T.-J., Tseng, C.-H., Sung, P.-J., Lee, H.-Z., ... Lu, T.-L. (2015). Naphthoquinone derivative PPE8 induces endoplasmic reticulum stress in p53 null H1299 cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 453679. doi:10.1155/2015/453679

Loriot, Y., Mordant, P., Dugue, D., Geneste, O., Gombos, A., Opolon, P., ... Deutsch, E. (2014). Radiosensitization by a novel Bcl-2 and Bcl-XL inhibitor S44563 in small-cell lung cancer. *Cell Death & Disease*, 5, e1423. doi:10.1038/cddis.2014.365

Mamede, A. C., Pires, A. S., Abrantes, A. M., Tavares, S. D., Gonçalves, A. C., Casalta-Lopes, J. E., ... Botelho, M. F. (2012). Cytotoxicity of Ascorbic Acid in a Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (WiDr): In Vitro and In Vivo Studies. *Nutrition and Cancer*, 64(7), 1049–1057. doi:10.1080/01635581.2012.713539

Martinelli, G., Gigli, F., Calabrese, L., Ferrucci, P. F., Zucca, E., Crosta, C., ... Moreno Gomez, H. (2009). Early stage gastric diffuse large B-cell lymphomas: results of a randomized trial comparing chemotherapy alone versus chemotherapy + involved field radiotherapy. (IELSG 4). [corrected]. *Leukemia & Lymphoma*, 50(6), 925–931. doi:10.1080/10428190902912478

Mendes, F., Domingues, C., Teixo, R., Abrantes, A. M., Gonçalves, A. C., Nobre-Gois, I., ... Rosa, M. S. (2015). The importance of radiotherapy on diffuse large B cell lymphoma treatment: a current review. *Cancer and Metastasis Reviews*, 34(3), 511–525. doi:10.1007/s10555-015-9581-1

Mendes, F., Sales, T., Domingues, C., Schugk, S., Abrantes, A. M., Gonçalves, A. C., ... Rosa, M. S. (2015). Effects of X-radiation on lung cancer cells: the interplay between oxidative stress and P53 levels. *Medical Oncology*, 32(12), 1–9. doi:10.1007/s12032-015-0712-x

Miller, T. P., Dahlberg, S., Cassady, J. R., Adelstein, D. J., Spier, C. M., Grogan, T. M., ... Fisher, R. I. (1998). Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized intermediate- and high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 339(1), 21–26. doi:10.1056/NEJM199807023390104

- Monfardini, S., Banfi, a, Bonadonna, G., Rilke, F., Milani, F., Valagussa, P., & Lattuada, a. (1980). Improved five year survival after combined radiotherapy-chemotherapy for stage I-II non-Hodgkin's lymphoma. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 6(2), 125–134. doi:10.1016/0360-3016(80)90189-3
- Montero, J., Dutta, C., van Bodegom, D., Weinstock, D., & Letai, A. (2013). p53 regulates a non-apoptotic death induced by ROS. *Cell Death and Differentiation*, 20(11), 1465–74. doi:10.1038/cdd.2013.52
- Morton, L. M., Wang, S. S., Devesa, S. S., Hartege, P., Weisenburger, D. D., & Linet, M. S. (2006). Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*, 107(1), 265–276. doi:10.1182/blood-2005-06-2508
- Ng, A. K. (2007). Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Seminars in Radiation Oncology*, 17(3), 169–175. doi:10.1016/j.semradonc.2007.02.002
- Nissen, N. I., Ersbøll, J., Hansen, H. S., Walbom-Jørgensen, S., Pedersen-Bjergaard, J., Hansen, M. M., & Rygård, J. (1983). A randomized study of radiotherapy versus radiotherapy plus chemotherapy in stage I-II non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer*, 52(1), 1–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6406037>
- Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1), 23–29. doi:10.1038/nprot.2006.5
- Persky, D. O., & Miller, T. P. (2009). Localized large cell lymphoma: is there any need for radiation therapy? *Current Opinion in Oncology*, 21(5), 401–406. doi:10.1097/CCO.0b013e32832f3c8b
- Persky, D. O., Unger, J. M., Spier, C. M., Stea, B., LeBlanc, M., McCarty, M. J., ... Miller, T. P. (2008). Phase II study of rituximab plus three cycles of CHOP and involved-field radiotherapy for patients with limited-stage aggressive B-cell lymphoma: Southwest Oncology Group Study 0014. *Journal of Clinical Oncology*, 26(14), 2258–2263. doi:10.1200/JCO.2007.13.6929

- Phan, J., Mazloom, A., Medeiros, L. J., Zreik, T. G., Wogan, C., Shihadeh, E., ... Dabaja, B. S. (2010). Benefit of consolidative radiation therapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 28(27), 4170–4176. doi:10.1200/JCO.2009.27.3441
- Rafehi, H., Orlowski, C., Georgiadis, G. T., Ververis, K., El-Osta, A., & Karagiannis, T. C. (2011). Clonogenic assay: adherent cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 49, 15–17. doi:10.3791/2573
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Fisher, R. I., ... Staudt, L. M. (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 346(25), 1937–1947. doi:10.1056/NEJMoa012914
- Santos, K., Laranjo, M., Abrantes, A. M., Brito, A. F., Gonçalves, C., Sarmento Ribeiro, A. B., ... Abrantes, M. (2014). Targeting triple-negative breast cancer cells with 6,7-bis(hydroxymethyl)-1H,3H-pyrrolo[1,2-c]thiazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 79, 273–81. doi:10.1016/j.ejmech.2014.04.008
- She, Q., Bode, A. M., & Ma, W. (2001). Resveratrol-induced Activation of p53 and Apoptosis Is Mediated by Extracellular- Signal-regulated Protein Kinases and p38 Kinase Resveratrol-induced Activation of p53 and Apoptosis Is Mediated by Extracellular-, 1604–1610.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, E. Al. (2008). *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. (I. A. for R. on C. Cancer, Ed.). Lyon.
- Weisenthal, L. M., Marsden, J. A., Dill, P. L., Macaluso, C. K., & Cindy, K. M. (1983). A Novel Dye Exclusion Method for Testing in Vitro Chemosensitivity of Human Tumors A Novel Dye Exclusion Method for Testing in Vitro Chemosensitivity of. *Cancer Research*, 43, 749–757.

- Wu, G. S. (2004). The Functional Interactions Between the p53 and MAPK Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 3(2), 156–161.
- Yamaguchi, M., & Kashiwakura, I. (2013). Role of reactive oxygen species in the radiation response of human hematopoietic stem/progenitor cells. *PloS One*, 8(7), e70503. doi:10.1371/journal.pone.0070503
- Yamamori, T., Yasui, H., Yamazumi, M., Wada, Y., Nakamura, Y., Nakamura, H., & Inanami, O. (2012). Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(2), 260–270. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033

Irradiação da linha celular de linfoma... | F. Mendes, C. Domingues, S. Schugk, A. Abrantes, A. Gonçalves, T. Sales, R. Teixo, R. Silva, J. Estrela, M. Laranjo, J. Casalta-Lopes, C. Rocha, P. Simões, A. Sarmiento, M. Botelho & M. Rosa