



Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Efeitos da radiação em Cancro do Pulmão

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho (Universidade de Coimbra).

Rita Catarina Ribeiro da Silva

2012

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

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

“Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing is not to stop questioning.”

Albert Einstein

Agradecimientos

As nossas realizações pessoais nunca são apenas nossas, mas também daqueles que com pequenos e grandes gestos contribuem para as concretizar e, como tal, não poderia deixar de lhes agradecer:

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, directora da Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela orientação, disponibilidade, apoio e dedicação ao longo do desenvolvimento deste projecto, pelas críticas e conselhos na sua revisão e, em especial pela partilha de conhecimento e experiência científica, pelos ensinamentos, amizade e confiança.

À Mestre Margarida Abrantes, um exemplo de trabalho e dedicação. Obrigada por todas as horas dispendidas, por todos os ensinamentos, paciência, disponibilidade e apoio que me ajudaram a ultrapassar cada etapa de forma mais confiante.

Ao Mestre Fernando Mendes agradeço o seu exemplo de trabalho, dedicação e boa disposição. O modo estimulante e dinâmico, como me orientou, apoiado sempre em críticas construtivas, em ideias pertinentes, e no incentivo constante que me foi dado. Obrigada pelos ensinamentos, disponibilidade, paciência, confiança e pela imprescindível e incansável revisão do manuscrito.

Ao Mestre João Casalta, pela sempre amável disponibilidade para me ajudar neste trabalho, pela valiosa e indispensável ajuda na análise estatística dos resultados deste projecto, pelo apoio e amizade. À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro, à Mestre Cristina Gonçalves e à Raquel pela disponibilidade demonstrada no auxílio dos estudos de citometria de fluxo. Às Mestres Salomé, Catarina, Rita, Ana Brito e Sara que contribuíram para este trabalho com entusiasmo e optimismo contagiante e pela troca de ideias, dando-me o exemplo de que é possível ultrapassar qualquer obstáculo. À Cláudia Caridade pelo sorriso sempre pronto e pela disponibilidade e apoio diários.

À Mi, à Maria, à Sissi e à Renata, por saberem usar as palavras certas nos momentos certos. Obrigada pelo apoio e confiança que sempre depositaram em mim.

À Marta, pela amizade, companhia, dedicação e apoio ao longo de todo este percurso. À Mónica, Licas, Vanessa e Patrícia pela boa disposição, amizade e companhia. À Daniela, recente companheira de gabinete, pela disponibilidade, apoio e amizade. Ao Marcos, Pedro e Miguel pelo convívio e amizade. À Vanessa Fernandes, à Vanessa Mendes e à Ana Rita, pela participação directa neste trabalho. Agradeço a companhia, ajuda e incentivo diários.

A todos os meus amigos que me incentivaram e apoiaram ao longo da realização deste trabalho.

A todos os que de algum modo contribuíram para ultrapassar esta etapa e que não foram especificamente designados, mas que nem por isso foram esquecidos.

Aos meus pais e irmã por me animarem e apoiarem incondicionalmente e, acima de tudo, por fazerem parecer o impossível, possível.

Ao Óscar Pires, pelo sorriso contagiante, pela amizade, amor e paciência, pelo incentivo e confiança constantes ao longo deste percurso.

À minha família em geral, pelo entusiasmo e força dados ao longo da realização de todo este trabalho.

Resumo

O Cancro do Pulmão (CP) é um dos cancros mais diagnosticados, apresentando maior taxa de mortalidade nos homens, sendo que nas mulheres é o quarto mais diagnosticado e o segundo com maior taxa de mortalidade. Está maioritariamente associado ao tabagismo, o qual é a causa de cerca de 80% deste tipo de cancro nos homens e 50% nas mulheres, a nível mundial. A radioterapia poderá ser utilizada em todos os estadios do CP, permitindo um melhor controlo local da doença, bem como a redução da disseminação metastática; no entanto, a radiorresistência tumoral é frequentemente um obstáculo à eficiência terapêutica.

O objectivo deste estudo consistiu na avaliação dos efeitos da radiação ionizante em três linhas celulares de CP, duas de cancro do pulmão de não pequenas células (CPNPC) (H1299 e A549) e uma de cancro do pulmão de pequenas células (CPPC) (H69), quer como terapia isolada quer como radioterapia combinada com citostáticos. Avaliaram-se os efeitos da irradiação com RX e, posteriormente, avaliou-se a citotoxicidade de três fármacos, de modo a determinar as condições necessárias para a sua combinação com a radioterapia. Para a avaliação recorreu-se à espectrofotometria, ensaios clonogénicos e citometria de fluxo, analisando a proliferação e a viabilidade celular, tipo de morte associados a cada terapia e para cada linha celular, bem como o ciclo celular, de modo a perceber qual o mecanismo de acção destas terapias. Os resultados obtidos demonstraram respostas diferentes para as três linhas celulares, sugerindo que a compreensão genética de cada linha poderá contribuir para uma melhoria nos resultados dos tratamentos de radioterapia e quimioterapia ou terapia combinada.

Palavras chave: Radioterapia, radiação ionizante, Raios-X, cancro do pulmão de pequenas células, cancro do pulmão de não pequenas células, cisplatina, etoposido, apoptose.

Abstract

Lung Cancer (LC) is one of the most diagnosed cancers, with higher mortality in men and among women is the fourth most commonly diagnosed and the second highest mortality rate. It is mainly associated with smoking, which is the cause of about 80% in men and 50% in women worldwide. Radiation therapy may be used in all stages of LC, enabling better control the disease site, as well as the reduction of metastatic spread, however, the tumor radioresistance is often a barrier to therapeutic effectiveness.

The aim of this study was to assess the effects of ionizing radiation in three LC cell lines, two of non-small cell lung cancer (NSCLC) (H1299 and A549) and one of small cell lung cancer (SCLC) (H69), either as single therapy or as combined radiotherapy with cytostatics. It was evaluated the effects of RX irradiation and, subsequently was evaluated the cytotoxicity of three drugs in order to determine the necessary conditions for their combination with radiotherapy. For the evaluation we used spectrophotometry, clonogenic assays and flow cytometry, by analyzing the proliferation and cell viability, death type associated with each therapy and for each cell line, as well as the cell cycle, in order to understand the mechanism of action of both therapies. The results showed different responses to the three cell lines, suggesting that the genetic understanding of each cell line can help to improve the results of radiotherapy and chemotherapy treatments or combined therapy.

Key words: Radiotherapy, ionizing radiation, X-rays, Small cell lung cancer, non-small cell lung cancer, cisplatin, etoposide, apoptosis.

Abreviaturas

Abs	Absorvância
AI	Apoptose Inicial
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
AT/N	Apoptose Tardia/Necrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-relate</i>
AV	Anexina-V
bad	<i>Bcl-XL/Bcl-2-associated death promoter</i>
bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bcl-xl	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BH3	<i>Bcl-2 homology3</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1 (gene)</i>
Carbo	Carboplatina
CAT	Catalase
Cdks	Ciclinas dependentes de cínases
CHART	<i>Continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy</i>
Chk	<i>Cinases Checkpoint</i>
CHUC	Centro Hospitalar Universitário de Coimbra
Cis	Cisplatina
c-H-ras	<i>v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog (HRAS)</i>
c-Myb	<i>v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog (MYB)</i>
CO₂	Dióxido de Carbono

CP	Cancro do pulmão
CPNPC	Cancro do pulmão de não pequenas células
CPPC	Cancro do pulmão de pequenas células
Cyc	Citocromo-c
DCF	2'-7'-diclorofluoresceína
DDR	<i>DNA Dose Response</i>
DEDs	<i>Death effector domains</i>
DHE	Dihidroetídio
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DSB	<i>Double-strand breaks</i>
EDTA	<i>EthyleneDiamineTetrAcetic acid</i>
Etop	Etoposido
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
Fas	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G	Unidade de força centrífuga relativa
G0	Fase quiescente do ciclo celular
G1	Gap1
G2	Gap 2
gadd45	<i>Growth Arrest and DNA Damage</i> (proteína)
GPx	Glutaciona peroxidase

GRP	<i>Gastrin releasing peptide</i>
GSH	Glutatião reduzido
Gy	Unidade de exposição Gray
H₂O₂	Peróxido hidrogénio
HO⁻	Radical hidroxilo
HO[·]	Radicais hidroxilo
HO₂[·]	Radical hidroperoxilo
H₂O	Água
IC₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
IC₇₅	<i>½ Half maximal inhibitory concentration</i>
IConf	Intervalo de confiança
KCl	Cloreto de Potássio
KeV	Quilo electrão-volt
K-RAS	<i>v-Ki-ras Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i> (oncogene)
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
LET	<i>Linear Energy Transfer</i>
M	Mitose
Mdm2	<i>Murine double minute 2</i>
MeV	Mega electrão-volt
MU	<i>Monitor Units</i>
MYC	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i> (avian)(alias: c-Myc)
MYCN	<i>v-myc myelocytomatosis viral related oncogene,</i> <i>neuroblastoma derived (avian) (alias: n-Myc)</i>
N	Necrose
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio dibásico

NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NBS1	<i>Nibrin</i> (gene)
Nbs1	<i>Nibrin</i> (proteína)
N-Ras	<i>v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog (NRAS)</i>
O₂⁻	Radical superóxido
O₂⁻	Radical anião superóxido
O₂	Oxigénio
OAR	<i>Organ At Risk</i>
p53	Proteína supressora tumoral p53
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCI	<i>Prophylactic Cranial Irradiation</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PE	<i>Plate efficiency</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i>
PLK	Cinase <i>polo-like1</i> (gene)
Plk1	Cinase <i>polo-like1</i> (proteína)
Rad9–Hus1–Rad1	<i>Checkpoint clamp complex Rad9–Hus1–Rad1</i>
Rad17	<i>Cell cycle checkpoint protein Rad17</i>
RDS	<i>radioresistant DNA synthesis</i>
RFC	<i>DNA replication factor C</i>
RI	Radiação ionizante
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RO	Alcoxilo
ROO⁻	Peroxil

ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RX	Raios-X
S	Fase de síntese do ciclo celular
SE	<i>Standard error</i>
SF	<i>Surviving factor</i>
SOD	Superóxido dismutase
SRB	Sulforodamina B
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SSB	<i>Single-strand breaks</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
T.A.	Temperatura ambiente
TC	Tomografia Computorizada
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNM	Tumor, gânglios linfáticos, Metástases
TP53	Gene supressor tumoral
TRAIL	<i>TNF related apoptosis inducing ligand</i>
V	Viáveis
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	<i>Wild Type</i>

Índice de Figuras

Figura 1 Taxa de incidência do cancro do pulmão, por sexo e área mundial.	4
Figura 2 Estrutura molecular tridimensional da cisplatina.	19
Figura 3 Estrutura molecular tridimensional da carboplatina.	22
Figura 4 Estrutura molecular do etoposido.	24
Figura 5 Necrose vs. apoptose.	29
Figura 6 Esquema representativo dos passos da autofagia.	30
Figura 7 <i>Checkpoints</i> do ciclo celular.	37
Figura 8 Esquema representativo dos quatro quadrantes (L) do hemocítmetro utilizados na determinação da viabilidade celular.	52
Figura 9 Reacção de oxidação-redução da resazurina.	54
Figura 10 Esquema representativo de um citómetro de fluxo.	57
Figura 11 Plano lateral esquerdo da caixa de irradiação (<i>External beam planning</i>), com distribuição da dose.	62
Figura 12 Plano transversal, frontal e sagital da caixa de irradiação.	62
Figura 13 Histograma de volume de dose da caixa de irradiação.	63
Figura 14 Perfil de dose.	64
Figura 15 Resultados obtidos para a linha celular A549, após irradiação RX.	75
Figura 16 Resultados obtidos para a linha celular H1299, após irradiação RX.	77
Figura 17 Resultados obtidos para a linha celular H69, após irradiação RX.	81
Figura 18 Curvas de dose-resposta ao fármaco cisplatina nas linhas celulares de CP, obtidas por Alamar Blue [®]	84
Figura 19 Curvas de dose-resposta ao fármaco carboplatina nas linhas celulares de CP, obtidas por Alamar Blue [®]	86
Figura 20 Curvas de dose-resposta ao fármaco etoposido nas linhas celulares de CP, obtidas por Alamar Blue [®]	88
Figura 21 Curva de sobrevivência celular em resposta à radiação com RX e à irradiação combinada com o fármaco cisplatina, para a linha celular A549.	91
Figura 22 Viabilidade celular obtida por citometria de fluxo, para a linha celular A549.	92
Figura 23 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo, para a linha celular A549.	92
Figura 24 Curva de sobrevivência celular em resposta à irradiação com RX e à irradiação combinada com o fármaco cisplatina, para a linha celular H1299.	94

Figura 25 Viabilidade celular obtida por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação AV/PI, para a linha celular H1299.....	95
Figura 26 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo, para a linha celular H1299.....	95
Figura 27 Curva de sobrevivência celular em resposta à irradiação com RX e à irradiação combinada com o fármaco cisplatina, para a linha celular H69.....	97
Figura 28 Viabilidade celular obtida por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação AV/PI, para a linha celular H69.....	98
Figura 29 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo, para a linha celular H69.	99
Figura 30 Curva de sobrevivência celular em resposta à irradiação com RX e à irradiação combinada com o fármaco etoposido, para a linha celular A549.	102
Figura 31 Viabilidade celular obtida por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação AV/PI, para linha celular A549	103
Figura 32 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo, para linha celular A549.	103
Figura 33 Viabilidade celular obtida por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação AV/PI, para a linha celular H1299.....	105
Figura 34 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo, para a linha celular H1299.....	106

Índice de Tabelas

Tabela I Padrões de marcação com anexina-V e iodeto de propídeo para os diferentes grupos de células	58
Tabela II Doses administradas às amostras, na caixa de irradiação.	64
Tabela III Fármacos utilizados nos estudos de citotoxicidade.	65
Tabela IV Relação das doses de radiação com a população de células em cada fase do ciclo celular para a linha celular A549.....	76
Tabela V Relação das doses de radiação com a população de células em cada fase do ciclo celular para a linha celular H1299.....	78
Tabela VI Relação das doses de radiação com a população de células em cada fase do ciclo celular, para a linha celular H69.....	82
Tabela VII Relação das concentrações de cisplatina necessárias para inibir 50% a proliferação celular (IC ₅₀).	85
Tabela VIII Relação das concentrações de carboplatina necessárias para definir o IC ₅₀	87
Tabela IX Relação das concentrações de etoposido necessárias para definir o IC ₅₀	89
Tabela X Relação das doses de radiação com a população de células em cada fase do ciclo celular na linha celular A549, para a radioterapia isolada e para a terapia combinada com cisplatina.	93
Tabela XI Relação das condições de tratamento com a população de células em cada fase do ciclo celular na linha celular H1299, para a radioterapia isolada e para a terapia combinada com cisplatina.	96
Tabela XII Relação das condições de tratamento com a população de células em cada fase do ciclo celular na linha celular H69, para a radioterapia isolada e para a terapia combinada com cisplatina.	100
Tabela XIII Relação das condições de tratamento com a população de células em cada fase do ciclo celular na linha celular A549, para a radioterapia isolada e para a terapia combinada com etoposido.....	104
Tabela XIV Relação das condições de tratamento com a população de células em cada fase do ciclo celular na linha celular H1299, para a radioterapia isolada e para a terapia combinada com etoposido.....	107

Índice

I.	Introdução.....	1
1.	Cancro do pulmão.....	3
1.1.	Incidência e mortalidade.....	3
1.2.	Factores de risco.....	5
1.3.	Cancro do pulmão de não pequenas células:.....	6
1.4.	Cancro do pulmão de pequenas células:.....	7
2.	Tratamento.....	8
2.1.	Cirurgia.....	9
2.2.	Radioterapia.....	9
2.2.1.	Radioterapia e cancro do pulmão de não pequenas células.....	15
2.2.2.	Radioterapia e cancro do pulmão de pequenas células.....	16
2.3.	Quimioterapia.....	16
2.3.1.	Cisplatina.....	19
2.3.2.	Carboplatina.....	21
2.3.3.	Etoposido.....	23
3.	Morte celular.....	26
4.	Stresse oxidativo.....	30
5.	Ciclo celular.....	34
II.	Objectivos.....	41
III.	Materiais e Métodos.....	45
1.	Cultura celular.....	47
1.1.	Preparação dos meios de cultura.....	48
1.2.	Linhas celulares.....	48
1.2.1.	Descongelação e propagação das linhas celulares.....	49
2.	Ensaio laboratoriais.....	51
2.1.	Viabilidade celular.....	51
2.2.	Ensaio Alamar Blue®.....	53
2.3.	Ensaio clonogénico.....	55
2.4.	Citometria de fluxo.....	56
2.4.1.	Avaliação da morte celular.....	58
2.4.2.	Avaliação do ciclo celular.....	60
3.	Radioterapia.....	61
4.	Quimioterapia.....	65
4.1.	Estudos de citotoxicidade.....	65
5.	Terapia combinada.....	67

5.1.	Terapia combinada de Cisplatina com radioterapia.....	67
5.2.	Terapia combinada de Etoposido com radioterapia.....	68
6.	Análise estatística	68
IV.	Resultados ¹	71
1.	Radioterapia.....	73
1.1.	Linha celular A549	73
1.2.	Linha celular H1299	76
1.3.	Linha celular H69	78
2.	Quimioterapia	83
2.1.	Avaliação da proliferação celular após administração de cisplatina	83
2.2.	Avaliação da proliferação celular após administração de carboplatina	85
2.3.	Avaliação da proliferação celular após administração de etoposido	87
3.	Terapia combinada	90
3.1.	Terapia combinada de RX com cisplatina	90
3.1.1.	Linha celular A549	90
3.1.2.	Linha celular H1299	93
3.1.3.	Linha celular H69	97
3.2.	Terapia combinada de RX com etoposido	101
3.2.1.	Linha celular A549	101
3.2.2.	Linha celular H1299	104
V.	Discussão.....	109
VI.	Conclusão e Perspectivas Futuras.....	123
VII.	Bibliografia.....	127
VIII.	Anexos.....	139
1.	Classificação TNM.....	141

I. Introdução

1. Cancro do pulmão

O cancro do pulmão (CP) é uma das neoplasias mais frequente, sendo responsável por um elevado número de mortes em todo o mundo. De acordo com a *World Health Organization* (WHO) existem dois tipos de cancro do pulmão: cancro do pulmão de pequenas células (CPPC) e cancro do pulmão de não pequenas células (CPNPC), sendo este último ainda subdividido em carcinoma das células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células (Brady, 2011; Edwards *et al.*, 2005). Os tumores do pulmão crescem e metastizam de forma diferente e, como tal, são sujeitos a diferentes abordagens terapêuticas, distinguindo-se os dois tipos pela morfologia celular e também pela expressão de diferentes proteínas, que se traduz em diferentes padrões imunohistoquímicos. Identificar correctamente o tipo de cancro é crucial na escolha do esquema terapêutico a utilizar, bem como para o prognóstico (Brady, 2011).

A extensão anatómica da doença é descrita pela classificação TNM¹ (T – tumor; N – gânglios linfáticos; M – metástases) com implicações importantes no estadiamento e consequente prognóstico do cancro do pulmão.

1.1. Incidência e mortalidade

A incidência de CP é duas a cinco vezes mais alta em países desenvolvidos do que em países em desenvolvimento, devendo-se esta diferença a variações quer nos factores de risco quer nos procedimentos de diagnóstico. Os mais recentes dados estatísticos de incidência e mortalidade relativamente ao CP demonstram que este cancro

¹ Classificação mostrada em anexo

é o mais comumente diagnosticado, bem como o que apresenta globalmente a maior taxa de mortalidade em homens, sendo que nas mulheres é o quarto mais diagnosticado e o segundo com maior taxa de mortalidade. Em 2008, o CP representou 13% (1,6 milhões) de todos os casos e 18% (1,4 milhões) do total de mortes. Apenas cerca de 13% dos doentes com CP sobrevivem mais de cinco anos o que se explica pela fase avançada da doença aquando do diagnóstico. Nos homens, as taxas de incidência mais elevadas encontram-se no Sudeste e Este Europeu, América do Norte, Micronésia e Polinésia e Este da Ásia, enquanto estas taxas são baixas em África. Já nas mulheres, as taxas de incidência mais elevadas são na América do Norte, Norte da Europa e Austrália/Nova Zelândia (Figura 1) (Jemal, Bray, & Ferlay, 2011).

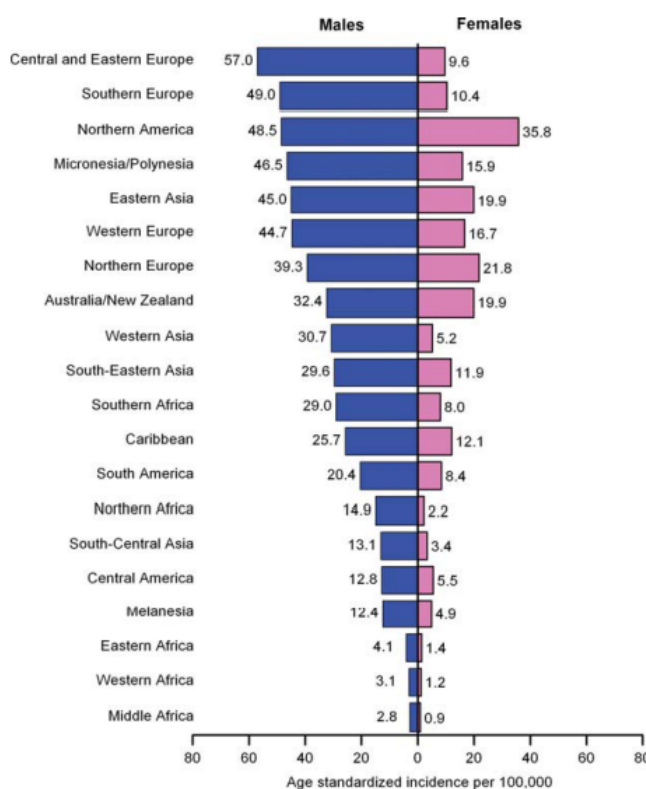


Figura 1 Taxa de incidência do cancro do pulmão, por sexo e área mundial. Retirado de (Jemal *et al.*, 2011).

Relativamente à taxa de sobrevivência a 1 ano para os doentes com CP, esta aumentou de 35% entre 1975 e 1979 para 43% entre 2003 e 2006 devido,

principalmente, ao desenvolvimento nas técnicas cirúrgicas e utilização de terapias combinadas. Por outro lado, a taxa de sobrevivência aos 5 anos é apenas de 16%, para todos os estadios combinados. Para casos diagnosticados quando a doença ainda se encontra localizada, a taxa de sobrevivência eleva-se para 53%, no entanto, importa referir que apenas 15% dos casos são diagnosticados precocemente. Para o CPPC a taxa de sobrevivência aos 5 anos é mais baixa, cerca de 6%, do que para o CPNPC, cerca de 17% (American Cancer Society, 2011; Jemal *et al.*, 2011).

1.2. Factores de risco

O aparecimento do CP está maioritariamente associado ao tabagismo, principal factor de risco sendo esta, a nível mundial, a causa de 80% dos casos de CP em homens e de pelo menos 50% em mulheres. A taxa de mortalidade devido a esta neoplasia em homens tem diminuído na maioria dos países Ocidentais, incluindo vários países europeus, América do Norte e Austrália, onde o tabagismo atingiu o seu pico em meados do século passado. Já na China e em muitos outros países da Ásia e da África, onde o tabagismo se tem estabelecido e o número de fumadores continua a aumentar ou a mostrar sinais de estabilização, as taxas de incidência têm aumentado (Jemal *et al.*, 2011).

Cerca de 20% dos casos de CP podem ser atribuídos à combinação de factores ambientais e/ou factores genéticos. O segundo maior factor de risco associado a este cancro é o radão, um gás radioactivo resultante do decaimento de Rádio-226; o decaimento deste isótopo do urânio leva à produção de elementos radioactivos emissores de partículas alfa, as quais, ao danificarem as células, aumentam a probabilidade de mutações genéticas (Turner *et al.*, 2011). Estima-se que 3 a 4% dos CPs sejam causados pela exposição a asbesto, um composto mineral constituído por

longas e finas fibras que podem ser inaladas. O asbesto é um conhecido agente carcinogénico que aumenta o risco de CP, principalmente em fumadores (Schmid, Kuwert, & Drexler, 2010). Outros factores de risco incluem a predisposição hereditária, a exposição ocupacional e ambiental a outros agentes carcinogénicos, tais como arsénio, berílio, cádmio, crómio, níquel e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Assim, observa-se uma elevada incidência desta neoplasia em trabalhadores de indústrias de refinação de metal, de processos de fundição e de gás (Jemal *et al.*, 2011; Molina, Yang, Cassivi, Schild, & Adjei, 2008).

O CP é um dos poucos tumores para o qual se identificou um factor ambiental comum desencadeante, tornando acessível a sua prevenção (Duarte & Paschoal, 2005).

Apesar de uma grande maioria dos doentes com esta patologia serem fumadores, apenas uma minoria dos grandes fumadores a desenvolve, o que sugere a influência de outros determinantes ambientais e de um terreno genético de susceptibilidade no aparecimento e na progressão da doença (Risch *et al.*, 2008).

1.3. Cancro do pulmão de não pequenas células

O CPNPC é o mais comum, contando com aproximadamente 80% de todos os cancros do pulmão (Breen, Murphy, Keenan, & Clynes, 2008; Tanaka *et al.*, 2008). Comparando com o CPPC, o CPNPC geralmente tem um comportamento menos agressivo, ou seja, cresce e metastiza mais lentamente. Incluiu três sub-tipos: o adenocarcinoma, o carcinoma de grandes células e o carcinoma de células escamosas ou epidermóide (Beau-Faller *et al.*, 2003). O carcinoma de células escamosas desenvolve-se nos brônquios. Este tipo de CPNPC progride mais lentamente do que os restantes (Ferreiro, 2007). O carcinoma de grandes células ocorre normalmente nas vias aéreas de menor raio e cresce rapidamente. A causa deste tipo de CPNPC é, na grande maioria

dos casos, o tabagismo (Ferreiro, 2007). O adenocarcinoma é o sub-tipo de CPNPC mais frequente, nomeadamente nos não fumadores. Geralmente inicia-se nas pequenas vias aéreas e nos alvéolos. Este sub-tipo de cancro parece, em muitos casos, surgir em locais de cicatriz (Ferreiro, 2007).

1.4. Cancro do pulmão de pequenas células

O CPPC sendo menos frequente, cresce mais rapidamente e é mais provável que metastize para outros órgãos. Desenvolve-se normalmente nas áreas centrais do pulmão, pode difundir-se agressivamente, ocorre quase exclusivamente em fumadores activos e passivos e tem tendência para a disseminação precoce. Sendo um tumor quimiossensível o tratamento de eleição é quase sempre a quimioterapia associada ou não com a radioterapia (Sher, Dy, & Adjei, 2008; M. L. Smith *et al.*, 2000).

Este carcinoma está normalmente associado a várias síndromes paraneoplásicas, de entre as quais a síndrome da secreção inapropriada da hormona antidiurética, degeneração cerebral paraneoplásica e a síndrome de *Lambert-Eaton*. Apesar de ser muito sensível à quimio e à radioterapia a sua remissão é difícil de atingir. Estudos recentes indicam que as mulheres, independentemente da idade, têm mais tendência a desenvolver CPPC do que os homens, sendo que as mulheres mais novas apresentam maior tendência do que as mais velhas. Também as mulheres que começam a fumar mais cedo estão mais susceptíveis ao CPPC (Sher *et al.*, 2008).

Assim como o CPNPC, o cancro de pulmão de pequenas células tem igualmente uma forte associação ao tabagismo, mas as suas características clínicas indicam que é mais agressivo que o CPNPC e o tempo médio de sobrevivência sem tratamento ronda os 2 a 4 meses (Simon & Wagner, 2003).

O estadiamento dos doentes é feito de acordo com um sistema de dois estadios: doença localizada e doença extensa. Os pacientes num estadio limitado caracterizam-se por terem a doença localizada no hemitórax ipsilateral, sem metástases e, contrariamente, os pacientes com doença extensa caracterizam-se pela presença de metástases (Ceresoli, 2012; Simon & Wagner, 2003).

2. Tratamento

As opções de tratamento são determinadas pelo tipo de tumor e pelo seu estadiamento. A cirurgia de ressecção representa a melhor hipótese de cura do CPNPC epitelial. No entanto, mais de metade dos pacientes, aquando do diagnóstico, apresenta lesões irresssecáveis devido ao estadio avançado do tumor ou à disseminação sistémica, não beneficiando deste tratamento. (Brady, 2011; Howlader N, Noone A, 2011; Le Chevalier, Arriagada, Le Péchoux, Dunant, & Pignon, 2004). A sobrevivência para a maioria dos portadores de CPNPC em estadio inicial é aumentada pela quimioterapia adjuvante (Crinò, Weder, van Meerbeeck, & Felip, 2010).

Uma vez que o CP é diagnosticado na maioria das vezes já num estadio avançado, é comum utilizar-se a radioterapia e a quimioterapia combinadas como terapias adjuvantes (Crinò *et al.*, 2010). Para o CPPC o tratamento mais comum é a quimioterapia ou a quimioterapia combinada com radioterapia (Herrmann *et al.*, 2011). Com este tratamento, uma elevada percentagem de doentes consegue a remissão da doença, embora seja bastante comum o cancro recidivar (Herrmann *et al.*, 2011).

2.1. Cirurgia

A melhor probabilidade de remissão completa para os doentes em estadios iniciais é a cirurgia, a qual deve ser considerada para todos os doentes propostos para terapia local curativa, sendo que a ressecção cirúrgica representa a melhor hipótese de cura do CPNPC epitelial (Brady, 2011). Dependendo das dimensões e da localização do tumor, há três tipos de cirurgia que podem ser realizados em doentes com cancro do pulmão: ressecção segmentar, lobectomia e pneumectomia. A ressecção segmentar (segmentectomia) é efectuada quando o cancro é diagnosticado num estadio inicial e envolve a remoção de apenas um segmento do pulmão. A lobectomia é a cirurgia mais usada para o tratamento de CP e envolve a remoção de um lobo do pulmão. A pneumectomia envolve a remoção de todo o pulmão (Brady, 2011).

2.2. Radioterapia

Ao longo do século XX a utilização da radiação em oncologia desenvolveu-se a partir de aplicações experimentais de raios-X (RX), evoluindo para um tratamento sofisticado do cancro (Bernier, Hall, & Giaccia, 2004). Inicialmente, o principal objectivo era melhorar as técnicas de irradiação; no entanto, com os contínuos desenvolvimentos, o objectivo actual prende-se em explorar a genética ou o microambiente do tumor, de forma a tratar o cancro com mais eficiência, recorrendo à radiação (Bernier *et al.*, 2004).

Os estudos iniciais em oncologia envolvendo radiação, utilizavam desde uma dose única e elevada até pequenas doses para matar as células tumorais e evitar a lesão dos tecidos normais. Actualmente as técnicas foram aperfeiçoadas permitindo uma irradiação precisa do tumor, sendo igualmente necessário aumentar o conhecimento da

biologia molecular e da genética do mesmo, contribuindo estes factores para a determinação dos alvos mais importantes que potenciarão a citotoxicidade para o tumor, preservando o tecido normal adjacente. Um passo essencial da radioterapia passa por um bom planeamento do tratamento, sendo que no início dos século XX, este planeamento era muito rudimentar. Apenas nos anos 20 surgiu um método que possibilitava que diferentes secções do corpo recebessem a mesma dose (diagramas de distribuição de isodose) (Bernier *et al.*, 2004).

A descoberta dos RX por Wilhelm Conrad Röntgen, em 1895 e a descoberta da radioactividade natural por Henry Becquerel, ainda no mesmo ano, foram dois marcos que permitiram esta nova era na ciência. Desde então, a radiação ionizante (RI) tem despertado o interesse nas mais diversas áreas, nomeadamente em terapias anti-cancro, como a radioterapia. A radioterapia iniciou-se pouco depois da descoberta dos RX, quando Emil Grubbé tratou um cancro da mama avançado com RX, em Janeiro de 1896 em Chicago (Bernier *et al.*, 2004).

Até há poucos anos, ainda não eram conhecidos os mecanismos por detrás da indução de danos físicos nas células pela radiação e quais os resultados biológicos associados. Ao longo dos anos foi sendo percebido o que acontece às células após irradiação, tendo-se caracterizado as suas consequências biológicas (Ross, 1999).

Nos dias de hoje, a radioterapia é considerada uma das formas mais eficazes de tratamento do cancro, sendo utilizada nas mais variadas situações (tipos de cancros diferentes, diferentes estadios). A radioterapia não é uma terapia selectiva, pelo que é necessária toda uma preparação de delimitação do volume a irradiar, de modo a irradiar e a depositar o máximo de energia no tumor com minimização dos efeitos nos tecidos saudáveis adjacentes.

As células oncológicas caracterizam-se por um rápido e descontrolado crescimento. A radioterapia mata principalmente estas células, afectando também as células dos tecidos saudáveis, causando efeitos secundários indesejados. Assim, é necessário haver um equilíbrio entre a destruição das células malignas e a minimização de danos nas células normais adjacentes (American Cancer Society, 2011). Há inúmeros efeitos secundários associados à radioterapia, que incluem toxicidade da pele, fadiga e dor torácica. Os efeitos secundários que determinam a dose máxima a administrar ao doente são denominados por efeitos secundários limitantes e os tecidos normais afectados são denominados por órgãos de risco (OAR, do inglês *Organ At Risk*) (Ferreiro, 2007; Formenti & Demaria, 2009). No pulmão, os efeitos secundários limitantes são a pneumonite e a esofagite, sendo a medula óssea um exemplo de OAR (Ferreiro, 2007; Formenti & Demaria, 2009).

A radioterapia poderá ser utilizada em todos os estadios de desenvolvimento do cancro do pulmão, principalmente no CPNPC. No estadio I (classificação TNM – anexo), pode ser uma alternativa à cirurgia, enquanto nos restantes estadios (II, IIIA, IIIB e IV), é utilizada em protocolos combinados com cirurgia e/ou quimioterapia. Nestes estadios mais avançados, a radioterapia tem um papel importante no controlo local da doença, para além de reduzir a disseminação metastática. Contudo, a radiorresistência tumoral, quer a intrínseca, presente antes do tratamento, quer a adquirida durante a radioterapia é, frequentemente, um obstáculo à eficácia terapêutica (Minna *et al.*, 2008). No caso de a doença estar localmente avançada ou com extensão à distância (metastática), a radioterapia é usada como um tratamento paliativo, de forma a diminuir os sintomas e melhorar a qualidade de vida do doente (Ferreiro, 2007; Gudkov & Komarova, 2010).

A radioterapia pode ser de dois tipos: a radioterapia externa ou telerradioterapia e a radioterapia interna, também conhecida como braquiterapia.

A radioterapia externa é uma técnica não invasiva que utiliza uma fonte externa, podendo ser um acelerador linear ou uma fonte radioactiva, por exemplo o cobalto-60 (emissor de radiação γ). As células normais que se encontram dentro da área de tratamento também são afectadas mas como têm maior capacidade de reparação é, assim, possível a sua mitose normal. Outra possibilidade é a utilização de RX produzidos num acelerador linear, onde um feixe de electrões é acelerado de modo a aumentar a sua energia de keV até MeV; estes electrões depois de embaterem num alvo de tungsténio originam RX (Aichinger, Dierker, Joite-Barfuß, & Säbel, 2012). A radioterapia externa é utilizada no CP, bem como noutros cancros. Como a dose de radiação administrada é elevada, é ministrada fraccionada, com doses individuais reduzidas e em intervalos de tempo alargados, geralmente 5 sessões por semana, durante várias semanas (6-7 semanas), sendo designada por radioterapia fraccionada (Stage *et al.*, 2007). O facto de as doses serem pequenas pode reduzir a morbilidade a longo termo das células normais. É um procedimento indolor; no entanto, apresenta vários efeitos secundários que limitam a sua capacidade terapêutica, nomeadamente no que diz respeito aos sistemas hematopoiético e gastrointestinal, dois dos tecidos mais radiosensíveis (Gudkov & Komarova, 2010; Saunders *et al.*, 1997).

Como já anteriormente mencionado, sabe-se que a eficácia da radioterapia é reduzida pela proliferação celular das células tumorais durante o tratamento e que a dose administrada em pequenas fracções pode reduzir a morbilidade dos tecidos normais, a longo prazo. Estes efeitos levaram à criação do regime de radioterapia hiperfraccionada, conhecida como *continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy* (CHART), criada por Saunders *et al.* (Saunders *et al.*, 1997). Neste

regime, o tratamento é efectuado em 12 dias, em vez de 6-7 semanas, de modo a minimizar a oportunidade de haver proliferação celular. Assim, são administradas 3 fracções diárias de 1,5Gy, em 12 dias consecutivos.

Comparativamente à radioterapia de dose única, na radioterapia fraccionada foram observados benefícios no que diz respeito à recorrência e à taxa de sobrevivência. No entanto, há a questão acerca do aumento de dose. Esta aumenta a probabilidade de matar células tumorais mas também provoca uma maior toxicidade no tecido normal adjacente sendo, por isso, necessário um equilíbrio entre estes dois factores de forma a atingir a taxa terapêutica óptima. A dose de radiação a administrar é muito dependente da tolerância do tecido normal, principalmente do esófago e do tecido pulmonar (Ferreiro, 2007; Saunders *et al.*, 1997).

Na braquiterapia a fonte de radiação normalmente é colocada directamente no tumor ou na sua proximidade, sob a forma de um implante, que poderá ser um fio fino, tubos plásticos, cápsulas ou “sementes”. Os procedimentos de braquiterapia podem ser feitos com implantes temporários ou permanentes, sendo que os temporários têm normalmente períodos de semi-desintegração maiores e energias mais altas. Tendo em conta as características dos dois tipos de radioterapia, a interna permite a aplicação de uma dose total de radiação mais alta num menor período de tempo do que na radioterapia externa (Banfi, 1988; Gazda & Coia, 1995; Pazdur, Coia, & Hoskins, 2009).

Na radioterapia é utilizada RI, uma radiação com energia suficientemente elevada para remover um electrão do átomo, ionizando-o. A RI pode ser electromagnética (fóton de elevada energia como os RX e os raios- γ) ou particulada, como por exemplo prótons, partículas β e partículas α .

A exposição das células a RI resulta em danos nos organelos celulares, nas membranas e biomoléculas pelas acções directas, indirectas e pela formação de radicais livres, o que pode conduzir a diferentes resultados nos vários tecidos e tipos de células (Gazda & Coia, 1995; Yin, Nelson, Coleman, Peterson, & Wyrobek, 2003). Estas alterações físicas são provocadas pela absorção de fotões e/ou partículas de energia, provocando a ejeção de electrões das suas órbitas originárias, ocorrendo ionização e/ou excitação de átomos; a absorção de energia por parte do electrão e a consequente formação de iões faz com que o átomo fique reactivo quimicamente. Estes electrões livres são, por sua vez, partículas ionizantes secundárias, isto é, vão causar danos directos a outras moléculas (ex. ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)) ou colidir com moléculas de água, originando radicais hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), activando assim uma cascata de eventos responsáveis pelos danos da radiação (Ferreiro, 2007; Katz, Ito, & Liu, 2009). Assim, a RI resulta em stresse oxidativo, por transferência directa de energia e indirectamente pela radiólise da água (Du, Gao, Kalen, Chaudhuri, & Cullen, 2010). Os efeitos letais da RI devem-se sobretudo aos danos no DNA, que se exibem como quebras de cadeia simples (SSB, do inglês *single-strand breaks*) ou como quebras de cadeia dupla (DSB, do inglês *double-strand breaks*), sendo as DSB mais letais; devem-se ainda, indirectamente, ao stresse oxidativo gerado na célula.

Segue-se depois a etapa biológica, decorrendo ao longo de dias a anos e incluindo uma enorme variedade de respostas celulares. Após a agressão, a célula poderá activar uma série de vias de sinalização, as quais podem resultar em paragem do ciclo celular, activação de vias de reparação ou indução de morte (Falck, Mailand, Syljuåsen, Bartek, & Lukas, 2001; Katz *et al.*, 2009).

Os efeitos biológicos da radiação dependem da dose, do modo de aplicação, do tipo de radiação, das características da radiação (alto ou baixo LET ou *linear energy transfer*), e da radiosensibilidade do tecido (Lewanski & Gullick, 2001).

Em resposta ao dano induzido, a célula deverá ser capaz de o reparar, continuando a sua divisão, ou morrendo. A reparação do dano é feita através da activação das vias de sinalização do complexo de resposta ao dano de DNA (DDR, do inglês *DNA Dose Response*), podendo resultar na paragem do ciclo mitótico, na activação de vias de reparação de DNA e/ou sinais de morte intra e extracelulares (Katz *et al.*, 2009).

2.2.1. Radioterapia e cancro do pulmão de não pequenas células

A maioria dos doentes com CPNPC que são tratados com radioterapia como tratamento paliativo são aqueles com doença local avançada. Nestes, a doença está limitada ao tórax mas está demasiado extensa para a sua ressecção cirúrgica e, geralmente, são tumores em estadio IIIA ou IIIB. Estes doentes recebem normalmente uma terapia combinada com radioterapia e quimioterapia com compostos de platina (Carvalho, 2002; Desai, 2007).

Noutros tipos de tumores, como o carcinoma da mama ou o carcinoma rectal, a radioterapia após quimioterapia é parte do tratamento. Já no CP, o papel deste tratamento não está tão claro. Muitas vezes não se consegue uma ressecção total do tumor, uma vez que este poderá estar localizado perto de órgãos ou estruturas importantes, como o coração ou o tronco da artéria pulmonar. Nestes casos pode ocorrer a ressecção incompleta das margens do tumor, pelo que é oferecida ao doente a possibilidade de ser sujeito a radioterapia pós-cirúrgica adjuvante. No entanto, não

existem ainda evidências dos benefícios deste tratamento (Carvalho, 2002; Desai, 2007).

2.2.2. Radioterapia e cancro do pulmão de pequenas células

O CPPC é uma doença quimiossensível; no entanto, mais de 80% dos doentes tratados com quimioterapia desenvolvem recorrências locais. Duas meta-análises desenvolvidas por Desai S. *et al* demonstram que a irradiação torácica em doentes com a doença limitada aumenta a taxa de sobrevivência e duplica o controlo local a doença. Ainda assim, os benefícios da radioterapia estão aumentados em pacientes que apresentaram uma resposta completa à quimioterapia (Desai, 2007).

Neste tipo de cancro é comum o aparecimento de metástases cerebrais, sendo a sua presença um indicador de um mau prognóstico. No momento do diagnóstico, cerca de 18% dos doentes têm metástases cerebrais e a incidência destas metástases aumenta à medida que a doença vai progredindo, atingindo cerca de 80% aos 2 anos (Slotman *et al.*, 2007). Alguns estudos demonstraram que com irradiação profiláctica craniana (PCI, do inglês *Prophylactic Cranial Irradiation*) a taxa de sobrevivência aumentava em pacientes com doença limitada ao tórax e que obtiveram uma boa resposta à quimioterapia (remissão completa). Assim, a dose recomendada para estes doentes, na PCI, está entre 25 a 30Gy dados em 10 fracções (Carvalho, 2002; Desai, 2007).

2.3. Quimioterapia

A utilização da quimioterapia como tratamento de cancro começou no início do século XX com tentativas de restringir todo o universo de produtos químicos que

pu­dessem afec­tar a doen­ça, desen­volvendo mé­todos de teste dos produtos em tumores trans­plantáveis de animais roedores. No entanto, durante uma operação militar na II Guerra Mundial um grupo de pessoas foi exposto acidentalmente a gás mostarda e verificou-se que, posteriormente, este grupo apresentava uma baixa contagem de leucócitos no sangue. Foi esta descoberta que despoletou a procura de outras substâncias que pudessem ter efeitos similares contra o cancro (DeVita & Chu, 2008),

Hoje em dia, a quimioterapia é uma das terapias mais utilizadas no tratamento de neoplasias, através da utilização de compostos químicos. A quimioterapia, assim como a radioterapia, podem afetar tanto as células tumorais como as células normais. Os fármacos utilizados na quimioterapia actuam interrompendo o ciclo mitótico, interferindo com o mecanismo celular de reparação do DNA, entre outros, impedindo assim que as células se dividam. Uma vez que as células tumorais se dividem mais rapidamente do que as células normais, as células tumorais são mais vulneráveis aos fármacos utilizados na quimioterapia (DeVita & Chu, 2008; Ferreiro, 2007).

Os vários fármacos usados na quimioterapia actuam através de diferentes mecanismos, atacando as células em diferentes estadios do ciclo celular. Podem diferenciar-se como fármacos anti-metabolitos, agentes alquilantes, antibióticos anti-tumorais, alcalóides, agentes hormonais e modificadores de resposta biológica. Os anti-metabolitos imitam nutrientes celulares; os agentes alquilantes causam danos no DNA não permitindo que haja replicação deste; os antibióticos anti-tumorais inserem-se nas cadeias de DNA e quebram a ligação da molécula ou inibem a síntese de ácido ribonucleico (RNA do inglês *ribonucleic acid*); os alcalóides previnem a formação dos fusos acromáticos necessários para a divisão celular; os agentes hormonais inibem o crescimento de alguns cancros através da sua ligação às proteínas celulares da célula tumoral, fazendo com que morra; finalmente, os modificadores de resposta biológica

interrompem processos fundamentais para o crescimento ou disseminação das células tumorais (Ferreiro C. *et al*, 2007).

A quimioterapia é considerada uma terapia com elevado grau de toxicidade e, por isso, é efectuada em ciclos com períodos de descanso entre estes, de modo a permitir que as células normais e o tecido hematopoiético recuperem, minimizando assim os efeitos secundários (Strother *et al.*, 2001).

A medula óssea, o sistema digestivo, o sistema reprodutor e os folículos pilosos são constituídos por células com elevada taxa de divisão e, por isso, são particularmente afectadas pela quimioterapia. Os efeitos secundários mais frequentes incluem a perda de cabelo, náuseas e vômitos, perda de apetite, obstipação ou diarreia e actividade da medula óssea reduzida, resultando em baixas contagens de glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e plaquetas (Roth, J.A., Hong, & Cox, 2008).

Embora a quimioterapia possa ser usada isoladamente em alguns cancros que respondam bem a este tratamento, geralmente é usada em combinação terapêutica, como no tratamento neoadjuvante, no qual a quimioterapia pode ser administrada antes da cirurgia ou da radioterapia de forma a reduzir as dimensões do tumor. A quimioterapia também pode ser utilizada como tratamento paliativo com objectivo de ajudar a aliviar os sintomas e de retardar o crescimento do tumor (Begg, Stewart, & Vens, 2011).

Devido aos seus diferentes mecanismos de acção, as platinas e os taxanos são geralmente combinados na quimioterapia. No entanto, alguns estudos *in vitro* sugerem que o tratamento alternado entre estes fármacos pode ser benéfico.

2.3.1. Cisplatina

A cisplatina, ou cis-diaminodicloroplatina (II), cuja fórmula química é $C_{12}H_6N_2Pt$ (Figura 2), foi documentada por Peyrone em 1845 e foi denominada inicialmente por *cloreto de Peyrone*. No entanto, a sua actividade anti-tumoral foi observada pela primeira vez só na década de 1960. Este composto possui uma geometria molecular quadrangular plana e a sua ligação covalente troca facilmente com outros compostos, incluindo a água. A cisplatina foi primeiramente usada para inibir a reprodução por fissão binária da bactéria *E. coli*, sendo posteriormente implementada em tratamentos de cancro, inicialmente em sarcomas artificialmente induzidos em ratos, tendo sido eficaz e, assim, introduzida em ensaios clínicos. A utilização da cisplatina progrediu rapidamente através de ensaios clínicos, tornou-se o primeiro composto de platina aprovado para terapias de cancro e tem sido amplamente utilizado em doentes com esta neoplasia desde 1978, ano em que foi aprovado pela *Food and Drug Administration (FDA)* (J. Lee *et al.*, 2004; Shimizu *et al.*, 2010).

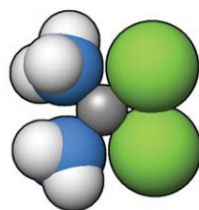


Figura 2 Estrutura molecular tridimensional da cisplatina. Retirado de Goodsell D., 2006.

As suas propriedades oncolíticas podem comparar-se às dos agentes alquilantes bifuncionais. A cisplatina liga-se à cadeia de DNA impedindo a sua replicação e a tradução do RNA e pode também provocar a morte celular por apoptose. Assim, o efeito citotóxico deste composto é causado pela inibição da transcrição e replicação,

induzindo a morte celular programada, quando a célula não é capaz de reparar os danos induzidos (Hou *et al.*, 2009).

Quando no interior da célula, a cisplatina induz uma reacção intermédia nucleofílica, perdendo os dois átomos de cloro, os quais são substituídos por moléculas de água. Estas moléculas não se ligam fortemente, pelo que se dissociam da platina com facilidade, permitindo assim que a platina se ligue a outras moléculas como o DNA (Goodsell, 2006).

Caso haja alta concentração de cloro no sangue, esta reacção de substituição não irá tão longe; caso contrário, a cisplatina torna-se tão reactiva que se liga a outras proteínas, o que não é eficaz na luta contra o cancro. A molécula de cisplatina liga num dos lados uma proteína e do outro lado uma molécula de DNA, sendo que a proteína desempenha um papel fundamental, na medida em que protege a molécula de cisplatina de ser removida por mecanismos de reparação do DNA na célula (Hou *et al.*, 2009).

Foram desenvolvidos muitos análogos da cisplatina numa tentativa de a melhorar, entre os quais a carboplatina, a qual foi introduzida na prática clínica em 1992. A cisplatina é, actualmente, utilizada combinada com outros fármacos para obtenção do efeito máximo, sendo combinada muitas vezes com etoposido.

A cisplatina interfere com o DNA, podendo ou não levar à morte celular. Quando não induz morte celular esta poderá transformar as células, conferindo-lhes potencial maligno. Assim, a cisplatina é tanto carcinogénica como mutagénica. A resistência das células a este fármaco é uma das maiores limitações nas suas aplicações clínicas. Os mecanismos envolvidos na resistência celular à cisplatina incluem a diminuição da acumulação do composto no interior das células oncológicas devido às barreiras ao longo da membrana celular, a modulação de vias apoptóticas em várias

células, a regulação elevada nos factores de transcrição, a perda de função da p53 e de outras proteínas e ainda a elevada concentração de glutatona e metalotioneínas em alguns tipos de tumores (Stordal, Pavlakis, & Davey, 2007).

Como outros fármacos antineoplásicos, a cisplatina é administrada por via intravenosa e dissolvida numa solução salina estéril, sendo dada por vezes sob a forma intra-arterial ou intraperitoneal. O tipo e a extensão do cancro determina a dose e o tempo de administração deste fármaco. A administração intraperitoneal normalmente resulta numa menor concentração plasmática do fármaco no sangue do que na administração intravenosa. Este fármaco é, maioritariamente, eliminado por via renal, sendo excretada na urina por filtração glomerular (Stordal *et al.*, 2007).

A cisplatina faz parte do tratamento de primeira linha para o CP, podendo ser usada isoladamente ou em combinação com outros fármacos, com o intuito de aumentar a sua eficácia.

2.3.2. Carboplatina

A carboplatina, de fórmula química $C_6H_{14}N_2O_4Pt$ (Figura 3), foi introduzida na clínica em 1992, sendo actualmente um dos fármacos mais comumente utilizados em regimes de quimioterapia. Tal como a cisplatina, a carboplatina também se liga à cadeia de DNA, interferindo com o mecanismo celular de reparação; no entanto, a carboplatina tem um perfil de toxicidade mais favorável, o que a torna numa escolha mais frequente na clínica. O uso concomitante de carboplatina ou cisplatina tem demonstrado uma melhoria nos resultados clínicos para o CPNPC (Kvols, 2005).

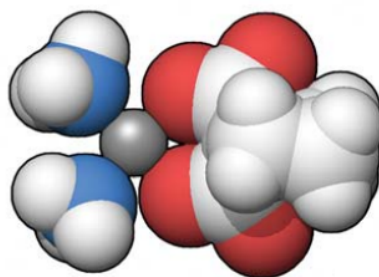


Figura 3 Estrutura molecular tridimensional da carboplatina. Retirado de Goodsell, 2006.

A carboplatina é por vezes designada por fármaco de platina de segunda geração; da primeira geração de fármacos de platina faz parte a cisplatina, a qual ganhou proeminência nos anos 70. A carboplatina foi projectada e planeada como uma melhoria da cisplatina, com o mesmo mecanismo de acção mas apresentando melhores propriedades bioquímicas, isto é, não produziria efeitos secundários tão nefastos, podendo, assim, serem administradas doses mais elevadas. (Candelaria, Garcia-arias, Cetina, & Dueñas-, 2006; Stordal *et al.*, 2007)

A carboplatina difere quimicamente da cisplatina por ser uma molécula maior, com sites de ligação no dicarboxilato, o que retarda a degradação metabólica e reduz a taxa de produção de produtos tóxicos (Goodsell, 2006). A existência do grupo carboxilato na molécula de carboplatina torna-a mais solúvel comparativamente à cisplatina e retarda a sua hidrólise o que, por sua vez, altera o seu perfil de toxicidade. Quando no interior da célula, a carboplatina sofre uma reacção química com a água intracelular, o que resulta na formação de espécies aquosas carregadas positivamente que atacam os locais nucleofílicos no DNA. É esta a acção alquilante da carboplatina que impede o crescimento do tumor pela paragem da divisão celular (Goodsell, 2006).

Como já anteriormente mencionado, a carboplatina e a cisplatina apresentam mecanismos de citotoxicidade semelhantes. O nível quantitativo da formação de aductos

de platina no DNA está correlacionado com a morte celular. A carboplatina apresenta uma maior estabilidade química e, conseqüentemente, torna-se necessária a administração de concentrações mais elevadas para se obterem efeitos anti-tumorais comparáveis aos sistemas experimentais (Candelaria *et al.*, 2006). Como a cisplatina, a carboplatina é um radiosensibilizador eficaz em variados sistemas *in vitro* e *in vivo*, tendo como alvo a população de células hipóxicas potenciando a morte celular após irradiação (Candelaria *et al.*, 2006).

A carboplatina é geralmente utilizada em regimes combinados de quimioterapia, ou seja, é administrada em combinação com outros fármacos quimioterapêuticos. Estes regimes de quimioterapia apresentam vantagens no ataque às células oncológicas por diferentes mecanismos e, assim, os fármacos podem atacar estas células em diferentes fases do ciclo celular. A carboplatina é muitas vezes combinada com o paclitaxel, a doxorrubicina, o etoposido ou outras antraciclinas (Ministério da Saúde, 2009).

2.3.3. Etoposido

O etoposido, de fórmula química $C_{29}H_{32}O_{13}$ (Figura 4), é um fármaco com elevado sucesso anticancerígeno, utilizado clinicamente há quase 20 anos, tendo sido aprovado pela FDA antes de 1984. É um derivado semi-sintético da podofilotoxina, uma substância extraída da raiz da mandrágora *Podophyllum peltatum*. Este fármaco é utilizado como tratamento de primeira linha para as leucemias, os linfomas e os tumores sólidos, entre os quais CPPC. Até ao aparecimento dos taxanos, o etoposido era o fármaco anti-cancro mais prescrito a nível mundial (Bromberg, Burgin, & Osheroff, 2003).

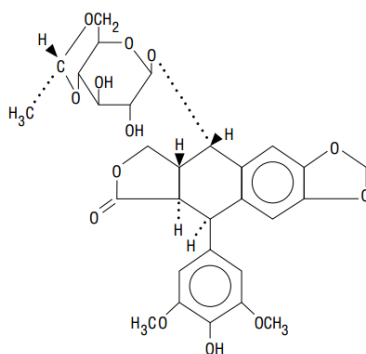


Figura 4 Estrutura molecular do etoposido. Retirado de Pharmaceuticals, 1998.

O principal alvo celular do etoposido é a topoisomerase II, uma enzima essencial que altera a topologia do DNA ao actuar na dupla hélice, provocando uma quebra dupla transiente, gerando um segmento nucleico separado. Esta enzima é necessária para o desenrolamento do DNA (Bromberg *et al.*, 2003). Na ausência desta enzima, as células são incapazes de segregar cromossomas filhos, morrendo assim de insuficiência mitótica. Uma vez que as células oncológicas se dividem com maior rapidez do que as células normais, estas são mais afectadas por este fármaco. O etoposido actua principalmente na fase G2 (Gap 2) e S (Síntese) do ciclo celular (Bromberg *et al.*, 2003).

A topoisomerase II eucariótica é hemodimérica. Cada promotor contém um local activo de tirosina que é responsável por quebrar uma cadeia da dupla hélice de DNA. De forma a manter a integridade do material genético durante a reacção de passagem da topoisomerase II pela cadeia dupla de DNA, cada local activo formado origina uma ligação fosfotirosil covalente com o novo resíduo gerado na nova terminação 5'. Este complexo covalente topoisomerase-DNA clivado é conhecido como o complexo de clivagem. Apesar da importância fisiológica da topoisomerase II, o complexo de clivagem é potencialmente tóxico. Normalmente, estes complexos estão presentes em baixos níveis sendo bem tolerados pela célula. No entanto, em condições que aumentem

a concentração celular de topoisomerase II, as quebras nos ácidos nucleicos associadas levam à recombinação de DNA e a mutagénese. Quando estas quebras sobrecarregam as células, activam as vias de morte celular (Bromberg *et al.*, 2003; Hande, 1998; Mann, 2002).

O etoposido e outros agentes anti-cancro que têm como alvo a topoisomerase II actuam de forma insidiosa, pois em vez de bloquear a actividade desta enzima, o etoposido induz a morte celular pelo aumento da concentração dos complexos de clivagem. Assim, a topoisomerase II é convertida numa potente toxina celular que fragmenta o genoma. É devido a esta acção que este fármaco é designado como um “veneno” de topoisomerase II, distinguindo-se de outros fármacos que inibem toda a actividade catalítica da enzima (Bromberg *et al.*, 2003).

Como já referido, este fármaco faz parte do tratamento de primeira linha do CPPC, em combinação com outros agentes quimioterapêuticos, e é tipicamente administrado por via intravenosa. A solução pode ser diluída com dextrose a 5% ou com uma solução de cloreto de sódio a 0,9%, de modo a obter uma concentração final entre 0,2 e 0,4 mg/mL. Este fármaco é utilizado em vários regimes de quimioterapia, em combinação com outros fármacos. No CPNPC é apenas utilizado em regime de tratamento concomitante (cisplatina e etoposido) e em regime de quimioterapia e radioterapia radical concomitante seguido de quimioterapia de consolidação (cisplatina e etoposido). Já no CPPC é o mais utilizado, sendo tratamento de primeira linha. Este fármaco é combinado com a cisplatina ou com a carboplatina, sendo o esquema terapêutico geralmente de quatro ciclos. Este fármaco é maioritariamente eliminado por excreção urinária (Ettinger *et al.*, 2012; Kalemkerian, Akerley, Bogner, & Borghaei, 2012).

3. Morte celular

A morte celular pode ser definida como uma perda irreversível da integridade da membrana plasmática. Os principais processos de morte celular podem ser classificados em apoptose, autofagia e necrose, de acordo com as suas características morfológicas e bioquímicas (Grivicich, Regner, & Rocha, 2007). Na radioterapia pretende induzir-se a morte celular das células oncológicas, podendo ocorrer por falência reprodutiva, caracterizada pela perda da capacidade de divisão celular, ou por apoptose, mecanismo em oposição à mitose (Ross, 1999).

A apoptose é o resultado da activação de um mecanismo genético de suicídio celular e que resulta na morte celular programada dependente de adenosina trifosfato (ATP), tendo um papel crucial no desenvolvimento e na homeostase celulares, bem como no cancro. A apoptose é caracterizada por alterações na morfologia nuclear, incluindo a condensação e fragmentação da cromatina, ligeiras alterações nos organelos citoplasmáticos e ainda pela desidratação celular e posterior formação de corpos apoptóticos (Grivicich *et al.*, 2007). A morte celular por apoptose ocorre em diversas situações no organismo como na organogénese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos diferenciados, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (Golstein & Kroemer, 2007; Grivicich *et al.*, 2007).

Conhecem-se duas vias apoptóticas distintas: a via extrínseca, ou morte mediada por receptores, e a via intrínseca, ou morte mediada pela mitocôndria. Ambas as vias convergem para o passo crítico de activação das caspases, proteases executoras de apoptose (Ortel *et al.*, 2009). A via extrínseca é activada após a ligação com os seus respectivos ligandos, os receptores membranares do *tumor necrosis factor* (TNF), *TNF*

related apoptosis inducing ligand (TRAIL) ou o *tumor necrosis factor receptor superfamily member 6* (Fas). Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligando específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1 (do inglês *Fas-Associated protein with Death Domain, MORT1*), as quais têm a capacidade de recrutarem a caspase-8 que activará a caspase-3, executando a morte por apoptose (Daniel, Wieder, Sturm, & Schulze-Osthoff, 2001). Na via intrínseca, a mais importante na resposta à irradiação, é a mitocôndria que possui um papel fundamental. Inicialmente ocorre uma perda do potencial da membrana mitocondrial e a libertação do citocromo-c (Cyc) para o espaço intracelular. O Cyc forma um complexo com a *apoptotic protease activating factor 1* (APAF-1) e a caspase-9, formando um apoptossoma, que promove a clivagem da pró-caspase-9, libertando a caspase-9 na forma activa. Esta cascata é controlada pela família de proteínas Bcl-2 (do inglês *B-cell lymphoma 2*), proteínas anti-apoptóticas que se encontram na membrana mitocondrial e no retículo endoplasmático. Uma vez activada, a caspase-9 activa a caspase-3 que, conseqüentemente, irá induzir morte celular (Bitomsky & Hofmann, 2009; Rupnarain, Dlamini, Naicker, & Bhoola, 2004). Assim, para além das caspases, as proteínas da família Bcl-2 são essenciais neste tipo de morte e incluem, entre outras, a bcl-2, a *B-cell lymphoma-extra large* (bcl-xl), a *Bcl-2-associated X protein* (bax), as quais têm domínio transmembranar, e a *Bcl-2-associated death promoter* (bad), que não apresenta domínio transmembranar (Verheij, 2008). As proteínas que apresentam domínio transmembranar ligam-se a membranas celulares, nomeadamente da mitocôndria, enquanto as que não possuem este domínio se localizam no citosol. Estas proteínas desempenham diferentes funções na regulação da apoptose e podem distinguir-se em três grupos: o grupo anti-apoptótico bcl-2, o grupo pró-apoptótico bax e o grupo pró-apoptótico apenas com domínios BH3 (do inglês *Bcl-2 homology3*)

(Reuter, Gupta, Chaturvedi, & Aggarwal, 2011). Para que haja a indução da apoptose deve haver uma colaboração entre os dois últimos grupos e desta colaboração parece resultar uma alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial, que é essencial para despoletar a morte celular por apoptose (Verheij, 2008).

Verheij *et al.* propôs que as proteínas anti-apoptóticas sequestram as proteínas apenas com domínios BH3, o que as impede de actuarem. Pode dizer-se que o predomínio da expressão de bloqueadores como a bcl-2 e a bcl-xl favorece a resistência à apoptose, contrariamente ao predomínio da expressão de promotores como a bax ou a bad, que facilita a progressão da apoptose (Verheij, 2008).

A resposta celular a muitos dos estímulos que conduzem à activação das vias apoptóticas está dependente da activação de vias de transdução de sinal bem como da proteína p53 (Belka *et al.*, 2001). Esta proteína pode regular a expressão das proteínas da família bcl-2, inibindo a expressão de proteínas anti-apoptóticas, como a bcl-2 e aumentando a de proteínas pro-apoptóticas, como a bax (Belka *et al.*, 2001).

Perante lesões do DNA como as induzidas pela radiação, a p53 poderá ser activada, sendo provável que a apoptose induzida pela radioterapia seja essencialmente dependente da activação da via intrínseca. De facto, foi já demonstrado que a bcl-2 é capaz de bloquear a libertação de Cyc induzida pela radiação (Belka *et al.*, 2001). No entanto, não se pode excluir a via extrínseca, uma vez que a transcrição dos genes dos receptores TRAIL também parece ser influenciada pela proteína p53 (Belka *et al.*, 2001).

No CP, a resistência à apoptose é frequente e associa-se a resistência à terapêutica citotóxica. A proteína anti-apoptótica bcl-2 encontra-se sobre-expressa em 75% a 95% dos CPPC e em 10% a 35% dos CPNPC (Sato, Shames, Gazdar, & Minna, 2007).

A necrose é um tipo de morte celular mais violenta que ocorre quando a célula é exposta a um estado de stresse extremo. Na necrose ocorre o entumescimento dos organelos e, conseqüentemente, ruptura da membrana plasmática (Figura 5). Assim, o conteúdo celular é libertado, o que danifica as células vizinhas, originando uma reação inflamatória local. Esta inflamação poderá ser um processo favorável pois pode desencadear uma resposta imune anti-tumoral (Grivicich *et al.*, 2007; Saraste & Pulkki, 2000).

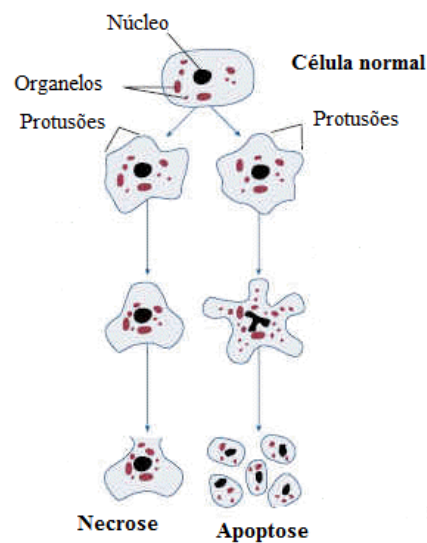


Figura 5 Necrose vs. apoptose. Alterações na morfologia celular que conduzem à sua morte. Adaptado de (Gewies, 2003).

A autofagia é um processo geneticamente controlado no qual os componentes celulares são incorporados em vesículas que se fundem com lisossomas para a degradação e reutilização dos componentes celulares sequestrados (Figura 6). Este processo de morte celular desempenha um papel fundamental na manutenção do desenvolvimento celular, no controlo de doenças e na resposta celular à privação de nutrientes (Danial & Korsmeyer, 2004; Lum, DeBerardinis, & Thompson, 2005).

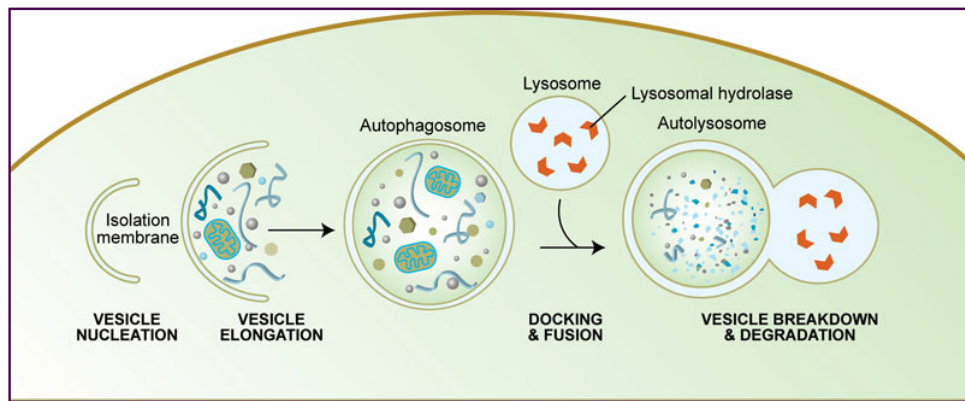


Figura 6 Esquema representativo dos passos da autofagia. Retirado de Meléndez & Levine, 2009.

De facto, a autofagia designava inicialmente a resposta celular à privação de nutrientes e outras formas de stresse celular como o metabólico ou exposição a quimio ou radioterapia (N. Chen & Karantza-Wadsworth, 2009; Ziegler & Groscurth, 2004). Embora a autofagia seja primitivamente um mecanismo de sobrevivência celular, em situações extremas este mecanismo pode levar à morte, inclusivamente por activação da apoptose, provavelmente por activação de reguladores comuns como as proteínas da família bcl-2 (N. Chen & Karantza-Wadsworth, 2009). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos não se encontram totalmente esclarecidos. Recentemente tem aumentado o interesse por este tipo de morte celular como um potencial modulador da resposta à radioterapia (N. Chen & Karantza-Wadsworth, 2009; Ziegler & Groscurth, 2004).

4. Stresse oxidativo

O stresse oxidativo é uma condição bioquímica resultante da acção perturbadora de factores exógenos ou endógenos sobre a homeostase celular e que se caracteriza pelo desequilíbrio entre elevados níveis de espécies reactivas tóxicas e os mecanismos de defesa antioxidantes (Barreiros & David, 2006). A exposição a poluentes, a radiação, o

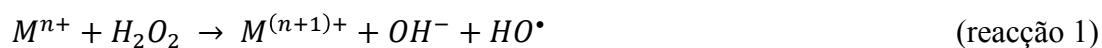
tabagismo, a dieta e o estilo de vida em geral podem contribuir para o surgimento de neoplasias. No entanto, o stresse oxidativo pode também ter origem em factores endógenos tais como a acção dos macrófagos e neutrófilos durante a inflamação, a acção das oxidases, o metabolismo celular normal do citocromo P450 e a degradação dos ácidos gordos pelos peroxissomas. Apesar da contribuição de todos estes factores, o principal processo fisiológico que está na origem do stresse oxidativo é a cadeia respiratória mitocondrial (Vieira A., 2006; Wang J., 2008).

A RI é um dos principais agentes exógenos de stresse oxidativo, produzindo danos biológicos directa (30 a 40% das lesões celulares) ou indirectamente pela criação de radicais livres através da radiólise da água (60 a 70% das lesões celulares), os quais vão originar espécies reactivas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*). A nível celular, a auto-oxidação, a peroxidação lipídica, o envelhecimento, a carcinogénese e outros processos patológicos são as principais consequências do stresse oxidativo, sendo que os principais alvos são a membrana celular, o citoplasma e os seus constituintes e, maioritariamente, o DNA (mutagénese) (Barreiros & David, 2006). A exposição a radiação pode levar a que as ROS actuem sobre as pirimidinas, purinas e proteínas da cromatina, resultando em modificações de bases, formação de aductos de DNA e mutação genética, podendo ser cancerígena. Os radicais hidroxilo, por exemplo, são os mais deletérios ao organismo e reagem com a guanosina para formar 8-hydroxy-2'-desoxiadenosina levando à formação de mutações nos pares de bases Guanina:Citosina para Timina:Adenina (J. Wang & Yi, 2008). Estas alterações revelam fortes evidências de que o stresse oxidativo está intimamente associada com a carcinogénese (Wang J., 2008; Halliwell B., 2007).

O oxigénio é fundamental na respiração celular e está envolvido em diversos sistemas enzimáticos que o usam como aceitador de electrões, para dar origem às ROS,

espécies parcialmente reduzidas. As ROS, quando em baixas ou moderadas concentrações, actuam como segundo mensageiro na sinalização celular e são essenciais para inúmeros processos biológicos nas células normais, tais como a adesão celular, a morte celular e a resposta imune (J. Wang & Yi, 2008). Encontram-se ainda envolvidas na produção de energia, na regulação do crescimento celular, na fagocitose, na síntese de substâncias biológicas importantes e na sinalização intercelular (Ushio-fukai & Nakamura, 2008). São geradas a partir de fontes exógenas (por exemplo pela RI) ou endógenas (por exemplo nas mitocôndrias). Das ROS fazem parte o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), e os radicais hidroxil (HO^{\bullet}), peroxil (ROO^{\bullet}) e alcoxil (RO^{\bullet}), os quais podem estar envolvidos na iniciação e propagação de reacções de radicais livres e que são prejudiciais para as células, tecidos e organismos. O HO^{\bullet} é uma das espécies radicalares mais importantes induzida por radiação (Ushio-fukai & Nakamura, 2008; Vieira, 2006; J. Wang & Yi, 2008).

O radical anião superóxido forma-se pela acção das enzimas xantina oxidase e aldeído oxidase ($O_2 \xrightarrow{\text{Xantina Oxidase; Aldeído oxidase}} O_2^{\bullet -} + HO_2^{\bullet}$) ou durante a auto-oxidação de catecolaminas, no citoplasma; por acção da enzima fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxidase, na membrana citoplasmática e por redução monoelectrónica do dioxigénio pela ubiquinona, na cadeia respiratória mitocondrial. Já a formação do HO^{\bullet} deve-se principalmente à redução do peróxido de hidrogénio por um metal de transição descompartimentalizado, pela reacção de Fenton (reacção 1) (Vieira, 2006).



O HO[•], resultante da reacção de Fenton, possui uma elevada reactividade e uma semi-vida de aproximadamente 1 nanosegundo, o que limita os alvos deste radical a macromoléculas na vizinhança imediata do seu local de formação. O radical anião superóxido (O₂^{•-}) pode desempenhar o papel de metal redutor pela reacção de Haber-Weiss (reacção 2), dando origem ao HO[•] (Vieira, 2006).



Estas vias de formação deste radical não são as mais comuns. A principal via de formação do HO[•] é a radiólise da água, resultante da acção da RI sobre as moléculas de água (J. Wang & Yi, 2008).

As ROS, quando em elevadas concentrações, podem tornar-se prejudiciais para o organismo pela indução da oxidação de vários componentes celulares, como proteínas celulares, lípidos, especialmente os membranares, e DNA, originando senescência, lesões degenerativas ou fatais nas células, as quais estão por norma relacionadas com várias doenças, como o cancro, as doenças cardiovasculares e as doenças neurodegenerativas (Vieira, 2006).

Um dos sistemas que se desenvolveu para combater o excesso de radicais livres, ou seja, para combater os níveis de oxidantes e os respectivos danos, baseia-se no poder antioxidante de várias enzimas. Os antioxidantes produzidos agem enzimaticamente, como a glutathiona peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) ou, não-enzimaticamente como por exemplo o glutatião reduzido (GSH), os peptídeos de histidina, as proteínas que ligam o ferro (em especial a transferrina e a ferritina) e o ácido dihidrolipóico (Barreiros & David, 2006). Além dos antioxidantes produzidos, também os provenientes da dieta são usados, tal como o *α*-tocoferol (vitamina-E), o *β*-

caroteno (pró-vitamina-A), o ácido ascórbico (vitamina-C), e alguns compostos fenólicos (Barreiros & David, 2006). Por serem antioxidantes, estas compostos retardam ou evitam a oxidação de várias moléculas biológicas, prevenindo assim os danos induzidos pelo aumento do stresse oxidativo, existindo assim uma relação entre a sua actividade antioxidante e a capacidade de inibir ou retardar o aparecimento de células oncológicas (Barreiros & David, 2006; Valko *et al.*, 2007; J. Wang & Yi, 2008). As ROS são oxidantes naturais e, por isso, influenciam o estado redox da célula. Ironicamente, a produção de ROS é um mecanismo partilhado em todas as abordagens terapêuticas não-cirúrgicas para o cancro, entre as quais a radioterapia, a quimioterapia e a terapia fotodinâmica, devido às suas consequências em termos de indução de morte celular (J. Wang & Yi, 2008). Assim, as ROS são vistas como podendo ter dois efeitos contrários na determinação do destino das células e, conseqüentemente, têm sido propostas terapias pró-oxidantes e anti-oxidantes para tratamentos de cancro (J. Wang & Yi, 2008).

5. Ciclo celular

A divisão celular consiste em dois processos consecutivos, caracterizados maioritariamente pela replicação do DNA e pela segregação dos cromossomas replicados em duas células separadas. Originalmente, a divisão celular estava dividida em dois estadios, a mitose (M) e a interfase, a qual inclui as fases G1 (Gap 1), S e G2. A replicação do DNA ocorre na fase S, denominada por este motivo de fase de síntese. Esta fase é precedida pela fase G1, durante a qual a célula é preparada para a síntese de DNA, e é seguida pela fase G2, durante a qual a célula se prepara para a M. Quando na fase G1 as células, antes de iniciarem a replicação do DNA, entram num estado de repouso ou quiescência, denomina-se por fase G0 (fase quiescente) (Murray, 2004).

A transição de uma fase para outra do ciclo celular ocorre ordenadamente e é regulada por diferentes proteínas celulares. Proteínas reguladoras chave são as cinases ciclina-dependentes (cdk), que são activadas em pontos específicos do ciclo celular (Shackelford, Kaufmann, & Paules, 1999; Vermeulen, Van Bockstaele, & Berneman, 2003).

Assim, para assegurar a sobrevivência e a propagação de cópias fieis do genoma nas gerações seguintes, a célula responde aos danos ou a anormalidades na estrutura do DNA através de uma resposta multifacetada (Jiri Bartek & Lukas, 2001). Esta resposta coordena a progressão do ciclo celular com a reparação do DNA, a remodelação da cromatina, a transcrição e outros ajustes metabólicos, ou mesmo a morte celular (Jiri Bartek & Lukas, 2001). A paragem ou o atraso da progressão do ciclo celular fornece tempo para a reparação do DNA ou, quando o dano é irreparável, pode inibir permanentemente a proliferação celular através da senescência (Jiri Lukas, Lukas, & Bartek, 2004). Esta paragem ou atraso é mediada por uma rede complexa de vias de sinalização, as quais são denominadas por *checkpoints* do ciclo celular (Jiri Bartek & Lukas, 2001; Jiri Lukas *et al.*, 2004). Estes *checkpoints* constituem mecanismos de regulação que não permitem que uma nova fase do ciclo celular progrida antes da anterior terminar (Jiri Lukas *et al.*, 2004).

Considerando as diferentes posições e funções nas cascatas dos *checkpoints*, os componentes do ciclo celular têm sido subdivididos em cinco categorias: os sensores de danos no DNA (que incluem os complexos Rad9–Hus1–Rad1, PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*)-like e Rad17–RFC (*DNA replication factor C*)), os transdutores de sinal (que incluem a *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) e a *ataxia telangiectasia and Rad3-related* (ATR)), as cinases efectoras (Cinase *Checkpoint* (Chk)1 e Chk2), os mediadores (BRCA1(*Breast Cancer 1*), MDC1/NFBD1, 53BP1 e claspina) e, por fim,

as proteínas efectoras (que incluem as fosfatases Cdc25 reguladoras do ciclo celular, proteínas de reparação de DNA, factores de transcrição, entre outras) (Jiri Lukas *et al.*, 2004; Zhou & Elledge, 2000). As proteínas sensoras monitorizam o genoma para qualquer anormalidade, ajudando a gerar sinais que são amplificados e propagados por mediadores e transdutores de sinal até aos efectores dos *checkpoints*, os quais fazem a ligação entre estes *checkpoints* e toda “maquinaria” central to ciclo celular (Jiri Lukas *et al.*, 2004).

São conhecidos três *checkpoints* do ciclo celular: o *checkpoit* G1, o *checkpoint* S e ainda o *checkpoint* G2/M. A resposta da célula aos danos no DNA envolve o atraso temporário do ciclo celular nas transições G1-S ou G2-M, de modo a activar a cascata de resposta aos danos. Esta activação pode conduzir à sobrevivência celular, se o DNA for correctamente reparado ou, caso não seja reparado correctamente, conduzir à morte celular apoptótica ou mitótica (Nome *et al.*, 2005).

Assim, para prevenir a entrada na fase S de células com danos no DNA, estas activam as cinases de transdução ATM/ATR que, por sua vez, têm como alvo dois efectores críticos que operam em ramos distintos do *checkpoint* G1, a fosfatase Cdc25A e o factor de transcrição p53 (Figura 7). Assim, a paragem nesta fase pode ser dependente ou independente da proteína p53 (Jiri Lukas *et al.*, 2004).

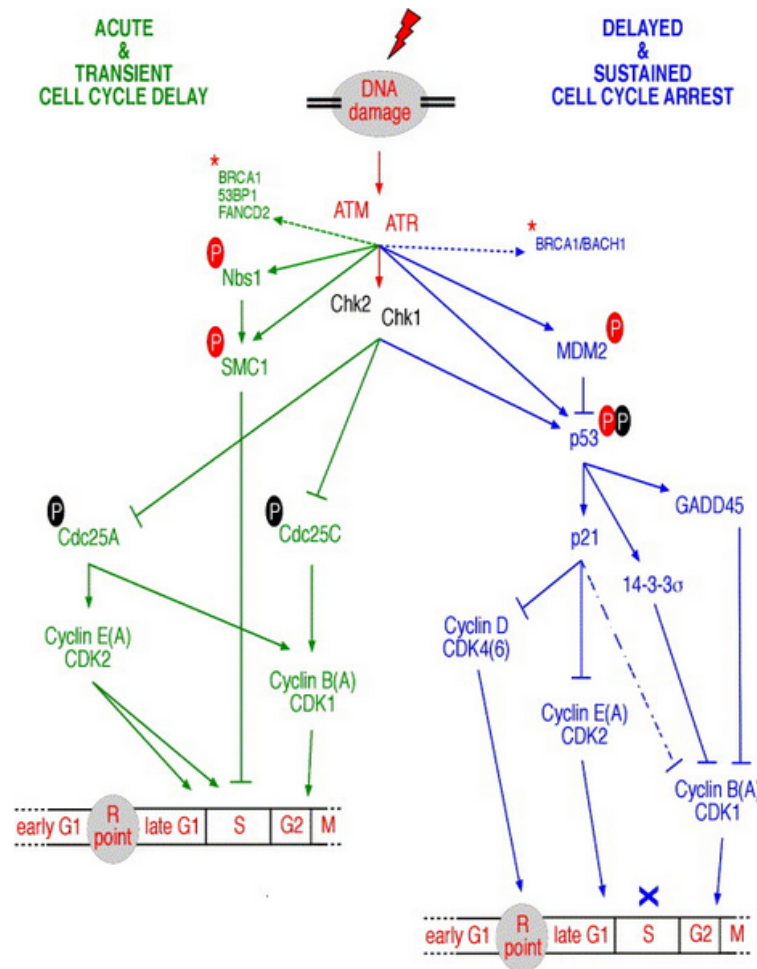


Figura 7 Checkpoints do ciclo celular . Representação esquemática das vias moleculares envolvidas na transmissão de sinais dos locais danificados do DNA, para atrasar (verde) ou parar (azul) a progressão do ciclo celular. Retirado de Jiri Lukas *et al.*, 2004.

A via que tem como alvo a Cdc25A é implementada rapidamente, opera independentemente do estado da p53 e é relativamente transiente, sendo capaz de atrasar a progressão do ciclo celular durante várias horas (Jiri Lukas *et al.*, 2004; Molinari, Mercurio, Dominguez, Goubin, & Draetta, 2000). Por outro lado, o mecanismo complementar responsável pela manutenção do atraso prolongado na fase G1 do ciclo celular em resposta aos danos induzidos no DNA reflecte a outra via no *checkpoint* G1, via esta dependente da proteína p53 (Jiri Bartek & Lukas, 2001; Wahl & Carr, 2001). Independentemente do estado desta proteína, a abundância e a actividade da Cdc25A rapidamente diminui quando a célula é exposta a RI, reflectindo a

ubiquitinação induzida pelos danos no DNA, bem como um *turnover* da proteína Cdc25A pelos proteossomas (Jiri Bartek & Lukas, 2001). Esta via resulta numa fosforilação inibitória persistente da CDK2 e, assim, uma inibição da actividade da ciclina E/CDK2, conduzindo a um bloqueio da transição G1/S (Jiri Bartek & Lukas, 2001).

Outro *checkpoint* induzido pela RI é o *checkpoint* S, que representa principalmente uma inibição da iniciação da replicação após danos no DNA (C.-X. Deng, 2006). Uma falha na activação deste *checkpoint* quando induzido pela RI resulta na síntese persistente de DNA (síntese de DNA radorresistente (RDS, do inglês *radioresistant DNA synthesis*)) em momentos iniciais após exposição a RI (C.-X. Deng, 2006).

Neste *checkpoint* do ciclo celular parecem existir também duas vias paralelas que atrasam a síntese de DNA, sendo ambas controladas pela maquinaria de sinalização da ATM/ATR. Um dos mecanismos efectores envolve a cascata de degradação da Cdc25A. A inibição da actividade da Cdk2 bloqueia o carregamento de Cdc45 para a cromatina. A Cdc45 é uma proteína necessária para o recrutamento da polimerase α do DNA para os complexos de pré-replicação, de modo a que a inibição da actividade da Cdk2 previna a iniciação de uma nova replicação (Jiri Lukas *et al.*, 2004). A outra via no *checkpoint* da fase S reflecte o impacto das fosforilações da Nbs1 (uma proteína de regulação do ciclo celular e de reparação do DNA) e da proteína de coesão Smc1 mediadas por ATM (Kastan & Bartek, 2004). Contrariamente ao *checkpoint* G1, a resposta aos danos induzidos no DNA na fase S não possui a manutenção sustentada da paragem do ciclo celular sendo igualmente independente da proteína p53 (Jiri Lukas *et al.*, 2004).

Por último, o *checkpoint* G2/M impede que as células iniciem a mitose quando são induzidos danos no DNA na fase G2, ou ainda quando progridem para esta fase com alguns danos por reparar, infligidos nas fases G1 e S (Kastan & Bartek, 2004; Jiri Lukas *et al.*, 2004). A acumulação de células na fase G2 poderá também reflectir a contribuição do *checkpoint* S/M, o qual pode detectar algumas lesões no DNA persistentes da fase anterior como sendo inapropriados ou ainda DNA não totalmente replicado (Kastan & Bartek, 2004). Tal como o *checkpoint* G1, o atraso ou paragem na fase G2 do ciclo celular resulta de uma combinação de mecanismos que operam via modificações pós-translacionais de diversas proteínas efectoras, bem como de mecanismos mais longos e sustentados que envolvem também a alteração dos programas de transcrição (Jiri Lukas *et al.*, 2004). Este atraso ou paragem pode ser induzido dependente ou independentemente da proteína p53 (Vermeulen *et al.*, 2003).

O alvo crítico deste *checkpoint* é a actividade promotora mitótica da ciclina B/CDK1 cinase, cuja activação após danos no DNA é impedida através da sequestração subcelular mediada pelas ATM/ATR e Chk1/Chk2 e/ou pela inibição da fosfatase Cdc25C, a qual normalmente activa a Cdk1 na passagem da fase G2 para a fase M (G2/M) do ciclo celular (Kastan & Bartek, 2004; Jiri Lukas *et al.*, 2004; Nome *et al.*, 2005). Um dos mecanismos que contribui para a inactivação a longo prazo da ciclina B/Cdk1 é através da via da p53 (Figura 7). No entanto, em adição com o inibidor p53-Cdk-p21 que é crítico para o *checkpoint* G1, o atraso na fase G2 parece exigir ainda alvos transcripcionais da p53, os quais incluem as proteínas Gadd45 (*Growth Arrest and DNA Damage*) e 14-3-3 σ (Taylor & Stark, 2001). Por outro lado, muitas células que não expressam p53 têm tendência a acumular na fase G2 após danos no DNA, o que indica que mecanismos adicionais, tais como a expressão estimulada de p21 e Gadd45 pela BRCA1, podem cooperar com a cascata da p53 regulando o atraso nesta fase. De

facto, interferências com o *checkpoint* G2 poderão sensibilizar as células com deficiências no atraso G1/S para danos no DNA induzidos por radiação ou fármacos (Jiri Lukas *et al.*, 2004).

II. Objetivos

As opções de tratamento do CP são normalmente determinadas pelo tipo de tumor e seu estadiamento, sendo os tratamentos mais comuns a radioterapia e a quimioterapia, bem como a sua combinação (quimiorradioterapia).

Com este trabalho pretendeu-se avaliar o efeito da radiação ionizante em três linhas de CP, diferindo entre si quanto à sua origem. Também se avaliaram os efeitos de citostáticos usados em algumas abordagens terapêuticas, quer individualmente, quer cumulativamente ou ainda como radiosensibilizadores.

Para tal, avaliaram-se os efeitos de diferentes doses de radiação na viabilidade e proliferação celular. Posteriormente à avaliação da inibição da proliferação celular, analisou-se e caracterizou-se a morte celular induzida pelas diferentes terapias abordadas. Para melhor compreender os efeitos induzidos nas diferentes linhas celulares utilizadas, avaliou-se ainda o ciclo celular.

Realizaram-se os ensaios anteriormente mencionados em combinação da radiação ionizante com diferentes fármacos.

III. Materiais e Métodos

A incidência do cancro a nível mundial tem vindo a aumentar exponencialmente, conduzindo à necessidade de desenvolver novas técnicas e terapias contra esta patologia, bem como a sua optimização, reduzindo os efeitos secundários a si associados.

Uma das terapias mais comumente utilizadas no tratamento do cancro é a radioterapia, assim como a sua associação com a quimioterapia.

Para a realização deste trabalho tivemos a inestimável colaboração do Serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC) na irradiação com Raios-X das diferentes linhas celulares.

1. Cultura celular

A realização de culturas celulares baseia-se na criação de um sistema *in vitro* para a manutenção de células e tecidos viáveis, num meio favorável, que assegure substâncias indispensáveis à sua sobrevivência, crescimento e multiplicação. Assim, são necessárias concentrações adequadas de sais inorgânicos, iões, vitaminas, aminoácidos e hormonas/factores de crescimento, assim como garantir condições ambientais propícias, tais como o pH (pH 6,8-7,4), temperatura (37°C), concentração de CO₂, O₂ (5% de CO₂ em 95% de ar) e assépsia.

A cultura de células é comumente utilizada como modelo experimental. No entanto, apresenta algumas desvantagens, entre as quais se destaca o facto de, após um período de crescimento contínuo, as características das células se poderem alterar, quer genotipicamente quer fenotipicamente.

Para a realização dos estudos *in vitro* foram utilizadas três linhas celulares de CP (H1299, A549 e H69), as quais foram adquiridas à *American Type Culture Collection* (ATCC) e mantidas de acordo com as recomendações do fornecedor, utilizando *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma Aldrich® D-5648, St. Louis, EUA) para as H1299 e *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI-1640, Sigma Aldrich® R-4130, St. Louis, EUA) para as restantes linhas.

1.1. Preparação dos meios de cultura

A preparação dos meios de cultura realizou-se segundo as instruções dos fabricantes. Assim, para o meio DMEM foi adicionado 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*: Sigma F-7524, St. Louis, EUA), 100mM de piruvato de sódio (GIBCO 11360, Paisley, RU) e 1% de antibiótico (GIBCO 15240, Paisley, RU). Ao meio de cultura RPMI foi adicionado 10% (v/v) de FBS, 400mM de piruvato de sódio e 1% de antibiótico (100U/mL de penicilina e 10µg/mL estreptomicina; GIBCO 15140-122). Os meios foram filtrados e guardados a 4°C para a sua posterior utilização nas respectivas linhas celulares. Para evitar possível contaminação das linhas celulares, todos os meios foram previamente testados.

1.2. Linhas celulares

A linha celular NCI-H1299 (CRL-5803TM), comumente designada por H1299, é uma linha de células epiteliais, especificamente de CPNPC, isoladas de um gânglio linfático de um doente do sexo masculino de 43 anos de idade, caucasiano, adquirida na ATCC. As células desta linha têm uma deleção homozigótica parcial do gene *TP53* (*gene supressor tumoral*) não expressando a proteína p53. São capazes de sintetizar o

peptídeo neuromedina B (do inglês *peptide neuromedin B*) a 0,1 pmol/mg de proteína, mas não o peptídeo libertador de gastrina (*GRP* do inglês *gastrin releasing peptide*) (ATCC).

A linha celular NCI-H69 (HTB-119TM), comumente designada por H69, é uma linha de CPPC, de um doente do sexo masculino de 55 anos de idade, caucasiano, adquirida na ATCC. Nas células desta linha celular o gene *MYCN* (*v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived*) encontra-se amplificado existindo expressão quer do RNAm quer da proteína. Apesar do *MYC* (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*) estar amplificado, este é fracamente expresso, sendo a proteína expressa normalmente. Ocorre igualmente expressão de RNAm de c-Myb (*v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog*), v-Fes, v-Fms, c-Raf 1, c-H-ras (*v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*) e N-Ras (*v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*). Esta linha celular apresenta uma mutação na p53 no codão TAG (ATCC).

A linha celular A549 (CCL-185TM) é uma linha celular de CPNPC tipo II, de células epiteliais alveolares basais. São células escamosas e responsáveis pela difusão de substâncias, tais como água e electrólitos, através dos alvéolos pulmonares. As células desta linha celular é positiva para citoqueratina, demonstrado pela coloração com a imunoperoxidase. Está igualmente demonstrado que esta linha sintetiza lecitina com uma percentagem elevada de ácidos gordos, através da via da difosfocolina citidina. As células desta linha celular expressam normalmente a proteína p53 (ATCC).

1.2.1. Descongelação e propagação das linhas celulares

As células das linhas celulares H1299 e A549 crescem em monocamada aderente. Para se iniciar a cultura celular, retirou-se o *vial* da arca a -80°C ou do azoto

líquido sendo descongelado parcialmente (até que o bloco se liberte das paredes do *vial*) em banho-maria a 37°C. Na câmara de fluxo laminar vertical (Steril-Polaris, Itália) transferiu-se a suspensão celular para um frasco contendo previamente o meio adequado, para cada linha celular, a 37°C, sendo o meio substituído 24 horas após o descongelamento. Sempre que as culturas atingiram cerca de 75% de confluência estabeleceram-se novas culturas, processo designado por “passagem”, que visa a manutenção celular. Para tal, aspirou-se o meio consumido do frasco de cultura contendo as células e lavou-se o mesmo com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Saline*: 137mM de NaCl, 2,7mM de KCl, 10mM de Na₂HPO₄ e 1,8mM de KH₂PO₄ [pH=7,4]). O PBS é posteriormente aspirado adicionando-se de seguida uma solução de tripsina-EDTA (EDTA do inglês *EthyleneDiamineTetrAcetic acid*) a 0,25% (Gibco[®] 25200, *Invitrogen*, Portugal), sendo o volume ajustado à área do frasco de cultura; colocou-se o frasco de cultura a incubar durante alguns minutos a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, para que ocorra o destacamento celular.

Após alguns minutos de incubação observou-se ao microscópio o destacamento celular e, caso as células já estivessem destacadas, adicionou-se novo meio de cultura (o dobro do volume de tripsina-EDTA) inativando desta forma a tripsina-EDTA; de seguida as células foram ressuspensas e centrifugadas a 100G durante 5 minutos com recurso a uma centrífuga (Heraeus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18,7cm), para remover as células mortas, descartando o meio e ressuspensando o *pellet* num volume conhecido de meio de cultura.

Para manter a cultura celular a suspensão é distribuída por novos frascos de cultura e para se obter uma densidade adequada, adiciona-se meio até perfazer o volume

correcto para cada tipo de frasco, sendo de seguida incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ até à próxima passagem.

As células da linha celular H69 crescem em suspensão no meio de cultura RPMI. O método de iniciação da cultura celular é semelhante ao utilizado nas células aderentes. Para a propagação destas células, quando as culturas atingem uma confluência adequada estabelece-se uma nova cultura. Para tal, ressuspendeu-se a suspensão celular passando-a para um tubo *falcon* e centrifugou-se a 100G durante 5 minutos. Após a centrifugação, aspirou-se o meio consumido e ressuspendeu-se num volume conhecido de novo meio de cultura. Esta suspensão foi distribuída por novos frascos de cultura, de modo a obter uma densidade adequada ($0,5 \times 10^6$ células/mL), adicionando-se meio de cultura até perfazer o volume correcto para cada tipo de frasco e incubando-se de seguida a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ até à próxima passagem.

2. Ensaios laboratoriais

Para a realização dos estudos propostos foram utilizadas metodologias adequadas à utilização de culturas celulares, de modo a determinar a viabilidade e a proliferação celulares, bem como a morte associada à irradiação e à utilização de fármacos.

2.1. Viabilidade celular

A viabilidade celular determinou-se com recurso ao método de exclusão do azul tripano (GIBCO®, Paisley, RU) (Weisenthal, Marsden, Dill, & Cindy, 1983) sendo este sempre realizado previamente à realização de qualquer experiência. Este método baseia-se na entrada do azul tripano nas células não viáveis, ou seja, nas células que

apresentam a membrana celular destruída, corando-as de azul. As células viáveis, uma vez que possuem a membrana celular íntegra, não permitem a entrada de azul tripano, mantendo-se assim brancas ou brilhantes. Realizou-se a contagem das células utilizando um hemocitômetro (BOECO and Co. Hamburgo, Alemanha) e um microscópio óptico invertido Motic AE31 com ampliação 100x (Motic[®]. Wetzlar, Alemanha).

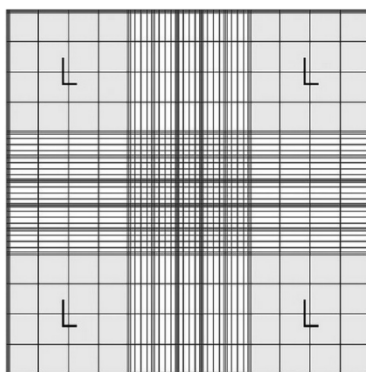


Figura 8 Esquema representativo dos quatro quadrantes (L) do hemocitômetro utilizados na determinação da viabilidade celular

Homogeneizaram-se volumes iguais de suspensão celular e de solução de azul tripano a 0,02% em PBS (ordem de 1×10^{-6} L), transferindo-se de seguida para o hemocitômetro. Ao microscópio contaram-se as células nos quatro quadrantes representados na figura 8 como L, tanto as células coradas de azul como as células brilhantes. A percentagem de células viáveis foi determinada de acordo com a equação 1.

$$\%viabilidade\ celular = \frac{células\ vivas}{células\ vivas+células\ mortas} \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

Em todas as experiências realizadas utilizaram-se sempre suspensões celulares com viabilidade superior a 90%.

A determinação da concentração celular da suspensão fez-se contando as células vivas nos quatro quadrantes L, calculando a sua média, multiplicando pelo factor de

diluição com o azul tripano e por 10^4 , de forma a obter o resultado da concentração celular expresso em cél./mL.

2.2. Ensaio Alamar Blue[®]

A viabilidade celular pode ser monitorizada por diferentes métodos. A integridade da membrana plasmática, a síntese de DNA, o conteúdo de DNA, a actividade enzimática, a presença de ATP e as condições redutoras das células são conhecidos indicadores de viabilidade e morte celular.

A avaliação dos efeitos dos citostáticos, bem como dos efeitos da radiação na proliferação das linhas celulares H1299, A549 e H69, fez-se com recurso ao teste colorimétrico denominado por Alamar Blue[®], um teste simples, não tóxico que utiliza a resazurina, um corante solúvel em meio e em PBS.

Este ensaio baseia-se na incorporação de resazurina pelas células, um corante azul (forma oxidada), o qual actua nas células como um aceitador intermediário de electrões da cadeia respiratória mitocondrial ao nível do complexo IV (Perrot, 2003). Como resultado da reacção de oxidação-redução, na presença de enzimas mitocondriais, a resazurina vai dar origem a resorufina (Figura 9), um complexo de cor rosa fluorescente, que representa a forma reduzida do composto (Zhang *et al.*, 2004). A alteração de cor e a fluorescência representa um indicador sensível de viabilidade e proliferação celulares, uma vez que resulta do metabolismo celular. A alteração da cor pode ser posteriormente quantificada por espectrofotometria (absorvância (Abs)); neste estudo analisou-se a absorvância nos comprimentos de onda de 570nm, que corresponde à forma oxidada (azul), e 600nm, que corresponde à forma reduzida (rosa), sendo que a

2.3. Ensaio clonogénico

Tanto os ensaios de citotoxicidade como os de viabilidade efectuam-se para avaliar os efeitos letais da quimioterapia ou de radioterapia. O ensaio clonogénico é um teste de viabilidade, determinando-se a viabilidade celular através da capacidade das células formarem colónias. Assim, este ensaio permite-nos avaliar o resultado final da agressão celular induzida, uma vez que as células que se mantêm viáveis após irradiação formam colónias, sendo quantificadas, o que permite apreciar a sobrevivência celular. O ensaio clonogénico é considerado o “*gold standard*” dos testes de sensibilidade a citostáticos e um dos mais usados para avaliar o efeito da radiação (Pantelleva *et al.*, 2003).

Realizaram-se ensaios clonogénicos para determinar a sobrevivência celular após irradiação com RX. Posteriormente à irradiação foi necessário contar as células num hemocitómetro, recorrendo ao microscópio óptico invertido. Para a irradiação com RX, todas as linhas celulares de cancro do pulmão foram irradiadas em tubos *falcon*, pelo que, após irradiação, é necessário apenas proceder à contagem das células. Assim, de cada *falcon* retiraram-se 20µL de suspensão celular e homogeneizou-se com 20µL de azul tripano, procedendo-se à contagem das células. Mediante o número de células pretendidas para cada linha celular, plaquearam-se em placas (*Starstedt AG & Co*, Alemanha, Nümbrecht) de 6 poços, perfazendo cada poço com 3mL do respectivo meio de cultura e incubando-se a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. No caso da linha celular H69 perfizeram-se os poços com 3mL de metilcelulose (M7027, *Sigma-Aldrich*[®], St. Louis, EUA) e ao sétimo dia retiraram-se as placas para corar com violeta de cristal (C3886, *Sigma-Aldrich*[®], China) 0,5% diluído em metanol, e contaram-se as colónias após estarem coradas. À solução de metilcelulose em água ultra-pura a 2% é adicionado o mesmo volume de meio de cultura, obtendo-se no final uma solução a 1%

de metilcelulose. No que diz respeito às linhas celulares aderentes, ao quinto dia de incubação mudou-se o meio dos poços das placas multipoço e ao décimo segundo dia de incubação retiraram-se as placas para corar com violeta de cristal. Nestas linhas, para se efectuar a contagem das colónias descartou-se o meio das placas lavando-se de seguida cada poço com 2mL de PBS 1x e adicionaram-se 2mL de metanol (32213, *Sigma-Aldrich*[®], St. Louis, EUA) a cada poço, deixando-se actuar durante cinco minutos. Após este tempo o metanol é descartado, deixa-se secar e volta-se a repetir o procedimento. Adicionaram-se 2mL de violeta de cristal 0,5% diluído em metanol e deixou-se actuar durante cinco minutos, após os quais se aspirou o corante e lavaram-se as placas em água tépida, agitando suavemente. Depois de estarem secas as placas procedeu-se à contagem das colónias com mais de 50 células, podendo assim, calcular-se a *plate efficiency* (PE) e o *surviving factor* (SF) (equação 3 e 4, respectivamente) sujeitos ou não a agressão celular por irradiação (Franken, Rodermond, Stap, Haveman, & van Bree, 2006).

$$\text{Eficiência da Placa (\%)} = \frac{\text{Número de colónias contadas}}{\text{Número de colónias semeadas}} \times 100 \quad (\text{equação 3})$$

$$\text{Factor de Sobrevivência(\%)} = \frac{\text{PE das amostras tratadas}}{\text{PE das amostras de controlo}} \times 100 \quad (\text{equação 4})$$

2.4. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar células ou outras partículas biológicas microscópicas suspensas em meio líquido, através da análise das suas características ópticas e de fluorescência. É possível ainda analisar simultaneamente propriedades físicas e químicas de células em suspensão, tais

como o tamanho e a complexidade interna, através de um equipamento de detecção óptico-electrónico. Neste aparelho (Figura 10) são apontados vários detectores para o local onde o fluxo da suspensão celular passa através de um feixe de luz de um único comprimento de onda, o qual é direccionado para um meio líquido em fluxo. Assim, há um detector na linha do feixe de luz (FSC, do inglês *Forward Scatter*), vários perpendiculares a este (SSC, do inglês *Side Scatter*) e ainda um ou mais detectores fluorescentes. Cada partícula suspensa que passa através do feixe de luz vai dispersar a luz de forma diferente e os corantes químicos fluorescentes que se encontram na partícula ou a ela ligados podem ser excitados emitindo luz de menor frequência do que a da fonte de luz. Pela presença dos detectores a combinação de luz dispersa e fluorescente é melhorada, sendo possível explorar vários tipos de informação acerca da estrutura química e física de cada partícula, por análise das flutuações de brilho de cada detector, uma para cada tipo de emissão fluorescente. A FSC correlaciona-se com o volume celular e a SSC depende da complexidade interna da partícula, como por exemplo a forma do núcleo, a quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e a rugosidade membranar (M. Brown & Wittwer, 2000).

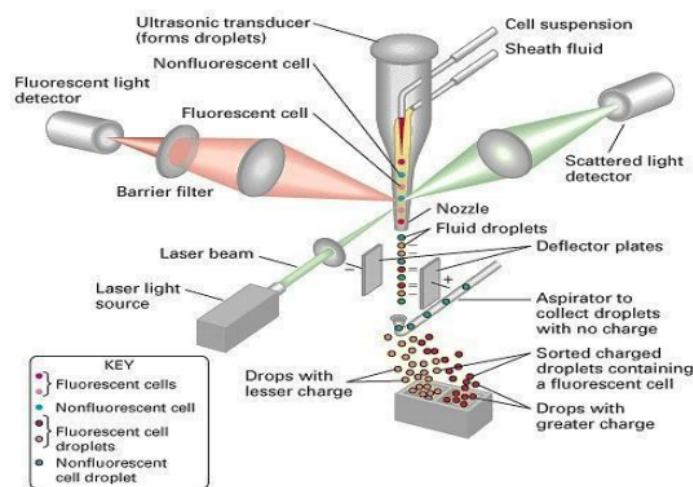


Figura 10 Esquema representativo de um citómetro de fluxo. Neste aparelho um feixe de luz de um único comprimento de onda é direccionado para um meio líquido em fluxo, onde vários detectores são apontados ao local

onde o fluxo passa através do feixe de luz, um na linha do feixe (FSC) e vários perpendiculares a este (SSC). A combinação dos sinais é amplificada e convertida em formato digital para análise computacional. Adaptado de Brown & Wittwer, 2000.

2.4.1. Avaliação da morte celular

Esta técnica foi utilizada para determinar os níveis de morte celular, através da dupla marcação com anexina-V (AV) e iodeto de propídeo (PI do inglês *Propidium Iodide*)(FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) *Annexin V Apoptosis Detection kit I*, BD *Pharmingen*, E.U.A.) para as linhas celulares H1299, A549 e H69.

Tabela I Padrões de marcação com anexina-V e iodeto de propídeo para os diferentes grupos de células.

Grupos	Anexina-V	Iodeto de propídeo
Células vivas	-	-
Células em apoptose inicial	+	-
Células em apoptose tardia/necrose	+	+
Células em necrose	-	+

A AV permite identificar as células que se encontram em apoptose, pois esta proteína liga-se especificamente à fosfatidilserina, um fosfolípido da bicamada lipídica que, nas células em apoptose, se desloca do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. Já o PI é um corante que se intercala no DNA das células, marcando os núcleos daquelas que se encontram em apoptose tardia ou necrose. Assim, é possível identificar quatro distintos grupos de células, representados na tabela I: as células vivas ou viáveis (V), negativas para ambas as marcações; as células em apoptose inicial (AI), positivas para a marcação com AV e negativas para marcação com PI; células em apoptose tardia/necrose (AT/N), positivas para ambas as marcações; e por fim o grupo de células em necrose (N), negativas para marcação com AV e positivas para marcação com PI.

Assim, no dia da irradiação preparam-se placas (*Starstedt AG & Co*, Nümbrecht, Alemanha) de 12 poços, uma placa para cada linha celular e para cada hora pretendida, nas quais são colocadas 10^6 células em cada poço, um para cada condição (Controlo; 0,5Gy; 15Gy; 30Gy). No dia programado para realização de citometria de fluxo, para as linhas celulares aderentes (H1299 e A549) aspirou-se e reservou-se o meio de cultura de cada poço num tubo *falcon* correspondente. Lavaram-se os poços com PBS 1x, aspirou-se e reservou-se no *falcon* anterior correspondente. Adicionou-se tripsina-EDTA e colocaram-se as placas a incubar durante alguns minutos a 37°C e 5% de CO_2 , de modo a destacar as células. Posteriormente confirmou-se ao microscópio o destacamento celular e inibiu-se a tripsina com o meio anteriormente colocado no tubo *falcon* respectivo e ressuspendeu-se a suspensão celular, transferindo-se depois para o mesmo tubo *falcon*. Na linha celular H69 apenas se ressuspendeu a suspensão celular, transferindo-se o tubo *falcon* correspondente a cada condição. Deixaram-se repousar os tubos *falcons* na incubadora durante 1 hora. Centrifugou-se a suspensão celular a 500G durante 5 minutos e, de seguida, aspirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 1mL de PBS 1x, transferindo a solução para tubos de citometria. Centrifugou-se novamente a suspensão celular a 500G durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. De seguida ressuspendeu-se o *pellet* em 100 μL de tampão de ligação (1x) e adicionou-se 5 μL de AV-FITC e 2 μL de PI. Incubaram-se os tubos de citometria durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente (T.A.). Posteriormente à incubação, adicionou-se 400 μL de tampão de ligação e procedeu-se à análise no citómetro *FACSCalibur* (*BD Biociences*, California, EUA), utilizando os comprimentos de onda de excitação de 525nm para a AnV-FITC e 640nm para o PI, sendo os resultados apresentados sob a forma de percentagem de células presentes em cada grupo (tabela 3).

Para a marcação em estudo o número de eventos obtidos através do programa *CellQuest™* (*Spectroncorp*, Washington, EUA), correspondente ao número de células, foi de 10^4 . Para a análise e quantificação da informação, utilizou-se o programa específico *Paint-a-Gate 3.02*, *Machintosh Software* (*BD Biosciences*, Franklin Lakes, EUA) que corre em computador dedicado.

2.4.2. Avaliação do ciclo celular

Para determinar em que fase do ciclo celular ocorre a paragem do crescimento celular utilizou-se o PI, o corante mais comumente utilizado para a análise de DNA e ciclo celular por citometria de fluxo. O PI intercala-se na dupla cadeia de DNA da macromolécula e, assim, a quantidade de corante ligado é proporcional à quantidade deste presente. Este corante também se liga ao RNA, sendo necessário remover o RNA com um tratamento de nucleases (RNase) para a resolução de DNA ideal. A quantificação do conteúdo de DNA permite-nos conhecer a distribuição de uma população de células ao longo das diferentes fases do ciclo celular, podendo estas ser classificadas como células em fase G2 e M, G0, G1 e S. A avaliação foi feita através de *PI/RNase solution* (PI/RNase, *Immunostep*, S.L., Salamanca, Espanha), sendo que a preparação das linhas celulares foi idêntica à utilizada na avaliação da morte celular por anexina-V/iodeto de propídeo, como referido no ponto 2.4.1. Após a preparação as células foram centrifugadas a 200G durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 200µL de etanol a 70% com o tubo em agitação no vortex e incubaram-se os tubos durante 30 minutos a 4°C, no escuro à temperatura ambiente. Lavaram-se as células em 2mL de PBS 1x e centrifugaram-se a 200G durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 500µL de *PI/RNase solution* e incubaram-se durante

15 minutos no escuro à temperatura ambiente. A detecção foi feita utilizando o comprimento de onda de excitação de 488 nm.

3. Radioterapia

Com o objectivo de estudar os efeitos da radioterapia convencional (raio-X), realizaram-se estudos a fim de avaliar a viabilidade e a proliferação celular após a irradiação, bem como estudos para caracterização da morte celular associada à irradiação com as diferentes doses administradas.

Prepararam-se suspensões celulares de H1299, A549 e H69 com $0,5 \times 10^6$ cél/mL, com o volume necessário para realizar todas as experiências pretendidas. As suspensões foram transferidas para tubos *falcon* de 10 mL, um, ou mais se necessário, para cada condição, com o cuidado do volume de suspensão celular perfazer o volume máximo do tubo, de modo a não conter ar aquando da irradiação. Foram também irradiados tubos *falcon* só com os meios de cultura, RPMI e DMEM. As doses de radiação foram de 0,5Gy, 15Gy e 30Gy, sendo que foram realizados controlos em todos os ensaios, ou seja, células que passaram por todos os passos da experiência exceptuando a irradiação.

Para obter uma irradiação com dose homogénea em todo o volume e de modo reprodutível e fiável, foi construída uma caixa de irradiação em acrílico com paredes de 1cm de espessura, com dimensões e referências para posicionamento gravadas em relevo e em tudo compatíveis com as condições habituais de operação do acelerador linear para as quais está certificado. Assim, é possível garantir condições de posicionamento e acondicionamento reprodutíveis, bem como a homogeneidade da dose administrada. A caixa de irradiação, nome pela qual é denominada, foi construída no Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de

Coimbra. Assim como na radioterapia externa, foi efectuado um estudo dosimétrico, recorrendo a imagens de Tomografia Computorizada (TC) da caixa de irradiação. O estudo dosimétrico faz a prova de que a dose prescrita é administrada e qual a sua homogeneidade, como se pode verificar nas figuras 11, 12 e 13.

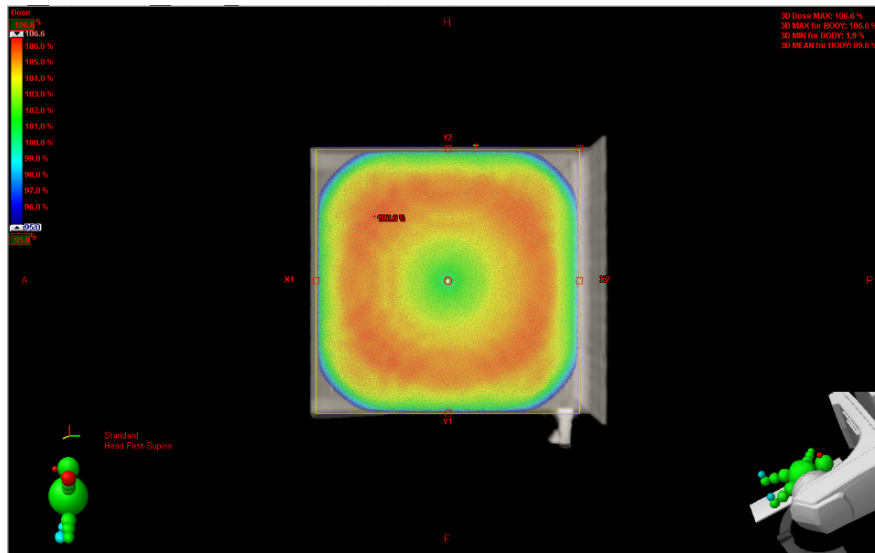


Figura 11 Plano lateral esquerdo da caixa de irradiação (*External beam planning*), com distribuição da dose (mínimo 95% (azul) e máximo 106% (vermelho)).

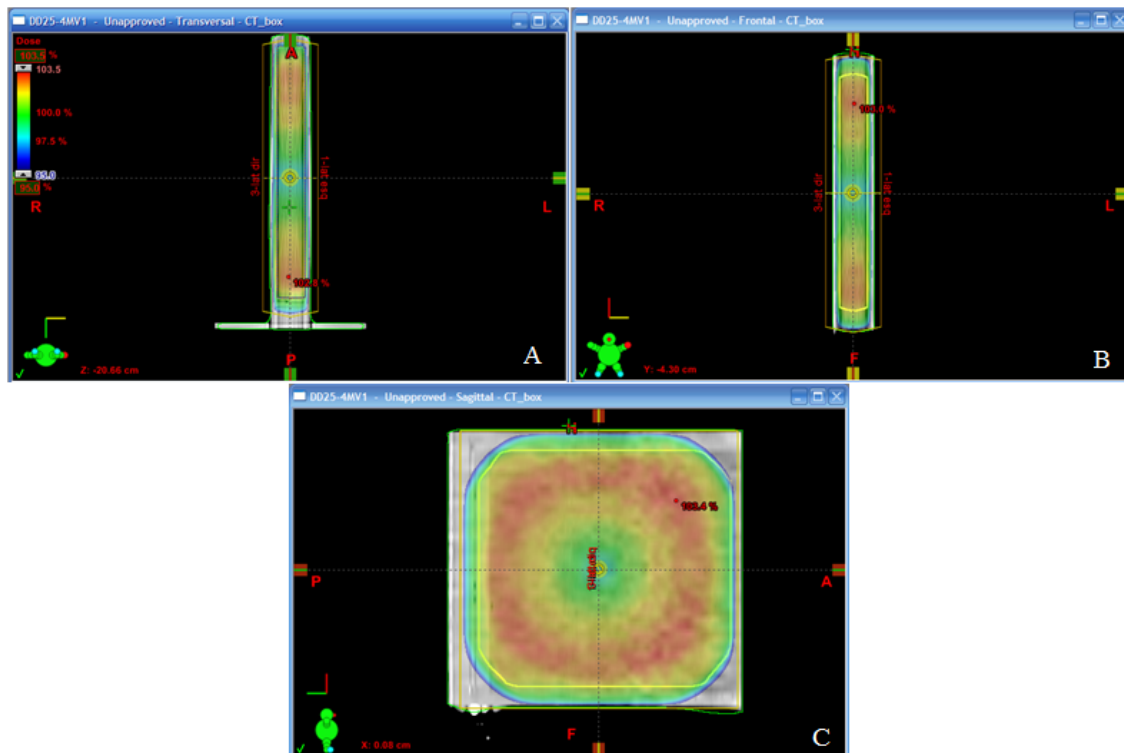


Figura 12 Plano transversal, frontal e sagital (A,B e C ,respectivamente) da caixa de irradiação, com a distribuição de dose (mínimo 95% (azul) e máximo 106% (vermelho)).

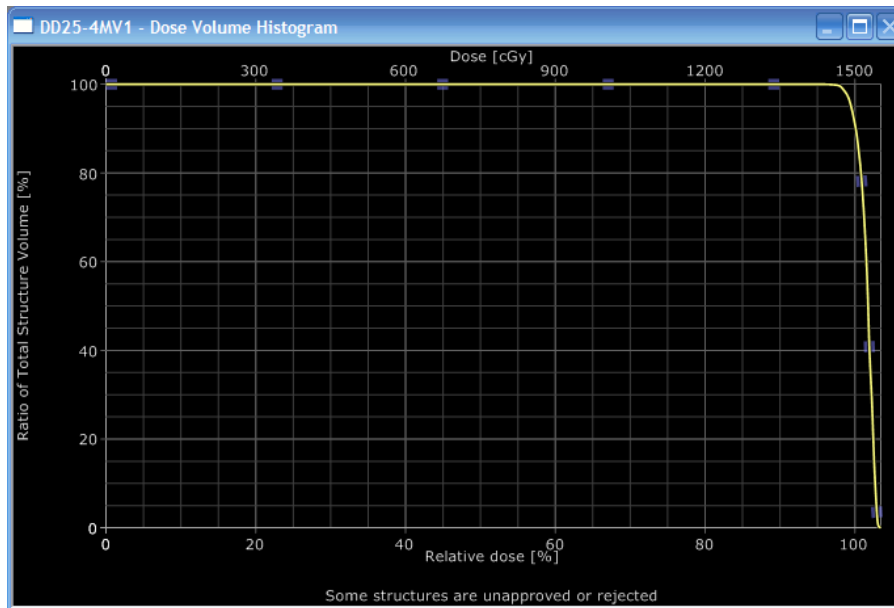


Figura 13 Histograma de volume de dose da caixa de irradiação.

O acelerador linear utilizado para a irradiação foi um acelerador *Varian Clinac* 600C (Varian, California, EUA), com raios-X de energia de 4MeV, utilizado na rotina clínica de tratamento de radioterapia externa. O procedimento de irradiação foi executado por um Engenheiro Físico com formação adequada.

Para iniciar a sessão de irradiação coloca-se a caixa de irradiação vazia sobre o tampo da mesa de tratamento e distribuem-se os tubos *falcon* com as diferentes linhas celulares, preparados previamente para as diferentes doses de irradiação, mantendo os respectivos controlos fora da sala. Para assegurar a homogeneidade de dose recebida pelas células, os tubos *falcon* foram submersos em água, à temperatura de aproximadamente 37°C, com a caixa de irradiação posicionada com o seu eixo longitudinal paralelo ao eixo central do feixe. Preparada a caixa com as amostras inicia-se a sessão. Assim, administra-se a dose em duas fases; uma irradiação com a *gantry* a 90° e outra com a *gantry* a 270°, prefazendo assim a dose pretendida. Após estas duas irradiações retiram-se da caixa os tubos *falcon* com a condição irradiada, permanecendo

os restantes, e assim sucessivamente. As doses para as diferente condições encontram-se na tabela II. Para finalizar, retiram-se os últimos tubos *falcon* da caixa de irradiação, retirando também toda a água que a preenche. Para cada sessão de irradiação o acelerador foi disponibilizado por cerca de 20 a 30 minutos, com período efectivo de feixe de 20 minutos.

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

dose	0,5Gy	2Gy (0.5+1.5)	5Gy (2+3)	8Gy (5+3)	12Gy (8+4)	15Gy (12+3)	30Gy (15+15)
Lado direito	23MU	67MU	133MU	133MU	178MU	133MU	669MU
Lado esquerdo	23MU	67MU	134MU	134MU	179MU	134MU	669MU

A dose é administrada com a *gantry* em diferentes posições, de modo a garantir que a dose administrada é a pretendida, como se pode verificar na figura 14.

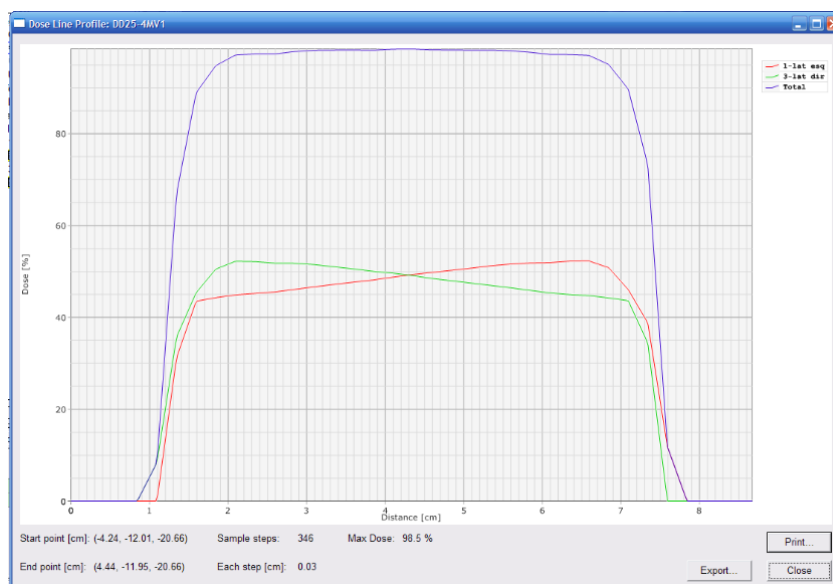


Figura 14 Perfil de dose. A verde e a vermelho as curvas da dose administrada de cada um dos lados da caixa de irradiação. A azul a soma das duas irradiações, verificando-se a garantia da dose administrada ser a pretendida.

Finalizada a irradiação, procedeu-se então à preparação do ensaio Alamar Blue[®], ensaio clonogénico e citometria de fluxo, descritos na secção 2.

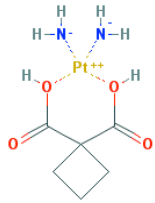
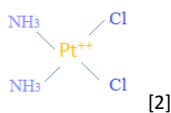
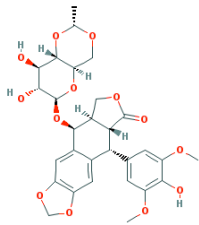
4. Quimioterapia

A fim de estudar os efeitos citotóxicos dos fármacos cisplatina (Cis), carboplatina (Carbo) e etoposido (Etop), foram realizados estudos para avaliar a viabilidade celular.

4.1. Estudos de citotoxicidade

De forma a avaliar e comparar a acção da quimioterapia nas diferentes linhas celulares de CP, incubaram-se as várias culturas celulares com diferentes concentrações dos fármacos, representados na tabela III. Todos os fármacos foram cedidos pela Farmácia do CHUC.

Tabela III Fármacos utilizados nos estudos de citotoxicidade. [1] Retirado de *The PubChem Project*, [2] Adaptado de Siddik, 2003.

	Carboplatina	Cisplatina	Etoposido
Nome Empresa	Carboplatina Teva	Cisplatina Generis	Etoposido Teva
Estrutura química	 [1]	 [2]	 [1]
Formulação/ Concentração	Solução injectável 10mg/ml	Concentrado para solução para perfusão 1mg/ml	Solução injectável 20mg/ml
Fórmula Química	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ Pt	PtC ₂ H ₆ N ₂	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₃
Massa Molecular	371.25g	300.05g	588.56g

As suspensões celulares das linhas H1299, A549 e H69 foram preparadas com $0,04 \times 10^6$ cél/mL (H1299 e A549) e $0,25 \times 10^6$ cél/mL (H69), as quais foram posteriormente distribuídas em placas (*Starstedt AG & Co*, Nümbrecht, Alemanha) de 48 poços ($600 \mu\text{L}$ /poço). As placas com as suspensões das linhas celulares aderentes foram incubadas durante a noite, de forma a permitir a adesão celular; posteriormente, os fármacos foram administrados de forma a obter as concentrações desejadas. Relativamente à suspensão da linha celular H69, esta não necessita de prévia incubação, pelo que os fármacos são administrados no dia do plaquamento. Os três fármacos foram administrados com diferentes concentrações: carboplatina entre $1 \mu\text{M}$ e $500 \mu\text{M}$, cisplatina entre $1 \mu\text{M}$ e $33 \mu\text{M}$ e etoposido entre $1 \mu\text{M}$ e $340 \mu\text{M}$. As avaliações foram efectuadas após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação, pelo ensaio Alamar Blue[®]. Em todos os ensaios foram realizados os respectivos controlos.

O conteúdo destas placas foi transferido para placas (*Starstedt AG & Co*, Nümbrecht, Alemanha) de 96 poços ($200 \mu\text{L}$ /poço) e quantificou-se a absorvância a 570nm e 600nm, expressando os dados obtidos como a percentagem de inibição da proliferação em relação às culturas de controlo, normalizados estes para os 100%. Os resultados foram processados no programa *Gen 5 Data Analysis* (*Biotek*[®], Winooski, EUA). Através deste ensaio foi possível estabelecer as curvas dose-resposta e determinar o IC_{50} para os diferentes fármacos. Estes resultados foram analisados e processados com o auxílio do programa *OriginPro 8.0* (*OriginLab Corporation*, Northampton, EUA).

5. Terapia combinada

As opções de tratamento são determinadas pelo tipo de tumor e pelo seu estadiamento. A terapia combinada (radioterapia e quimioterapia) é uma das terapias mais comuns neste tipo de cancro.

De forma a avaliar e comparar a acção da terapia combinada nas diferentes linhas celulares de CP com a acção da radioterapia, incubaram-se as culturas celulares com diferentes concentrações da associação dos fármacos cisplatina e etoposido, representados na tabela III. Todos os fármacos foram cedidos pela Farmácia do CHUC.

5.1. Terapia combinada de Cisplatina com radioterapia

Prepararam-se suspensões celulares de H1299, A549 e H69 com $0,5 \times 10^6$ cél/mL, com o volume necessário para realizar todas as experiências pretendidas. As suspensões foram transferidas para tubos *falcon* de 10mL, um, ou mais se necessário, para cada condição (Controlo, 0,5Gy, 15Gy e 30Gy), com o cuidado do volume de suspensão celular perfazer o volume máximo do tubo, de modo a não conter ar aquando da irradiação. Antes da irradiação adicionou-se, a um *falcon* de cada condição e de cada linha celular, a concentração de cisplatina correspondente ao IC₅₀ das 48h. Noutro conjunto de *falcons*, adicionou-se a cada condição e para cada linha celular a concentração correspondente ao IC₇₅ das 48h da cisplatina. Após este processo procedeu-se à irradiação com RX, como descrita na secção 3.

5.2. Terapia combinada de Etoposido com radioterapia

Do mesmo modo, foram preparadas suspensões celulares de A549 e de H1299 com com $0,5 \times 10^6$ cél/mL, com o volume necessário para realizar todas as experiências pretendidas, sendo estas transferidas para *falcons* de 10mL. Antes da irradiação adicionou-se a um *falcon* de cada condição e para cada linha celular a concentração de etoposido correspondente ao IC₅₀ das 48h, tal como com a cisplatina. Noutro conjunto de *falcons*, adicionou-se a cada condição e para cada linha celular a concentração correspondente ao IC₇₅ das 48h de etoposido. Após este processo procedeu-se à irradiação com RX, como descrita na secção 3.

6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM SPSS® v.19. Na análise descritiva foram determinadas medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio-padrão e amplitude inter-quartil) para as variáveis quantitativas. Os resultados dos ensaios clonogénicos foram apresentados sob a forma de razão relativamente ao controlo.

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 *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 factor (teste paramétrico). As comparações múltiplas foram realizadas considerando a correcção 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 sigmoidal, com recurso ao *software* OriginPro utilizando o modelo “DoseResp”. As curvas referentes aos ensaios clonogénicos foram obtidas considerando o modelo linear de agressão celular ($SF = e^{-\frac{D}{D_0}}$), utilizando o mesmo *software*.

Foi considerado um nível de significância de 5%.

IV. Resultados¹

¹ Resultados obtidos em co-autoria com Fernando Mendes.

1. Radioterapia

Para avaliar os efeitos da radioterapia na proliferação celular nas três linhas de CP estas foram irradiadas com diferentes doses, recorrendo ao acelerador linear disponibilizado pelo Serviço de Radioterapia do CHUC.

Após a irradiação com diferentes doses procederam-se aos ensaios de Alamar Blue[®], clonogénicos e citometria de fluxo, de modo a verificar a inibição da proliferação celular, a viabilidade celular e avaliar e caracterizar o tipo de morte induzido e o ciclo celular, respectivamente.

1.1. Linha celular A549

Para a linha A549 (CPNPC tipo II, de células epiteliais alveolares basais) obtiveram-se os resultados observados na Figura 15. No que diz respeito à proliferação celular (Figura 15 (A)) verificou-se um aumento de inibição de proliferação com o aumento de dose de radiação, bem como com o aumento do tempo de incubação, verificando-se diferenças estatisticamente significativas após 72 e 96 horas de incubação entre a dose mais baixa e a mais elevada ($p=0,009$ e $p=0,012$) e ainda às 96 horas de incubação entre os 0,5Gy e os 15Gy ($p=0,015$).

Para a avaliação da viabilidade celular foi efectuado o ensaio clonogénico, após irradiação com doses de radiação de 0,5Gy, 2Gy, 5Gy, 8Gy, 12Gy, 15Gy e 30Gy.

Geralmente, os resultados obtidos através dos ensaios clonogénicos são representados com aplicação de um modelo linear quadrático, segundo a equação 5.

$$SF = e^{-(\alpha D + \beta D^2)} \quad (\text{equação 5})$$

em que D é a dose, α o inverso da dose letal média (D_0) e β o componente quadrático. Como dos resultados obtidos resultou um $\beta=0$, o modelo utilizado foi o modelo linear, representado pela equação 6.

$$SF = e^{-\alpha D} = e^{-\frac{D}{D_0}} \quad (\text{equação 6})$$

Após o ajuste das curvas a este modelo linear observou-se uma diminuição da viabilidade celular com o aumento da dose de radiação, verificando-se uma relação linear entre a dose de radiação e o SF.

Recorrendo à dupla marcação AV/PI, após 48 horas de incubação, obtiveram-se os resultados da figura 15 (C), onde se observou um aumento gradual da inibição da proliferação e um aumento da morte por apoptose inicial (AI), com o aumento de dose de radiação.

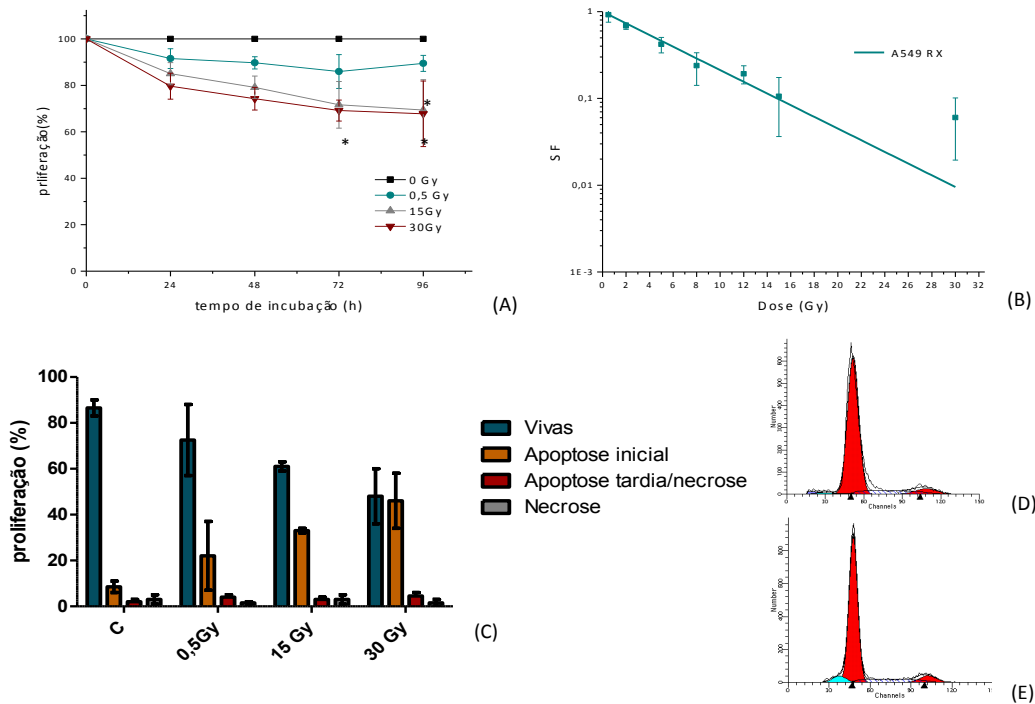


Figura 15 Resultados obtidos para a linha celular A549, após irradiação RX. (A) Curvas de dose-resposta à irradiação com RX obtidas por AlamarBlue® para o controle (células não irradiadas) e doses de 0,5Gy, 15Gy e 30Gy com períodos de incubação de 24, 48, 72 e 96 horas. *p<0,010, relativamente à dose de 0,5Gy. (B) Curva de sobrevivência celular em resposta à irradiação com RX, ajustada a um modelo linear. (C) Viabilidade celular obtida por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação AV/PI. Representação gráfica da percentagem de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e em necrose (N), após irradiação, com um tempo de incubação de 48 horas. Os dados expressam a média e o erro padrão de três experiências independentes (n=3). (D) e (E) Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo. Exemplos de representações gráficas da população celular nas diferentes fases do ciclo celular, das condições de controle e irradiação com dose de 30Gy, respectivamente.

A avaliação do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo, de modo a compreender em que fase do ciclo celular ocorreu a paragem do crescimento das células 48 horas após irradiação. Para tal recorreu-se à marcação com PI e obtiveram-se os resultados representados na Figura 15 (D) e (E) e Tabela IV.

Nesta linha celular verificámos que às 48 horas após a irradiação, a população de células encontra-se maioritariamente na fase G0/G1 (cerca de 70%), não existindo variações significativas entre as diferentes condições ($p<0,050$).

Tabela IV Relação das doses de radiação com a população de células em cada fase do ciclo celular para a linha celular A549, com médias e erros padrão (SE) obtidos por citometria de fluxo.

RX 48 horas					
	Pré-G0	G0/G1	S	G2/M	
	média ± SE	média ± SE	média ± SE	média ± SE	
A549	C	3,50 ± 2,50	74,00 ± 6,00	18,50 ± 0,50	7,50 ± 6,50
	0,5Gy	6,00 ± 1,00	75,50 ± 4,50	23,00 ± 3,00	1,50 ± 1,50
	15Gy	8,67 ± 2,03	72,00 ± 4,04	19,00 ± 7,02	9,00 ± 5,20
	30Gy	11,00 ± 5,51	77,33 ± 8,99	13,00 ± 9,07	9,67 ± 2,73

1.2. Linha celular H1299

Tal como na linha celular A549, para a linha celular H1299 (CPNPC, células epiteliais) foram realizados ensaios de proliferação, viabilidade e avaliação de morte celular e ciclo celular.

Na Figura 16 (A), obtida através do ensaio de Alamar Blue[®], pode observar-se um aumento da inibição da proliferação com o aumento de dose, havendo diferenças estatisticamente significativas entre a dose de 0,5 Gy e as doses de 15Gy e 30Gy às 24 horas de incubação ($p < 0,010$), às 48 horas de incubação ($p < 0,010$) e ainda às 72 horas de incubação ($p < 0,010$ e $p < 0,050$, respectivamente).

Relativamente ao ensaio de viabilidade, verificou-se sensibilidade por parte desta linha celular, uma vez que já não se observou formação de colónias com irradiação a partir dos 15Gy. Verificou-se ainda uma relação linear entre a dose de radiação e o SF, tal como na linha celular A549.

Após a avaliação e caracterização da morte celular por citometria de fluxo, verificou-se não haver uma inibição acentuada da proliferação. No entanto, obtiveram-

se diferenças estatisticamente significativas na inibição da proliferação entre o controle e a dose de 30Gy ($p=0,019$) e na morte por AI entre estas mesmas condições ($p=0,032$).

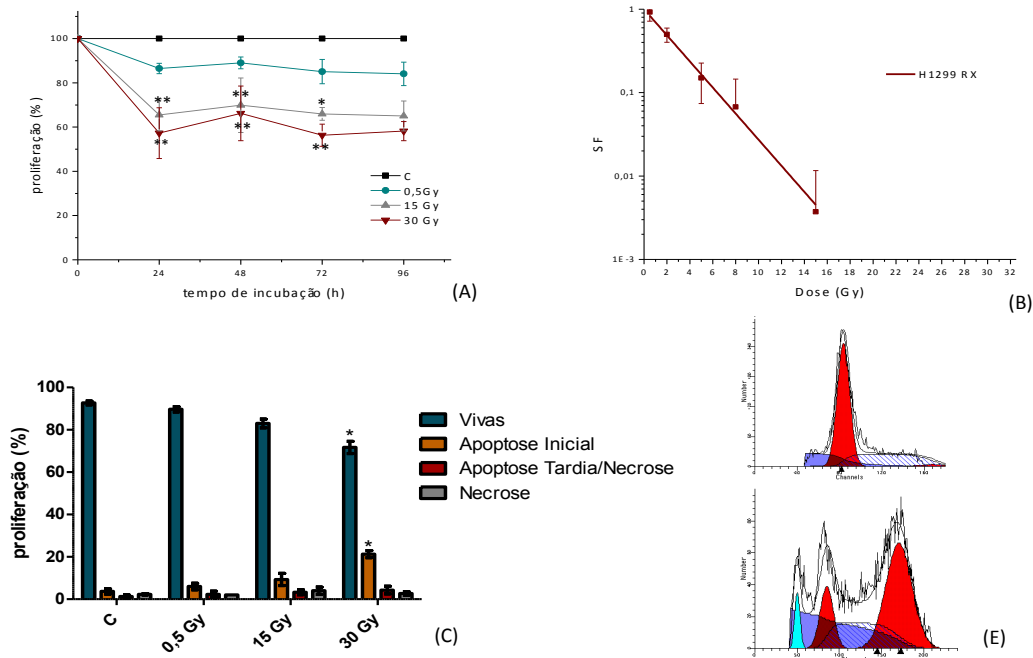


Figura 16 Resultados obtidos para a linha celular H1299, após irradiação RX. (A) Curvas de dose-resposta à irradiação com RX obtidas por AlamarBlue® para controle (células não irradiadas) e doses de 0,5Gy, 15Gy e 30Gy com períodos de incubação de 24, 48, 72 e 96 horas. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$, relativamente à dose de 0,5Gy. (B) Curva de sobrevivência celular em resposta à irradiação com RX, ajustada a um modelo linear. (C) Viabilidade celular obtida por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação AV/PI. Representação gráfica da percentagem de células V, em AI, em AT/N e em N, após irradiação, com tempo de incubação de 48 horas. Os dados expressam a média e o erro padrão de três experiências independentes ($n=3$). * $p<0,05$. (D) e (E) Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo. Exemplos de representações gráficas da população celular nas diferentes fases do ciclo celular, das condições de controle e irradiação com dose de 30Gy, respectivamente.

A avaliação do ciclo celular foi realizada igualmente por citometria de fluxo, de modo a compreender em que fase do ciclo celular ocorreu a paragem do crescimento das células após irradiação. Para tal recorreu-se à marcação com PI obtendo-se os resultados representados na Figura 16 (D) e (E) e na Tabela V.

Tabela V Relação das doses de radiação com a população de células em cada fase do ciclo celular para a linha celular H1299, com médias e erros padrão obtidos por citometria de fluxo.

RX 48 horas					
	Pré-G0	G0/G1	S	G2/M	
	média ± SE	média ± SE	média ± SE	média ± SE	
H1299	C	3,67 ± 1,20	61,00 ± 2,65	33,67 ± 1,20	5,33 ± 1,76
	0,5Gy	3,00 ± 0,00	62,00 ± 1,00	32,00 ± 1,00	5,50 ± 0,50
	15Gy	9,00 ± 2,00	19,00 ± 8,00	24,50 ± 3,50	56,00 ± 5,00
	30Gy	14,00 ± 6,03	8,00 ± 1,53	21,67 ± 5,46	70,00 ± 6,00

Verificou-se que a maioria da população de células de controlo se encontrava na fase G0/G1 (cerca de 60%), assim como a população irradiada com 0,5Gy. Com o aumento da dose, a população de células na fase G0/G1 diminuiu drasticamente, contando com cerca de 17% na condição de 15Gy e com cerca de 7% na dose mais elevada (30Gy). Relativamente à população de células na fase S, assinalámos uma diminuição (cerca de 12% entre o controlo e a dose mais elevada) com o aumento da dose administrada. Por último, em G2/M observámos um aumento considerável da população de células nas doses de 15Gy (cerca de 50%) e 30Gy (cerca de 60%), relativamente ao controlo e à menor dose.

1.3. Linha celular H69

Na linha celular H69 (CPPC), para além dos ensaios realizados para as linhas anteriores, uma vez que estas células crescem em suspensão, a viabilidade foi também avaliada com recurso ao método de exclusão do azul tripano. Os resultados obtidos para esta linha celular através de todos os ensaios já referidos podem ser visualizados na Figura 17.

Através do ensaio de Alamar Blue[®] (Figura 17 (A)) não se observou um aumento da inibição da proliferação significativo. No entanto, verifica-se um aumento da inibição da proliferação com o aumento de dose de radiação, bem como com o aumento do tempo de incubação.

Como método complementar utilizou-se o método de exclusão do azul tripano, através do qual os resultados demonstram um aumento mais acentuado da inibição da proliferação com o aumento de dose e com o aumento de tempo de incubação (Figura 17 (B)). Verificou-se ainda que com uma dose de 0,5Gy houve um aumento da inibição da proliferação até às 48 horas de incubação, seguindo-se uma recuperação celular, ou seja, uma diminuição da inibição da proliferação, até às 96 horas de incubação. Estes resultados verificaram-se ainda analisando-se a densidade celular (Figura 17(C)). Verificou-se, assim, que a densidade celular das células não irradiadas (controlo) aumentou com o aumento do tempo de incubação, como esperado, verificando-se diferença significativa entre as 24 e as 72 horas ($p=0,017$), bem como entre as 24 e as 96 horas de incubação ($p=0,029$). Quanto às doses mais elevadas, 15Gy e 30Gy, verificámos que a densidade celular não se alterou significativamente, chegando mesmo a diminuir nos tempos mais tardios de incubação. Às 24 horas de incubação verifica-se uma diferença significativa entre a condição de controlo e a dose mais elevada ($p=0,001$) e ainda entre a condição de controlo e a dose de 15Gy ($p=0,016$). Às 48 horas de incubação verificou-se uma diferença significativa entre as células não irradiadas e as doses mais elevadas ($p=0,045$ e $p=0,0001$ para as doses de 15Gy e 30Gy, respectivamente). Às 72 e às 96 horas de incubação, tal como às 24 horas, verificou-se uma diferença significativa entre o controlo e as doses mais elevadas ($p=0,015$ e $p=0,006$ (72 horas) e $p=0,035$ e $p=0,004$ (96 horas), para as doses de 15Gy e 30Gy, respectivamente).

Com o ensaio clonogénico verificou-se uma diminuição da viabilidade celular com o aumento de dose de radiação, sendo esta relação linear, como se pode observar na Figura 17 (D). Observou-se ainda formação de colónias com a dose mais elevada de radiação, embora menor do que com as restantes doses, como seria de esperar.

Com a dupla marcação de AV/PI observou-se um aumento da inibição da proliferação e da morte por AI com o aumento de dose de radiação. Encontrámos diferenças estatisticamente significativas na morte por AI entre a condição de controlo e a dose de 30Gy ($p < 0,010$) e ainda entre a dose de 0,5Gy e a dose de 30Gy ($p < 0,050$). Observámos ainda diferenças com significância estatística na inibição da proliferação entre a condição controlo e a dose de radiação mais elevada ($p < 0,010$) e entre a dose de 0,5Gy e de 30Gy ($p < 0,050$).

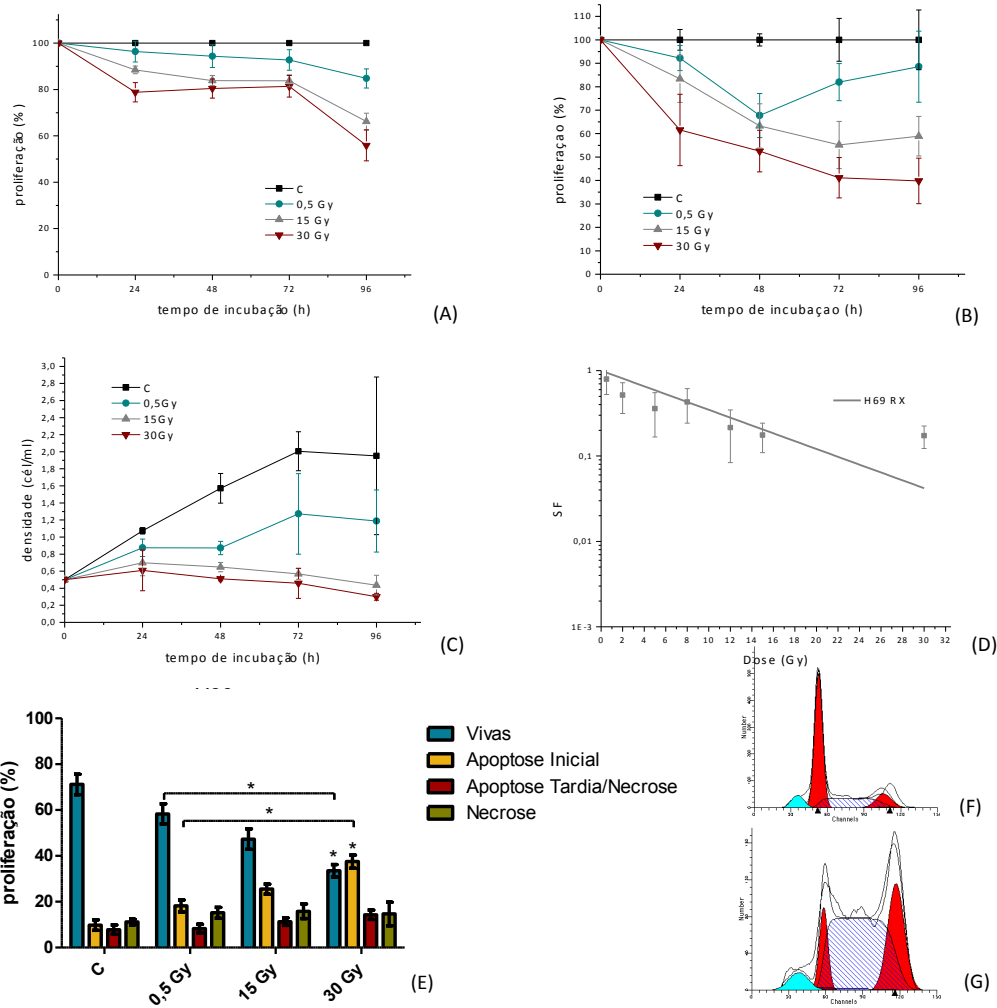


Figura 17 Resultados obtidos para a linha celular H69, após irradiação RX. **(A)** Curvas de dose-resposta obtidas por AlamarBlue® para o controle (células não irradiadas) e doses de 0,5Gy, 15Gy e 30Gy com períodos de incubação de 24, 48, 72 e 96 horas. **(B)** Curvas de dose-resposta obtidas pelo método de exclusão do azul tripano, normalizada ao controle. **(C)** Curvas de densidade celular, obtidos por azul tripano. Os resultados traduzem a média e desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes em duplicado(n=6). **(D)** Curva de sobrevivência celular, ajustada a um modelo linear. **(E)** Viabilidade celular obtida por citometria de fluxo. Representação gráfica da percentagem de células V, em AI, em AT/N e em N, após irradiação, com um tempo de incubação de 48 horas. Os dados expressam a média e o erro padrão de três experiências independentes (n=3). * $p < 0,05$. **(F)** e **(G)** Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo. Exemplos de representações gráficas da população celular nas diferentes fases do ciclo celular, das condições de controlo e irradiação com dose de 30Gy, respectivamente.

Após irradiação e incubação de 48 horas, verificou-se que na condição de controlo e de 0,5Gy a população de células desta linha manteve-se maioritariamente na fase G0/G1 (Figura 17 (F) e tabela VI). Com doses de radiação mais elevadas, 15Gy e 30Gy (Figura 17 (G) e tabela VI), verificou-se que a maioria da população de células permaneceu na fase S do ciclo celular.

Verificaram-se diferenças significativas entre todas as condições nas fases G0/G1 ($p=0,041$) e S ($p=0,037$).

Tabela VI Relação das doses de radiação com a população de células em cada fase do ciclo celular, para a linha celular H69, com médias e erros padrão obtidos por citometria de fluxo.

		RX 48 horas			
		Pré-G0	G0/G1	S	G2/M
		média ± SE	média ± SE	média ± SE	média ± SE
H69	C	4,00 ± 2,00	53,50 ± 3,50	34,50 ± 0,50	11,50 ± 3,50
	0,5Gy	6,67 ± 2,03	57,33 ± 1,76	23,67 ± 0,67	19,00 ± 1,54
	15Gy	19,33 ± 1,20	19,67 ± 9,33	49,00 ± 19,35	31,00 ± 15,50
	30Gy	19,25 ± 3,28	24,25 ± 6,42	41,25 ± 15,30	34,75 ± 12,47

Há ainda diferenças significativas entre as três linhas celulares em estudo. Através do ensaio clonogénico verificou-se uma maior sensibilidade por parte da linha celular H1299 e uma maior resistência à irradiação por parte da linha celular H69.

Relativamente à avaliação e caracterização da morte celular por citometria de fluxo observaram-se diferenças significativamente relevantes, nomeadamente entre as linhas H1299 e H69, entre as células viáveis em todas as condições (Controlo ($p=0,016$); 0,5Gy ($p=0,041$); 15Gy ($p=0,022$) e 30Gy ($p=0,031$)). Entre as linhas A549 e H1299 apenas se verificaram diferenças significativas na morte por apoptose, na condição de 15Gy ($p=0,015$). Verificaram-se ainda diferenças estatisticamente significativas entre as 3 linhas celulares na morte por N (Controlo ($p=0,022$); 0,5Gy ($p=0,017$) e 15Gy ($p=0,028$)) e por AT/N ($p=0,023$) na condição de 15Gy.

Na avaliação do ciclo celular verificaram-se diferenças significativas entre as linhas A549 e H1299 com uma irradiação de 30Gy, nas fases G0/G1 ($p=0,025$) e G2/M ($p=0,035$) e ainda na fase S entre as 3 linhas ($p=0,035$).

2. Quimioterapia

Para avaliar os efeitos de três fármacos na proliferação celular nas três linhas de CP realizámos vários estudos recorrendo ao ensaio Alamar Blue[®], com o objectivo final de determinar os valores de IC₅₀ para os diferentes fármacos e tempos de incubação (24, 48, 72 e 96 horas). Para tal, foram administradas diferentes concentrações de cisplatina, carboplatina e etoposido.

2.1. Avaliação da proliferação celular após administração de cisplatina

Foram administradas diferentes concentrações de cisplatina (1µM a 33µM) e incubadas durante diferentes intervalos de tempo (24, 48, 72 e 96 horas). Na figura 18 está representada a resposta farmacológica das linhas A549, H1299 e H69 à cisplatina, para os tempos de incubação de 24, 48, 72 e 96 horas. Os valores de IC₅₀ obtidos para as diferentes linhas encontram-se na Tabela VII. Verificámos que nas 3 linhas celulares ocorreu, em geral, uma diminuição do IC₅₀ deste fármaco com o aumento do tempo de incubação. De salientar que na linha celular A549 (Figura 18 (A)), com tempos de incubação de 24 e 48 horas, a cisplatina parece possuir baixo potencial inibitório, uma vez que a concentração necessária para atingir o IC₅₀ é muito superior à máxima utilizada. No entanto, nas 48, 72 e 96 horas há um aumento da inibição da proliferação com significado estatístico ($p < 0,05$) entre os três tempos de incubação. Na Figura 18 (B), relativa à linha celular H1299, observámos que ocorreu um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) da inibição da proliferação, com o aumento do tempo de incubação. Para as 72 horas de incubação verificou-se maior inibição da proliferação com este fármaco, resultando no menor IC₅₀, tendo ainda assim significância estatística relativamente aos outros tempos de incubação ($p < 0,05$). Por último, na Figura 18 (C) verificou-se que, para a linha celular H69, quanto maior o

tempo de incubação com o fármaco, maior é a inibição da proliferação celular, ocorrendo uma diminuição do IC₅₀ para esta linha celular. Observou-se ainda um possível baixo potencial inibitório da cisplatina às 24 horas de incubação para as linhas celulares H1299 e H69 (Figura 18 (B) e (C), respectivamente)

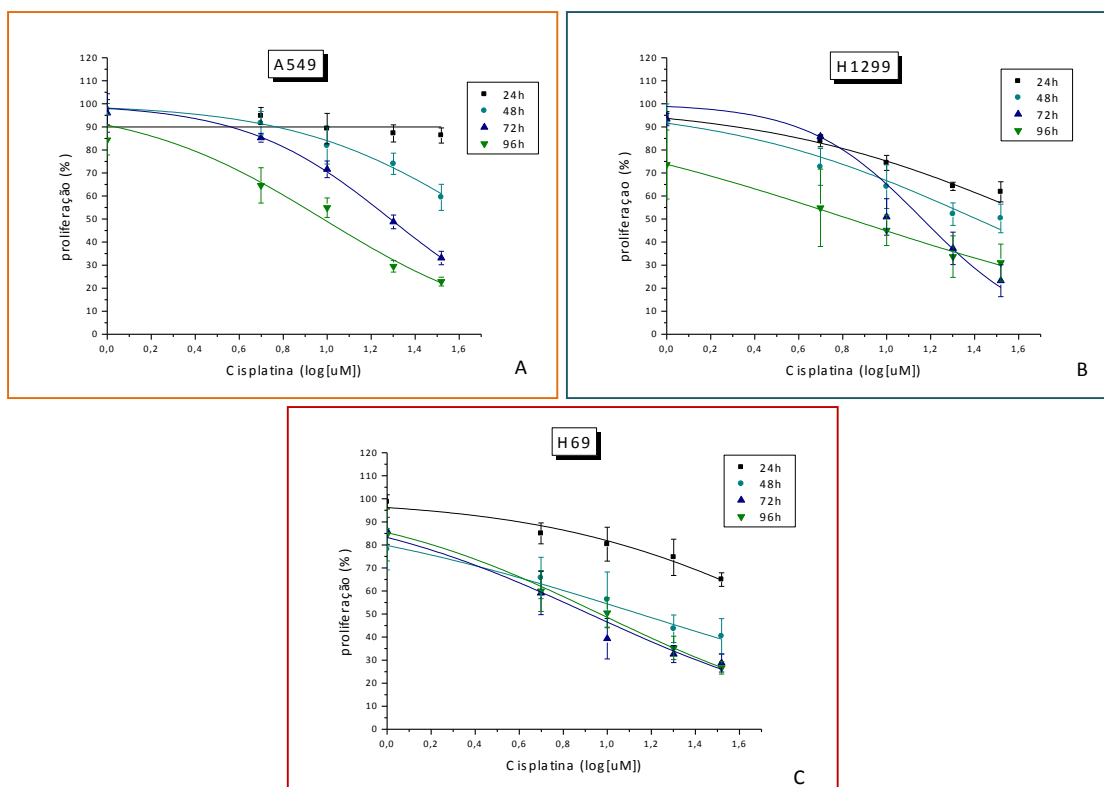


Figura 18 Curvas de dose-resposta ao fármaco cisplatina nas linhas celulares de CP, obtidas por Alamar Blue[®], após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação celular nas linhas celulares (A) A549, (B) H1299 e (C) H69. Os resultados traduzem a média e desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes realizadas em duplicado (n=6).

Para todos os tempos de incubação observamos uma maior sensibilidade à cisplatina por parte da linha celular H69 (CPPC) e uma maior resistência por parte da linha celular A549 (CPNPC), como se pode observar na Tabela VII. Todas as diferenças entre os IC₅₀ das linhas celulares, são estatisticamente significativos ($p < 0,05$), com exceção das 96 horas de incubação entre as linhas A549 e H69 ($p > 0,05$).

Tabela VII Relação das concentrações de cisplatina necessárias para para inibir 50% a proliferação celular (IC_{50}) para diferentes tempos de incubação, respectivos r^2 e IConf a 95% para as três linhas celulares (A) A549, (B) H1299 e (C) H69. * $IC_{50}>33\mu M$

(A)	Tempo de incubação	IC_{50} (μM)	r^2	IConf (μM)
A549	24h	*	-	-
	48h	*	-	-
	72h	19,38	1	[19,044 ; 19,717]
	96h	9,59	0,96	[7,748 ; 11,858]
(B)	Tempo de incubação	IC_{50} (μM)	r^2	IConf (μM)
H1299	24h	*	-	-
	48h	25,65	0,95	[20,994 ; 31,344]
	72h	14,54	0,93	[11,936 ; 17,701]
	96h	6,80	0,99	[6,095 ; 7,590]
(C)	Tempo de incubação	IC_{50} (μM)	r^2	IConf (μM)
H69	24h	*	-	-
	48h	14,05	0,98	[11,287 ; 17,474]
	72h	8,31	0,97	[6,783 ; 10,176]
	96h	9,28	1	[8,644 ; 9,972]

2.2. Avaliação da proliferação celular após administração de carboplatina

Tal como para a cisplatina, foram administradas diferentes concentrações de carboplatina (1 μM a 500 μM) incubadas durante diferentes intervalos de tempo. Na Figura 19 encontra-se representada a resposta farmacológica das três linhas celulares à carboplatina, para os tempos de incubação de 24, 48, 72 e 96 horas. Os valores de IC_{50} obtidos para as diferentes linhas encontram-se na Tabela VIII.

De referir que para este fármaco parece ter existido um baixo potencial inibitório com tempos de incubação de 24 e 48 horas em todas as linhas celulares, e ainda às 72 horas para as linhas celulares de CPNPC (A549 (figura 19 (A) e H1299 figura 19 (B)). No entanto, na linha celular H1299 verificou-se um aumento da inibição de proliferação significativo das 48 horas para as 96 horas de incubação ($p<0,05$) bem como das 72 horas para as 96 horas de incubação ($p<0,05$). Na linha celular A549 o aumento da

inibição de proliferação é estatisticamente significativo entre todas as horas de incubação ($p < 0,05$). Quanto à linha celular H69 (figura 19 (C)), verificou-se um aumento da inibição de proliferação com significância estatística ($p < 0,05$) entre todos os tempos de incubação, excepto para as 48 horas, para o qual não foi possível o ajuste da sigmoidal.

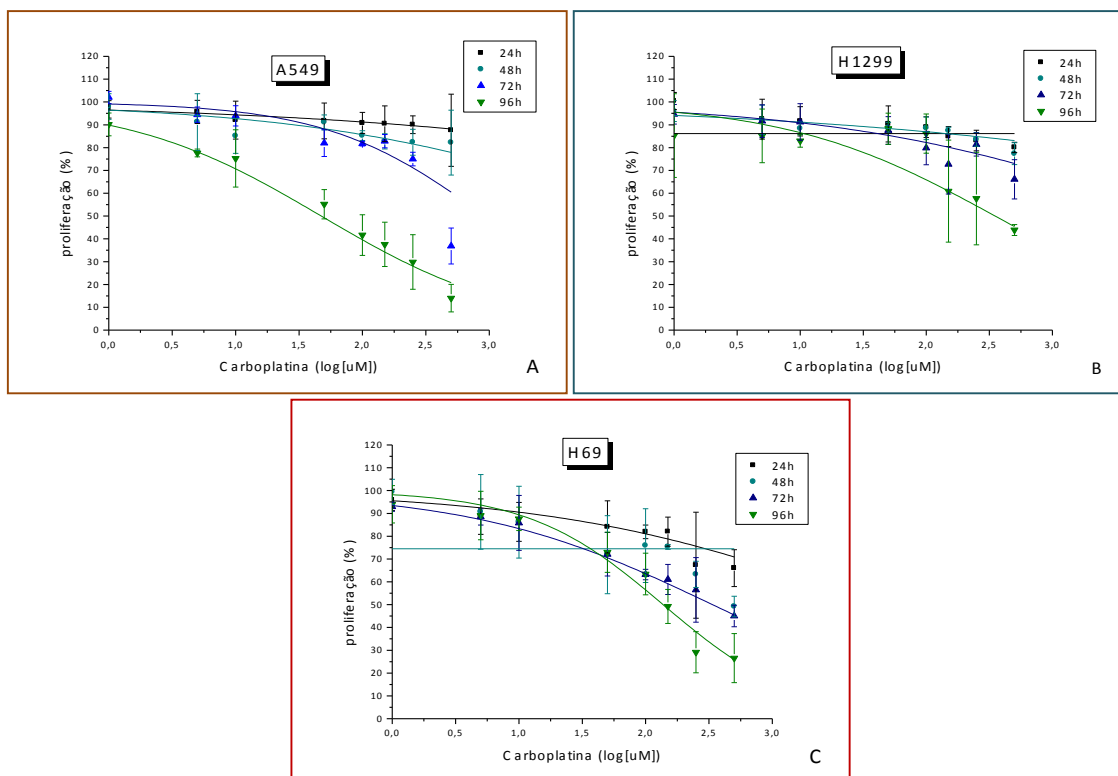


Figura 19 Curvas de dose-resposta ao fármaco carboplatina nas linhas celulares de CP, obtidas por Alamar Blue®, após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação celular nas linhas celulares (A) A549, (B) H1299 e (C) H69. Os resultados traduzem a média e desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes realizadas em duplicado (n=6).

Para as 96 horas de incubação verificou-se uma maior sensibilidade da linha celular A549 e uma maior resistência por parte da linha H1299, sendo as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), como se pode observar na Tabela VIII.

Tabela VIII Relação das concentrações de carboplatina necessárias para definir o IC₅₀ para diferentes tempos de incubação, respectivos r² e IConf a 95% para as três linhas celulares (A) A549, (B) H1299 e (C) H69. *IC₅₀>500 μM

(A)	Tempo de incubação	IC ₅₀ (μM)	r ²	IConf (μM)
A549	24h	*	-	-
	48h	*	-	-
	72h	*	-	-
	96h	47,33	0,98	[40,150 ; 55,787]
(B)	Tempo de incubação	IC ₅₀ (μM)	r ²	IConf (μM)
H1299	24h	*	-	-
	48h	*	-	-
	72h	*	-	-
	96h	351,41	0,89	[238,498 ; 517,792]
(C)	Tempo de incubação	IC ₅₀ (μM)	r ²	IConf (μM)
H69	24h	*	-	-
	48h	-	-	-
	72h	337,35	1	[306,415 ; 371,401]
	96h	137,39	0,96	[117,284 ; 160,932]

2.3. Avaliação da proliferação celular após administração de etoposido

Foram administradas diferentes concentrações de etoposido (1μM a 340μM) incubadas durante diferentes intervalos de tempo, tal como para os fármacos anteriores. Na Figura 20 encontra-se representada a resposta farmacológica das três linhas celulares ao etoposido, para os tempos de incubação de 24, 48, 72 e 96 horas. Os valores de IC₅₀ obtidos para as diferentes linhas encontram-se na Tabela IX.

Verificaram-se diferentes respostas ao fármaco etoposido, nas três linhas celulares. Na linha celular A549 (Figura 20 (A)) verificaram-se diferenças significativas entre todos os tempos de incubação ($p < 0,05$), sendo que o menor IC₅₀ encontrado corresponde às 72 horas de incubação, caso em que se verificou um aumento da inibição da proliferação mais rápido.

Na linha celular H1299 (Figura 20 (B)) observámos diferenças com significância estatística entre as 24 e as 96 horas de incubação ($p<0,05$), as 48 e as 96 horas ($p<0,05$) e ainda entre as 72 e as 96 horas de incubação ($p<0,05$), embora os IC_{50} nesta linha sejam todos bastante próximos.

Na linha celular H69 (Figura 20 (C)) relativamente às 72 horas, verificou-se um aumento estatisticamente significativo, tanto em relação às 24 como às 48 horas de incubação ($p<0,05$). Para as 96 horas de incubação não foi possível determinar o ajuste sigmoidal.

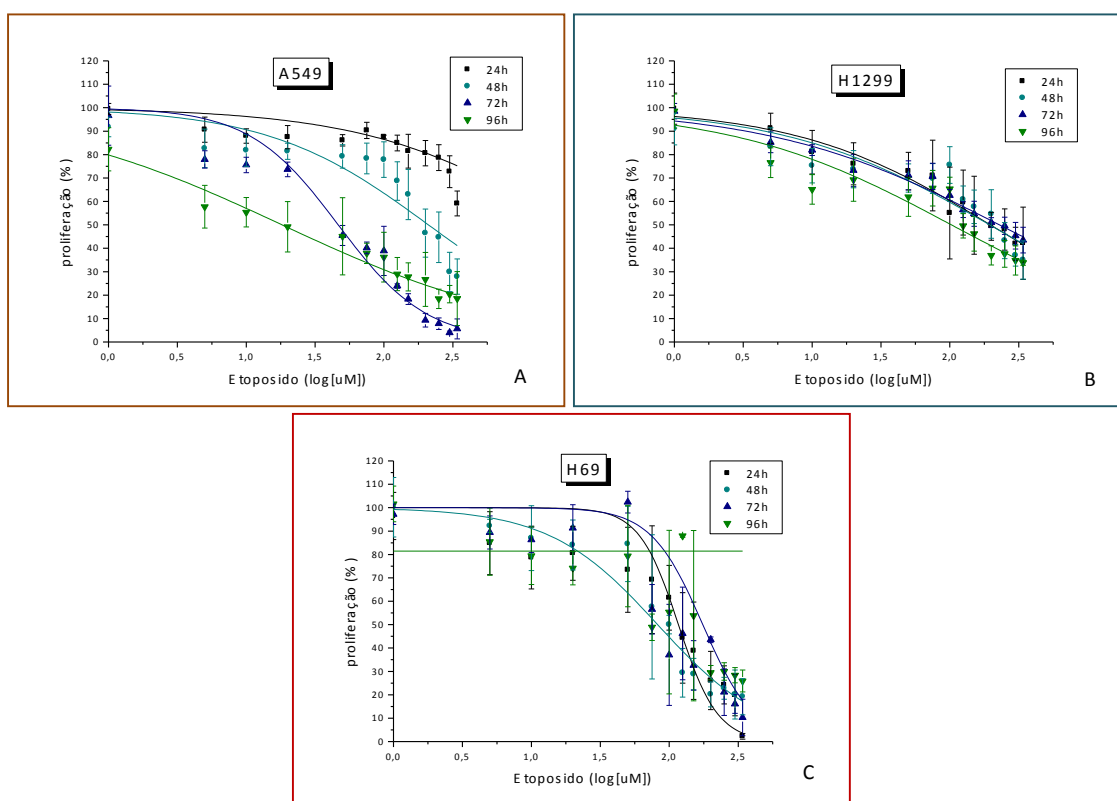


Figura 20 Curvas de dose-resposta ao fármaco etoposido nas linhas celulares de CP, obtidas por Alamar Blue[®], após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação celular nas linhas celulares (A) A549, (B) H1299 e (C) H69. Os resultados traduzem a média e desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes realizadas em duplicado (n=6).

Como se pode observar na Tabela IX, para as 24 horas de incubação verificámos uma maior sensibilidade por parte das linhas celulares H1299 e H69 ($IC_{50} = 196,89\mu M$ e $IC_{50} = 116,55\mu M$), comparativamente à linha celular A549 ($IC_{50} > 340\mu M$). Ainda

assim, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre todas as linhas celulares para este tempo de incubação ($p < 0,05$). Às 48 horas de incubação observou-se que a linha celular H69 ($IC_{50} = 82,35\mu M$) apresentou maior sensibilidade do que as A549 e H1299 ($IC_{50} = 210,29\mu M$ e $IC_{50} = 194,65\mu M$). De salientar que entre os IC_{50} das duas linhas de CPNPC (A549 e H1299) e a linha de CPPC (H69) existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Neste tempo de incubação verificamos que a linha celular A549 foi a mais sensível ($IC_{50} = 46,64\mu M$) a este fármaco do que as restantes ($IC_{50} = 229,27\mu M$ e $IC_{50} = 174,94\mu M$, para as linhas H1299 e H69, respectivamente), sendo que as diferenças verificadas apresentam significado estatístico ($p < 0,05$). Às 96 horas de incubação a linha A549 também se apresentou como mais sensível relativamente à linha H1299, com significância estatística ($p < 0,05$).

Tabela IX Relação das concentrações de etoposido necessárias para definir o IC_{50} para diferentes tempos de incubação, respectivos r^2 e Iconf a 95% para as três linhas celulares (A) A549, (B) H1299 e (C) H69. * $IC_{50} > 340\mu M$

(A)	Tempo de incubação	IC_{50} (μM)	r^2	IConf (μM)
A549	24h	*	-	-
	48h	210,29	0,78	[167,102 ; 264,629]
	72h	46,54	0,94	[37,809 ; 57,281]
	96h	18,17	0,96	[15,280 ; 21,654]
(B)	Tempo de incubação	IC_{50} (μM)	r^2	IConf (μM)
H1299	24h	196,89	0,98	[179,059 ; 216,493]
	48h	194,65	0,84	[161,792 ; 234,187]
	72h	229,27	0,98	[211,919 ; 248,045]
	96h	102,66	0,9	[80,629 ; 131,285]
(C)	Tempo de incubação	IC_{50} (μM)	r^2	IConf (μM)
H69	24h	116,55	0,93	[81,613 ; 166,449]
	48h	82,35	0,97	[65,150 ; 104,103]
	72h	174,94	0,91	[160,234 ; 190,988]
	96h	-	-	-

3. Terapia combinada

Os ensaios de terapia combinada foram efectuados recorrendo à radioterapia e à administração de cisplatina ou etoposido. Foram efectuadas administrações com concentrações diferentes de fármaco, com o IC_{50} das 48 horas e o IC_{75} também das 48 horas para cada fármaco. A avaliação da viabilidade celular através dos ensaios clonogénicos apenas foi efectuada para as doses de radiação de 0,5Gy, 15Gy e 30Gy.

3.1. Terapia combinada de RX com cisplatina

As três linhas celulares de CP, A549, H1299 e H69, foram sujeitas à terapia combinada de RX com cisplatina, apenas utilizando doses de radiação de 0,5Gy, 15Gy e 30Gy.

3.1.1. Linha celular A549

Os resultados de viabilidade celular obtidos pelos ensaios clonogénicos para a linha celular A549 revelaram um efeito antagonista quando a radiação ionizante foi combinada com o fármaco cisplatina (Figura 21), uma vez que se verificou uma maior viabilidade celular para as mesmas doses utilizadas. Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre a radioterapia isolada e a terapia combinada com o IC_{50} da cisplatina às 48h de incubação ($p < 0,050$) bem como entre a radioterapia isolada e a terapia combinada com o IC_{75} da cisplatina às 48h de incubação ($p < 0,010$).

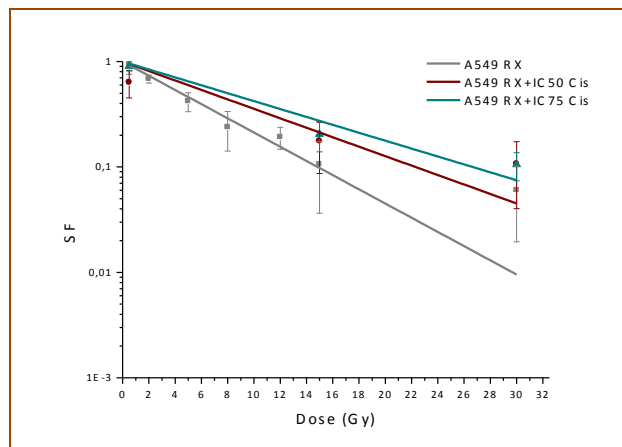


Figura 21 Curva de sobrevivência celular em resposta à radiação com RX e à irradiação combinada com o fármaco cisplatina, para a linha celular A549. Curva ajustada a um modelo linear.

Na avaliação do tipo de morte celular, por citometria de fluxo, verificou-se um efeito de potenciação, embora não significativo ($p < 0,050$), quer para a combinação com o IC₅₀ da cisplatina, quer com o IC₇₅ deste mesmo fármaco (Figura 22 (B) e (C)). Verificou-se ainda que a morte se deu maioritariamente por AI em todas as condições, tal como verificado para a radioterapia isolada. Através deste resultados observa-se um efeito de potenciação relativamente à radioterapia isolada (Figura 22 (A)), em ambos os casos.

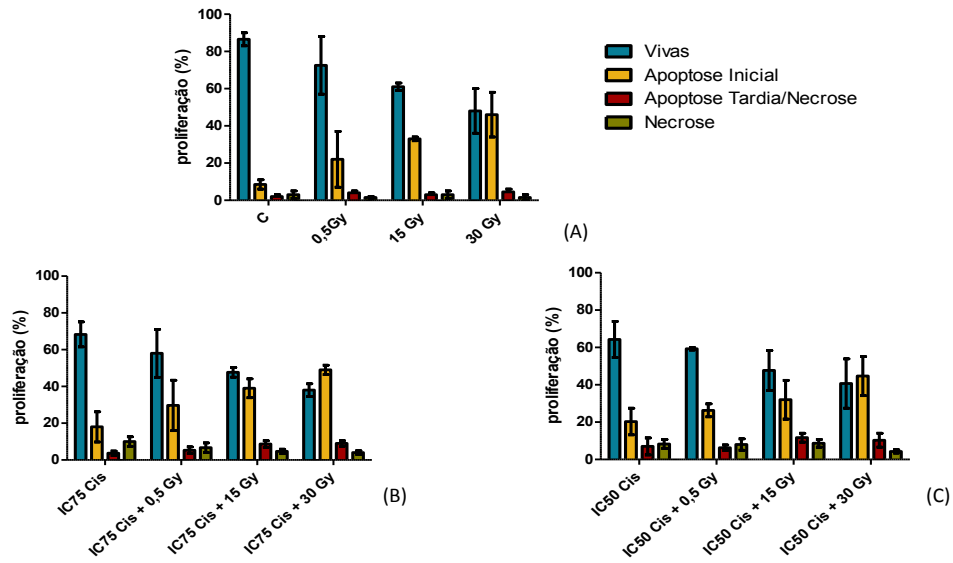


Figura 22 Viabilidade celular obtida por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação AV/PI, para a linha celular A549. Representação gráfica da percentagem de células V, em AI, em AT/N e em N após (A) radioterapia isolada, (B) Radioterapia e IC₅₀ cisplatina e (C) radioterapia e IC₇₅ cisplatina. Os dados expressam a média e o erro padrão de três experiências independentes.

De modo a compreender em que fase do ciclo celular ocorre paragem do crescimento das células após terapia combinada com cisplatina, recorreu-se à marcação com PI, obtendo-se os resultados apresentados na Figura 23 e na Tabela X.

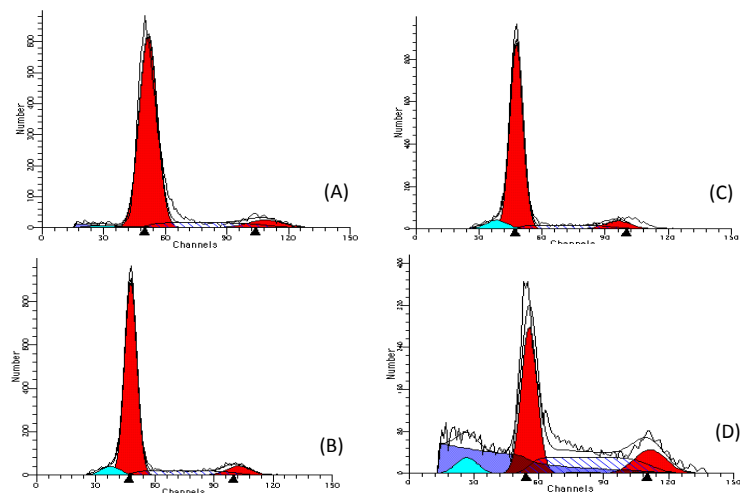


Figura 23 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo, para a linha celular A549. Exemplos de representações gráficas da população de células nas diferentes fases do ciclo celular. (A) Controlo, (B) 30Gy, (C) IC₅₀ Cis, (D) IC₅₀ Cis + 30Gy.

Posteriormente à irradiação e administração de cisplatina (IC₅₀) e após um período de incubação de 48 horas observámos que a maioria da população de células da linha A549 se encontrava na fase G0/G1, havendo diferenças pouco significativas ($p < 0,050$) entre as diferentes condições. Com a administração de uma menor concentração de cisplatina (IC₇₅) e após o mesmo período de incubação, verificou-se a mesma situação. Observou-se ainda um aumento gradual de população na fase pré-G0 e S, exceptuando nesta última na condição de 30Gy, na qual há uma ligeira diminuição.

Tabela X Relação das doses de radiação com a população de células em cada fase do ciclo celular na linha celular A549, para a radioterapia isolada e para a terapia combinada com cisplatina, com médias e erros padrão obtidos por citometria de fluxo.

	Pré-G0	G0/G1	S	G2/M
	média ± SE	média ± SE	média ± SE	média ± SE
C	3,50 ± 2,50	74,00 ± 6,00	18,50 ± 0,50	7,50 ± 6,50
0,5Gy	6,00 ± 1,00	75,50 ± 4,50	23,00 ± 3,00	1,50 ± 1,50
15Gy	8,67 ± 2,03	72,00 ± 4,04	19,00 ± 7,02	9,00 ± 5,20
30Gy	11,00 ± 5,51	77,33 ± 8,99	13,00 ± 9,07	9,67 ± 2,73
IC ₅₀ Cis	12,00 ± 4,73	79,00 ± 7,55	16,00 ± 7,81	4,33 ± 3,38
IC ₅₀ Cis+0,5Gy	11,50 ± 6,20	75,75 ± 3,33	20,50 ± 3,57	3,75 ± 3,12
IC ₅₀ Cis+15Gy	17,50 ± 5,87	72,50 ± 2,72	23,50 ± 3,38	4,00 ± 4,00
IC ₅₀ Cis+30Gy	17,67 ± 6,01	74,33 ± 2,67	21,33 ± 0,88	4,33 ± 2,96
IC ₇₅ Cis	4,67 ± 0,88	76,67 ± 10,04	20,00 ± 9,02	3,33 ± 1,67
IC ₇₅ Cis+0,5Gy	12,33 ± 9,87	72,00 ± 7,81	23,00 ± 7,77	5,00 ± 2,52
IC ₇₅ Cis+15Gy	15,33 ± 8,25	63,00 ± 4,04	33,00 ± 7,37	4,00 ± 3,51
IC ₇₅ Cis+30Gy	20,75 ± 7,55	71,50 ± 2,72	25,50 ± 3,92	3,00 ± 2,04

3.1.2. Linha celular H1299

Os resultados obtidos para a linha celular H1299 diferem dos obtidos para a linha celular anterior. Assim, no que diz respeito à viabilidade celular com a combinação de RX com o fármaco cisplatina (Figura 24), verificou-se um efeito de potenciação quando utilizada a concentração correspondente ao IC₅₀ das 48 horas deste fármaco. Na Figura 24 não se observa a curva referente a esta combinação, uma vez que

com uma irradiação de 15Gy já não houve formação de colónias, não sendo possível o ajuste linear. Com a administração de uma concentração menor de cisplatina (IC₇₅) verificou-se um comportamento semelhante ao observado apenas com radioterapia.

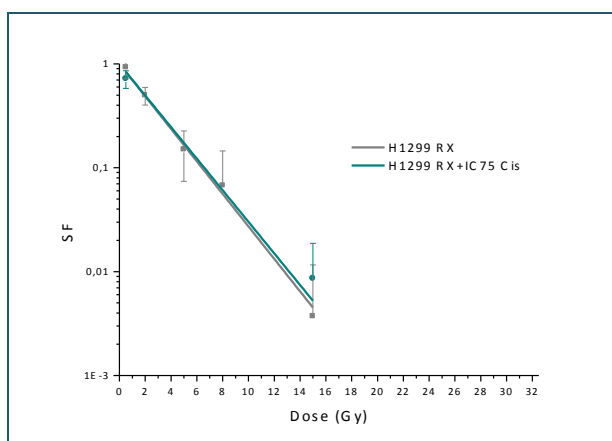


Figura 24 Curva de sobrevivência celular em resposta à irradiação com RX e à irradiação combinada com o fármaco cisplatina, para a linha celular H1299. Curva ajustada a um modelo linear.

Na linha celular H1299 relativamente à avaliação da viabilidade e caracterização da morte celular (Figura 25) não se verificou inibição da proliferação significativa ($p < 0,05$), verificando-se um efeito antagonista nas terapias combinadas comparativamente à radioterapia isolada.

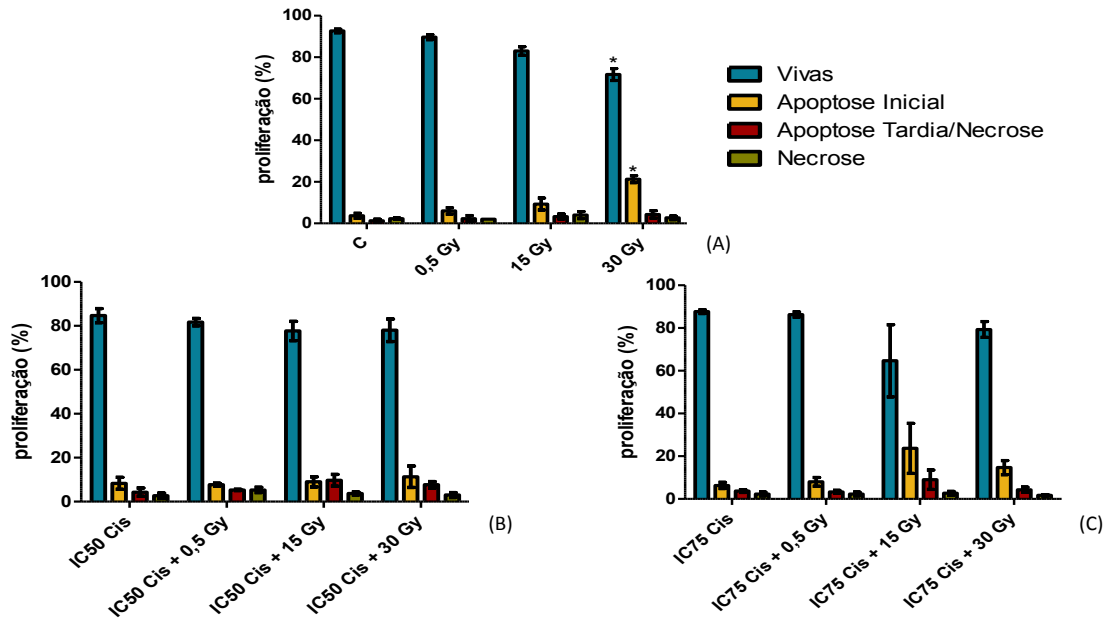


Figura 25 Viabilidade celular obtida por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação AV/PI, para a linha celular H1299. Representação gráfica da percentagem de células V, em AI, em AT/N e em N da linha celular após (A) radioterapia isolada, (B) radioterapia e IC₅₀ cisplatina e (C) radioterapia e IC₇₅ cisplatina. Os dados expressam a média e o erro padrão de três experiências independentes (n=3).

Avaliou-se também o ciclo celular desta linha após as diferentes terapias, recorrendo à citometria de fluxo (Figura 26 e Tabela XI).

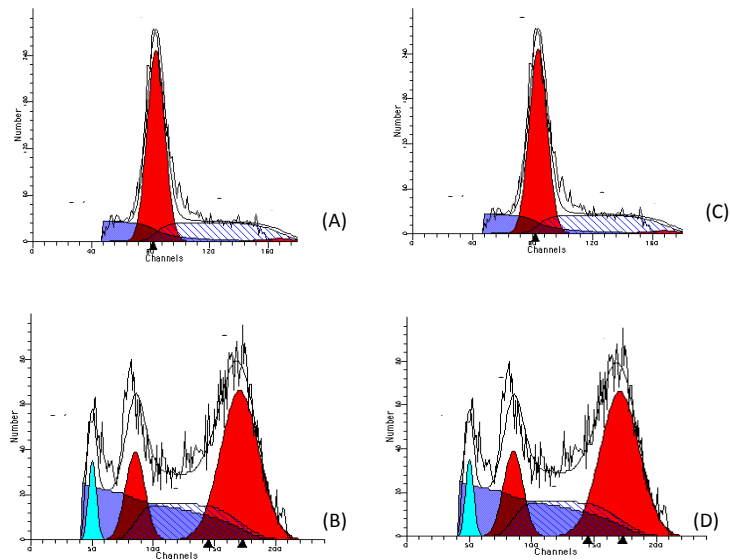


Figura 26 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo, para a linha celular H1299. Exemplos de representações gráficas da população celular nas diferentes fases do ciclo celular (A) Controlo, (B) 30Gy, (C) IC₅₀ Cis, (D) IC₅₀ Cis + 30Gy.

Com a administração da concentração correspondente ao IC₅₀ da cisplatina observou-se que a maioria da população de células se encontrava na fase S, excepto na

condição de 15Gy em que também se encontravam em fase G2/M; no entanto, nesta condição o desvio padrão associado às duas fases é elevado.

Com a administração de menor concentração de cisplatina (IC_{75}) verificámos uma diminuição da população na fase S com o aumento da dose de radiação e um aumento gradual da fase G2/M também com o aumento da dose de radiação.

Tabela XI Relação das condições de tratamento com a população de células em cada fase do ciclo celular na linha celular H1299, para a radioterapia isolada e para a terapia combinada com cisplatina, com médias e erros padrão obtidos por citometria de fluxo.

Linha celular H1299				
	Pré-G0	G0/G1	S	G2/M
	média ± SE	média ± SE	média ± SE	média ± SE
C	3,67 ± 1,20	61,00 ± 2,65	33,67 ± 1,20	5,33 ± 1,76
0,5Gy	3,00 ± 0,00	62,00 ± 1,00	32,00 ± 1,00	5,50 ± 0,50
15Gy	9,00 ± 2,00	19,00 ± 8,00	24,50 ± 3,50	56,00 ± 5,00
30Gy	14,00 ± 6,03	8,00 ± 1,53	21,67 ± 5,46	70,00 ± 6,00
IC_{50} Cis	4,50 ± 3,50	17,50 ± 1,50	79,50 ± 4,50	3,00 ± 3,00
IC_{50} Cis+0,5Gy	1,50 ± 1,50	17,00 ± 2,00	80,00 ± 5,00	3,00 ± 3,00
IC_{50} Cis+15Gy	3,67 ± 1,20	11,00 ± 4,04	53,67 ± 20,88	35,67 ± 23,68
IC_{50} Cis+30Gy	8,00 ± 7,00	16,00 ± 6,00	75,00 ± 3,00	9,00 ± 9,00
IC_{75} Cis	4,25 ± 1,11	14,25 ± 3,20	64,75 ± 1,28	23,50 ± 7,86
IC_{75} Cis+0,5Gy	3,33 ± 0,88	12,33 ± 4,98	60,00 ± 12,53	27,33 ± 9,26
IC_{75} Cis+15Gy	9,00 ± 3,51	5,33 ± 1,20	55,33 ± 10,73	39,33 ± 9,84
IC_{75} Cis+30Gy	10,67 ± 2,91	4,33 ± 1,45	46,00 ± 13,43	50,33 ± 13,22

Entre as linhas celulares A549 e H1299 verificaram-se diferenças significativas na fase G0/G1 com irradiação de 15Gy ($p=0,034$) combinada com o IC_{50} da cisplatina. Com a terapia combinada com IC_{75} da cisplatina verificaram-se diferenças significativas, ainda entre estas duas linhas celulares, nas fases G0/G1 com uma irradiação de 15Gy ($p=0,022$) e 30Gy ($p=0,026$) e ainda na fase G2/M com uma irradiação de 15Gy ($p=0,034$).

3.1.3. Linha celular H69

Na linha celular H69 apenas foram realizados ensaios para terapia isolada e terapia combinada de radiação com cisplatina. Tal como para as restantes linhas celulares obtiveram-se resultados de viabilidade e de avaliação e caracterização da morte celular e ciclo celular, por ensaio clonogénico e citometria de fluxo.

Dos ensaios de viabilidade verificamos que a combinação de RX com cisplatina, com as duas concentrações utilizadas (IC_{50} e IC_{75}) apresentaram um efeito antagonista relativamente à radioterapia isolada (figura 27). No entanto, as curvas dose-resposta da terapia combinada apenas foram ajustadas com três diferentes doses de radiação, contrariamente à curva correspondente à radioterapia isolada que foi ajustada com sete doses diferentes. Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as três diferentes terapias ($p < 0,050$).

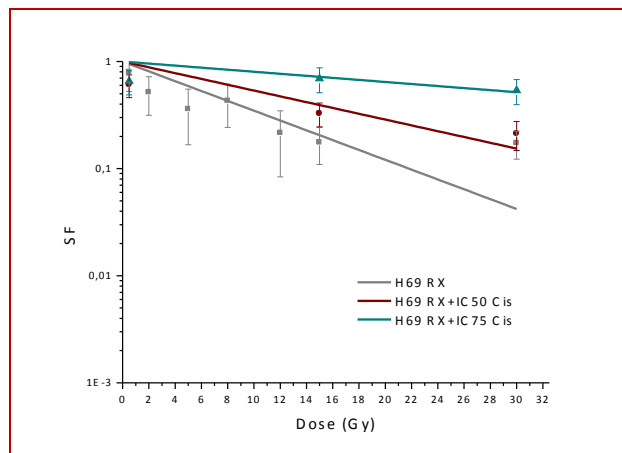


Figura 27 Curva de sobrevivência celular em resposta à irradiação com RX e à irradiação combinada com o fármaco cisplatina, para a linha celular H69. Curva ajustada a um modelo linear.

Quanto à avaliação e caracterização da morte celular (Figura 28), verificou-se que a combinação da radiação RX com o IC_{50} das 48 horas da cisplatina resultou, a

curto prazo (48 horas), num efeito de potenciação, verificando-se uma percentagem maior de morte por AI nesta terapia comparativamente à radioterapia isolada. Nesta terapia verificou-se uma diferença significativa entre todas as condições, no que diz respeito à morte celular por N ($p=0,028$).

Quando administrada a concentração correspondente ao IC₇₅ das 48 horas deste fármaco à linha celular H69 verificou-se uma diminuição das células viáveis, quando comparado com o controlo da radioterapia isolada. No entanto, com a combinação de RX verificou-se um efeito antagonista, na medida em que a inibição da proliferação celular é menor quando comparada com a radioterapia isolada. Verificou-se ainda que a morte se dá maioritariamente por AI nas três diferentes terapias.

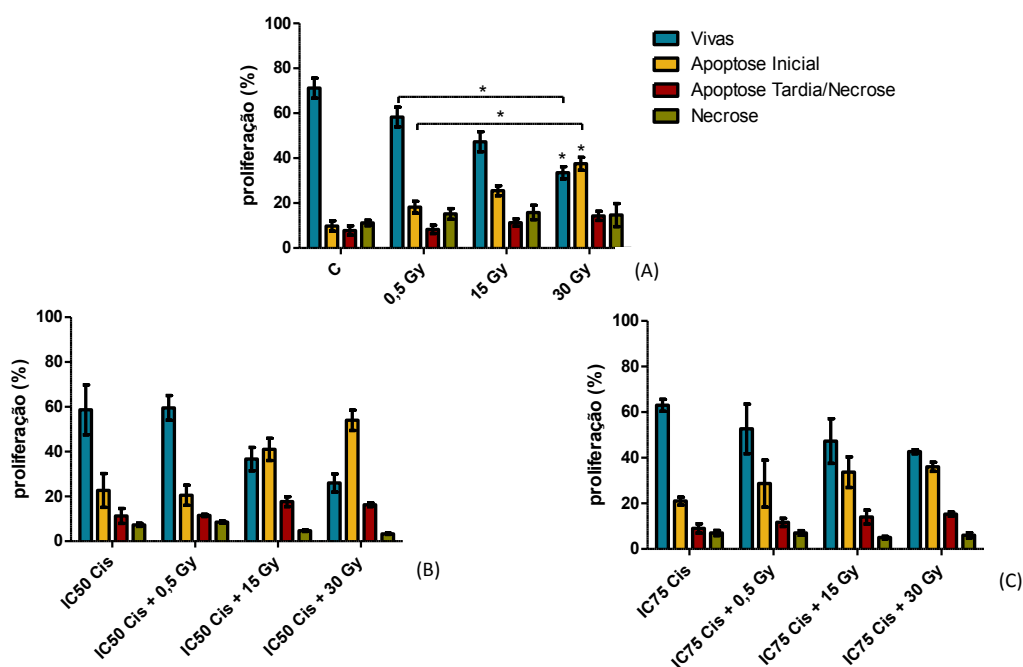


Figura 28 Viabilidade celular obtida por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação AV/PI, para a linha celular H69. Representação gráfica da percentagem de células V, em AI, em AT/N e em N após (A) radioterapia isolada, (B) radioterapia e IC₅₀ cisplatina e (C) radioterapia e IC₇₅ cisplatina. Os dados expressam a média e o erro padrão de três experiências independentes (n=3). * $p<0,050$.

Após a marcação com PI obtiveram-se os resultados representados na Figura 29 e na Tabela XII, para a linha celular H69 com 48 horas de incubação após tratamento.

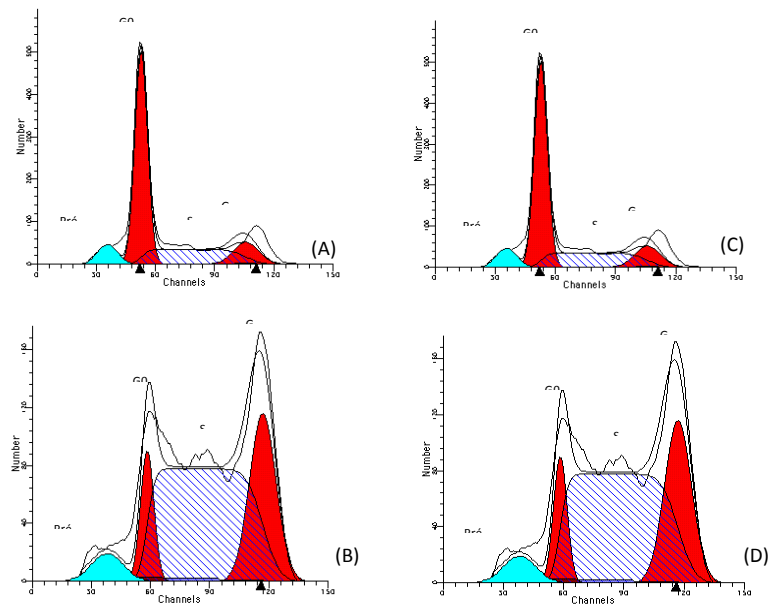


Figura 29 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo, para a linha celular H69. Exemplos de representações gráficas da população celular nas diferentes fases do ciclo celular (A) Controlo, (B) 30Gy, (C) IC₅₀ Cis, (D) IC₅₀ Cis + 30Gy.

A população de células da linha celular H69, após tratamento com RX e a concentração correspondente ao IC₅₀ das 48 horas da cisplatina, encontra-se maioritariamente na fase G₀/G₁ nas condições de controlo e de 0,5Gy, sendo que observámos uma diminuição da população de células que se encontrava em fase S (33% para 21%, do controlo para a menor dose, respectivamente). Nas condições de maior dose, a população de células encontrava-se maioritariamente em fase S. Com a combinação de RX e uma concentração menor deste fármaco observou-se que a maioria da população de células se encontra na fase S, verificando-se pouca diferença entre condições.

Tabela XII Relação das condições de tratamento com a população de células em cada fase do ciclo celular na linha celular H69, para a radioterapia isolada e para a terapia combinada com cisplatina, com médias e erros padrão obtidos por citometria de fluxo.

Linha celular H69				
	Pré-G0	G0/G1	S	G2/M
	média ± SE	média ± SE	média ± SE	média ± SE
C	4,00 ± 2,00	53,50 ± 3,50	34,50 ± 0,50	11,50 ± 3,50
0,5Gy	6,67 ± 2,03	57,33 ± 1,76	23,67 ± 0,67	19,00 ± 1,54
15Gy	19,33 ± 1,20	19,67 ± 9,33	49,00 ± 19,35	31,00 ± 15,50
30Gy	19,25 ± 3,28	24,25 ± 6,42	41,25 ± 15,30	34,75 ± 12,47
IC ₅₀ Cis	7,50 ± 1,50	11,50 ± 5,50	76,00 ± 1,00	14,00 ± 5,00
IC ₅₀ Cis+0,5Gy	5,50 ± 2,50	16,00 ± 1,00	77,00 ± 0,00	7,00 ± 1,00
IC ₅₀ Cis+15Gy	22,33 ± 4,06	23,33 ± 10,40	59,67 ± 12,55	17,00 ± 4,00
IC ₅₀ Cis+30Gy	26,00 ± 5,20	28,00 ± 8,39	61,33 ± 8,09	10,67 ± 6,69
IC ₇₅ Cis	6,00 ± 2,00	17,50 ± 0,50	66,50 ± 1,50	15,00 ± 0,00
IC ₇₅ Cis+0,5Gy	9,67 ± 2,40	27,67 ± 11,46	58,67 ± 12,44	13,67 ± 4,41
IC ₇₅ Cis+15Gy	12,00 ± 1,73	22,00 ± 6,66	59,00 ± 12,12	18,67 ± 5,90
IC ₇₅ Cis+30Gy	15,50 ± 0,50	15,50 ± 7,50	67,50 ± 22,50	17,00 ± 15,00

Tal como na radioterapia isolada, verificou-se uma maior resistência à terapia combinada com cisplatina por parte da linha celular H69, através da análise da viabilidade celular, bem como uma maior sensibilidade por parte da linha celular H1299. Verificaram-se ainda diferenças significativas entre as linhas celulares H69 e A549, para a terapia de IC₅₀ das 48h de Cis + RX ($p=0,029$). Na terapia combinada de RX com o IC₇₅ das 48h da cisplatina (Tabela VII) verificaram-se resultados similares no que diz respeito à resistência e à sensibilidade, verificando-se uma diferença estatisticamente significativa entre as três linhas ($p<0,050$).

Relativamente à avaliação de morte celular por citometria de fluxo, verificou-se menor morte celular na linha celular H1299, relativamente às linhas celulares A549 e H69. Estas últimas linhas demonstraram uma resposta semelhante a esta terapia.

Entre as três linhas celulares em estudo verificaram-se ainda diferenças significativas na avaliação do ciclo celular para a terapia combinada de RX com o IC₇₅ da cisplatina, nomeadamente nas fases G0/G1 com irradiação de 15Gy ($p=0,022$) e 30Gy ($p=0,026$) e ainda na fase G2/M com irradiação de 15Gy ($p=0,034$).

3.2. Terapia combinada de RX com etoposido

Para além da combinação de radiação X com cisplatina, combinou-se ainda com etoposido, apenas para as linhas celulares A549 e H1299, obtendo-se resultados de viabilidade e de avaliação de morte e ciclo celular.

3.2.1. Linha celular A549

Relativamente à viabilidade celular na linha celular A549, verificou-se um efeito de potenciação quando combinada a radiação RX com o IC₅₀ do etoposido. Quando combinado com o IC₇₅ do etoposido verificou-se uma resposta semelhante à da irradiação isolada. Com as diferentes terapias verificou-se uma relação linear entre a dose de radiação e o SF (Figura 30). Verificaram-se ainda diferenças estatisticamente significativas entre a radioterapia isolada e a terapia combinada com o IC₅₀ do etoposido ($p<0,050$) e entre ambas as terapias combinadas ($p<0,050$).

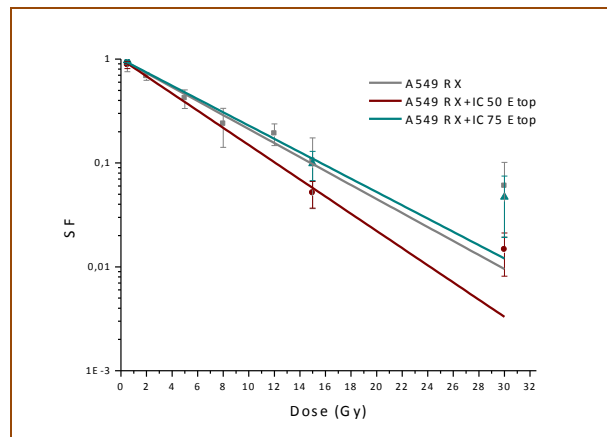


Figura 30 Curva de sobrevivência celular em resposta à irradiação com RX e à irradiação combinada com o fármaco etoposídeo, para a linha celular A549. Curva ajustada a um modelo linear.

Tal como para os ensaios anteriores, recorreu-se à dupla marcação AV/PI para a avaliação da viabilidade celular e a caracterização do tipo de morte celular, através da citometria de fluxo. Nas três diferentes terapias verificou-se um aumento da inibição da proliferação celular, bem como um aumento da morte celular por AI, com o aumento da dose de radiação. No entanto, comparativamente com a radioterapia isolada (Figura 31 (A)), verificou-se uma resposta semelhante quando combinada com o IC₅₀ do etoposídeo (Figura 31 (B)). Já quando combinada com o IC₇₅ do etoposídeo (Figura 31 (C)), verificou-se um efeito antagonista, uma vez que se observou um aumento da inibição de proliferação menor, bem como um menor aumento da morte celular por AI com o aumento de dose.

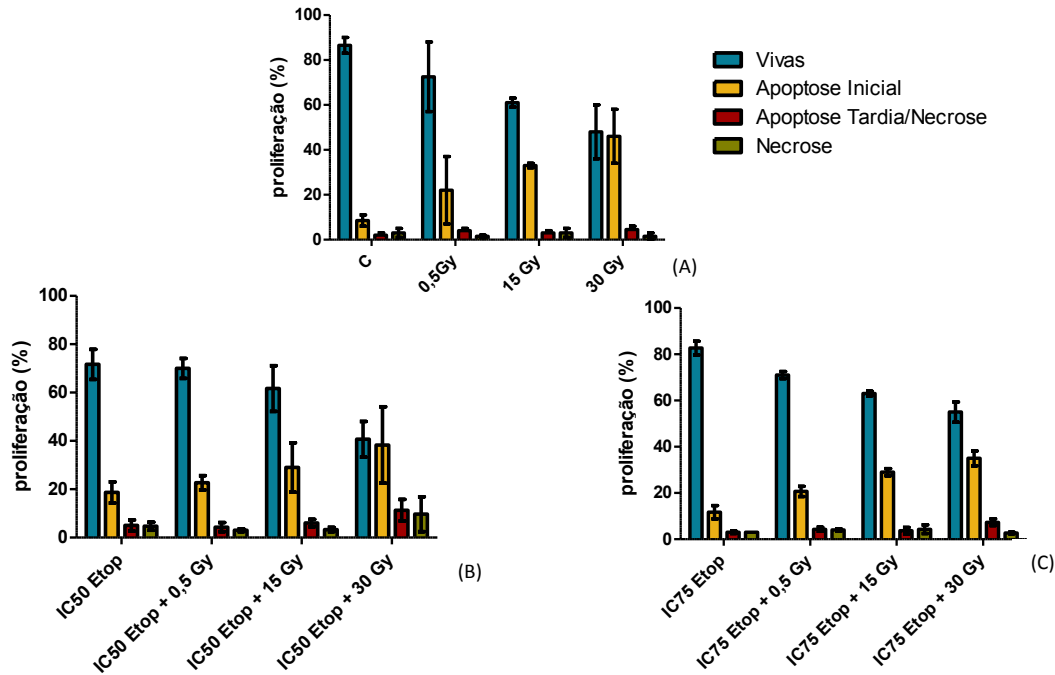


Figura 31 Viabilidade celular obtida por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação AV/PI, para a linha celular A549. Representação gráfica da percentagem de células V, em AI, em AT/N e em N após (A) radioterapia isolada, (B) radioterapia e IC₅₀ etoposido e (C) radioterapia e IC₇₅ etoposido. Os dados expressam a média e o erro padrão de três experiências independentes.

Recorrendo-se à marcação com PI, após tratamento combinado de radioterapia com etoposido (IC₅₀ e IC₇₅ das 48 horas do fármaco (Tabela IX)) obtiveram-se os resultados apresentados na Figura 32 e na Tabela XIII.

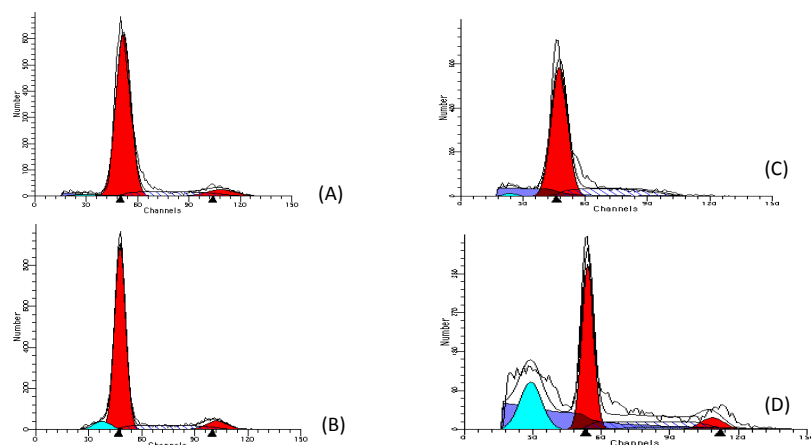


Figura 32 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo, para a linha celular A549. Exemplos de representações gráficas da população celular nas diferentes fases do ciclo celular (A) Controlo, (B) 30Gy, (C) IC₅₀ Etop, (D) IC₅₀ Etop + 30Gy.

Verificou-se que, quer na radioterapia isolada, quer combinada com o fármaco etoposido, a população de células da linha A549 encontra-se maioritariamente na fase G0/G1 do ciclo celular. Na combinação da radiação X com o IC₇₅ das 48h do etoposido verifica-se um aumento da fase pré-G0, considerado o pico pré-apoptótico, na condição de 30Gy, relativamente ao controlo (IC₇₅ Etop).

Tabela XIII Relação das condições de tratamento com a população de células em cada fase do ciclo celular na linha celular A549, para a radioterapia isolada e para a terapia combinada com etoposido, com médias e erros padrão obtidos por citometria de fluxo.

Linha celular A549				
	Pré-G0	G0/G1	S	G2/M
	média ± SE	média ± SE	média ± SE	média ± SE
C	3,50 ± 2,50	74,00 ± 6,00	18,50 ± 0,50	7,50 ± 6,50
0,5Gy	6,00 ± 1,00	75,50 ± 4,50	23,00 ± 3,00	1,50 ± 1,50
15Gy	8,67 ± 2,03	72,00 ± 4,04	19,00 ± 7,02	9,00 ± 5,20
30Gy	11,00 ± 5,51	77,33 ± 8,99	13,00 ± 9,07	9,67 ± 2,73
IC ₅₀ Etop	1,67 ± 0,33	70,33 ± 5,36	27,33 ± 8,17	2,67 ± 2,67
IC ₅₀ Etop+0,5Gy	5,67 ± 3,18	85,00 ± 4,73	12,00 ± 5,51	2,67 ± 1,76
IC ₅₀ Etop+15 Gy	6,33 ± 2,03	80,33 ± 6,01	16,67 ± 6,64	3,00 ± 1,73
IC ₅₀ Etop+30 Gy	2,00 ± 1,53	74,33 ± 6,17	23,00 ± 7,21	2,67 ± 2,19
IC ₇₅ Etop	6,00 ± 2,08	80,67 ± 7,26	18,00 ± 7,51	1,33 ± 0,88
IC ₇₅ Etop+0,5Gy	15,75 ± 11,12	80,75 ± 5,59	15,75 ± 5,88	3,50 ± 1,55
IC ₇₅ Etop+15 Gy	14,67 ± 7,62	87,33 ± 2,96	9,33 ± 2,03	3,33 ± 1,20
IC ₇₅ Etop+30 Gy	24,25 ± 8,01	73,25 ± 3,75	24,50 ± 5,12	2,50 ± 1,89

3.2.2. *Linha celular H1299*

Para a linha celular H1299 não foi possível ajustar os resultados obtidos por ensaio clonogénico ao modelo linear, uma vez que com na terapia combinada de RX com etoposido não se verificou formação de colónias desta linha celular após irradiação com 15Gy e 30Gy. Assim, verificou-se um efeito de potenciação desta terapia comparativamente à radioterapia isolada.

A avaliação e caracterização de morte celular demonstrou, em geral, um efeito antagonista, no entanto pouco notório, relativamente à radioterapia isolada (Figura 33).

Na combinação de RX com o IC₇₅ do etoposido não se verificaram diferenças entre as diferentes condições, não se verificando efeito adicional com a irradiação, independentemente da dose (Figura 33 (C)).

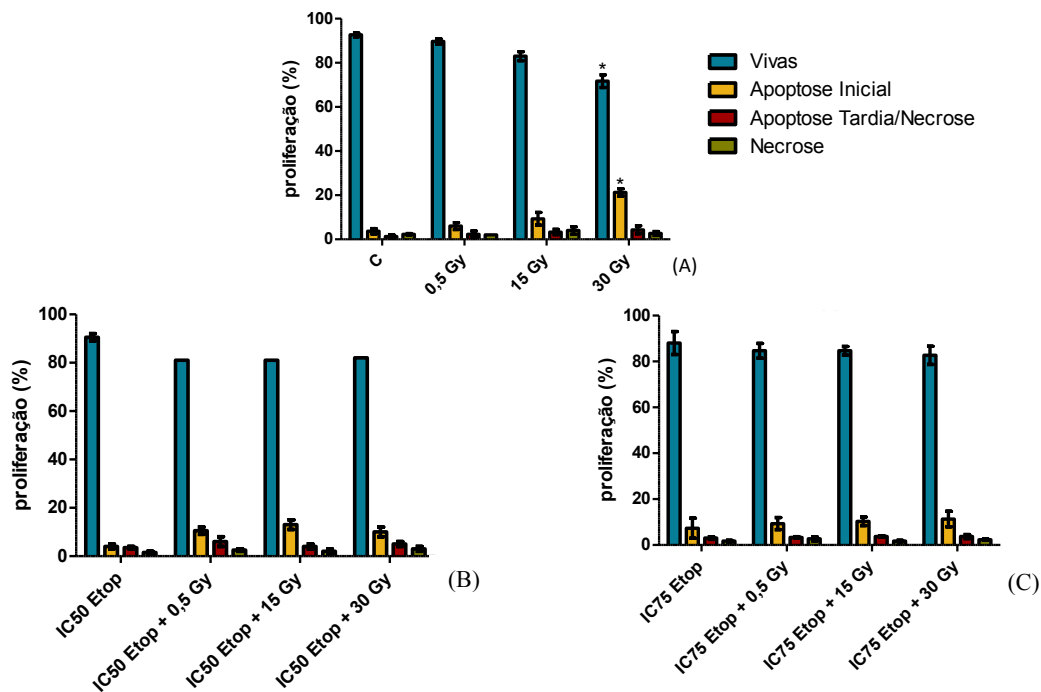


Figura 33 Viabilidade celular obtida por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação AV/PI, para a linha celular H1299. Representação gráfica da percentagem de células V, em AI, em AT/N e em N da linha celular após (A) radioterapia isolada, (B) radioterapia e IC₅₀ etoposido e (C) radioterapia e IC₇₅ etoposido. Os dados expressam a média e o erro padrão de três experiências independentes.

Nos que diz respeito à avaliação do ciclo celular verificou-se que, quando combinada a radiação com o IC₅₀ das 48h do etoposido, a maioria da população se encontrava na fase S do ciclo, havendo um aumento discreto de população em fase G2/M com o aumento da dose de radiação (Tabela XIV e Figura 34 (C) e (D)).

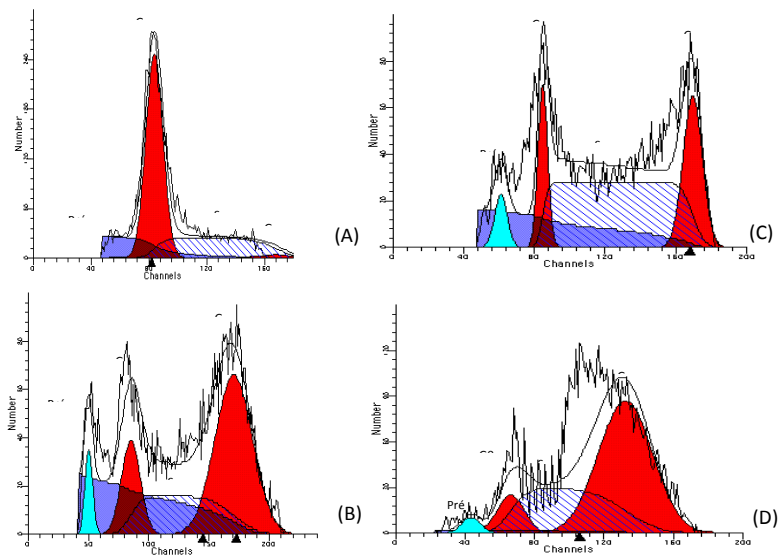


Figura 34 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo para a linha celular H1299. Exemplos de representações gráficas da população celular nas diferentes fases do ciclo celular (A) Controlo, (B) 30Gy, (C) IC₅₀ Etop, (D) IC₅₀ Etop + 30Gy.

Quando combinada a radiação com uma menor concentração deste fármaco (IC₇₅) verificou-se que na condição de controlo (IC₇₅ Etop) a maioria da população se encontrava na fase S. Já na condição de IC₇₅ Etop+0,5Gy verificou-se a existência de um balanço entre população na fase S e na fase G2/M, assim como na condição de IC₇₅ Etop+30Gy. Na condição de IC₇₅ Etop+15 Gy a maioria da população encontrava-se em fase S, embora ainda cerca de 30% da população se encontrasse na fase G2/M.

Tabela XIV Relação das condições de tratamento com a população de células em cada fase do ciclo celular na linha celular H1299, para a radioterapia isolada e para a terapia combinada com etoposido, com médias e erros padrão obtidos por citometria de fluxo.

Linha celular H1299				
	Pré-G0	G0/G1	S	G2/M
	média ± SE	média ± SE	média ± SE	média ± SE
C	3,67 ± 1,20	61,00 ± 2,65	33,67 ± 1,20	5,33 ± 1,76
0,5Gy	3,00 ± 0,00	62,00 ± 1,00	32,00 ± 1,00	5,50 ± 0,50
15Gy	9,00 ± 2,00	19,00 ± 8,00	24,50 ± 3,50	56,00 ± 5,00
30Gy	14,00 ± 6,03	8,00 ± 1,53	21,67 ± 5,46	70,00 ± 6,00
IC ₅₀ Etop	7,67 ± 4,26	14,00 ± 6,43	75,33 ± 1,20	12,33 ± 6,33
IC ₅₀ Etop+0,5 Gy	7,33 ± 2,03	9,67 ± 3,53	73,67 ± 6,64	12,67 ± 8,41
IC ₅₀ Etop+15 Gy	9,33 ± 4,33	8,33 ± 5,04	67,00 ± 7,51	24,67 ± 11,57
IC ₅₀ Etop+30 Gy	4,00 ± 1,00	7,50 ± 4,50	65,50 ± 8,50	27,00 ± 13,00
IC ₇₅ Etop	2,50 ± 0,50	9,50 ± 3,50	71,50 ± 9,50	19,00 ± 13,00
IC ₇₅ Etop+0,5 Gy	1	4	54	42
IC ₇₅ Etop+15 Gy	7,00 ± 3,00	6,00 ± 2,00	61,50 ± 9,50	32,50 ± 11,50
IC ₇₅ Etop+30 Gy	5	5	45	50

Em resposta a esta terapia a linha celular H1299 demonstrou novamente uma maior sensibilidade em relação à linha celular A549, quando avaliada a viabilidade celular por ensaio clonogênico.

Tal como para as anteriores terapias, verificou-se uma maior resistência ao tratamento a curto prazo (48 horas) pela linha celular H1299, comparativamente com a linha celular A549.

Quanto à avaliação do ciclo celular, verificou-se a paragem deste em diferentes fases nas duas linhas celulares. Esta terapia induziu paragem na fase G0/G1 na linha celular A549, enquanto na linha celular H1299 induziu paragem do ciclo celular na fase S.

V. Discussão

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo, sendo o CP um dos tipos de cancro mais frequentes (Jemal *et al.*, 2011). O CPNPC é o tipo de CP mais frequente e normalmente desenvolve resistência à radio e quimioterapia, sendo diagnosticado, na maioria dos casos, em estadios inoperáveis (Hsu, Kuo, Liu, & Lin, 2004). A baixa sensibilidade à radiação deste tipo de CP é uma das principais razões para o insucesso da radioterapia (Han *et al.*, 2009). O CPPC caracteriza-se por ser um tumor sensível à quimio e radioterapia, sendo, no entanto, geralmente fatal (Simon & Wagner, 2003). Apesar da aparente resposta inicial ao tratamento, este tipo de CP pode desenvolver metástases, mesmo que aparentemente localizado apenas no pulmão e gânglios linfáticos intratorácicos (Sher *et al.*, 2008; P. J. Smith, Wiltshire, Chin, Rabbitts, & Souès, 1999).

No tratamento do CP, geralmente recorre-se à combinação da radioterapia e quimioterapia, por forma a aumentar o controlo local do tumor, podendo em contrapartida, aumentar a citotoxicidade dos tecidos sãos envolventes. Por este motivo, são necessárias novas abordagens terapêuticas que resultem na radiosensibilização selectiva do tumor (Bepler *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2010). Assim, neste trabalho foram alvo de estudo tanto a radiação utilizada na radioterapia, os RX, bem como os citostáticos: cisplatina e etoposido, de modo a verificar os efeitos da radiação nas diferentes linhas celulares, quer isoladamente quer combinada com estes citostáticos.

Uma vez que os dois tipos de CP são diferentes, ao longo deste trabalho usamos linhas celulares de CPNPC (A549 e H1299) e também de CPPC (H69). A A549 é uma linha celular de CPNPC de tipo II, de células epiteliais alveolares basais e apresenta uma mutação no oncogene K-RAS (*v-Ki-ras Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*). A linha celular H1299 é também uma linha de CPNPC, de um gânglio linfático. Para além disso estas linhas diferem no gene *TP53*, sendo que a primeira tem

o gene normal, expressando normalmente a proteína p53, enquanto a segunda tem uma deleção homozigótica no gene, não expressando a proteína (Crescenzi *et al.*, 2006; Martinez-rivera & Siddik, 2012; Sak *et al.*, 2003; Stordal *et al.*, 2007). A linha celular H69 é uma linha de CPPC e difere das outras primeiramente quanto ao tipo de CP mas também na expressão da p53, sendo que esta linha apresenta uma mutação no gene *TP53* (R. a Davey, Locke, Hennes, Harvie, & Davey, 2004; Stordal & Davey, 2008).

O gene supressor tumoral representa um papel essencial na regulação da resposta ao stresse celular, em parte através da activação de outros genes envolvidos no controlo do ciclo celular, reparação de DNA e apoptose. Em resposta à irradiação, a proteína p53 pode ser fosforilada por cinases, cinases dependentes de ciclina e o produto protooncogene c-abl. Alterações no estado de fosforilação da p53 e interações proteína-proteína podem levar à regulação de genes com papéis na apoptose ou no ciclo celular (Hall, 2000) .

Os RX são uma radiação electromagnética de alta frequência, que apresenta energia suficiente para ionizar átomos ou moléculas com os quais interagem, designando-se por RI, que tem como principal alvo o DNA (Pawlik & Keyomarsi, 2004). Nos ensaios de radioterapia obtiveram-se diferentes respostas por parte das três linhas celulares, sendo que a linha H1299 se destacou pela maior radiorresistência a curto prazo (de 24 até 96 horas). Estando descrito que esta linha não expressa p53 (Martinez-rivera & Siddik, 2012; Sak *et al.*, 2003), as vias apoptóticas activadas por esta proteína poderão não estar a ser activadas, justificando assim a não observação de morte nesta linha celular após irradiação.

Os ensaios de radioterapia realizados na linha celular A549 revelaram um aumento da inibição da proliferação celular, quer por Alamar Blue[®] quer por citometria

de fluxo. No entanto, o aumento da inibição da proliferação verificado pelo ensaio de Alamar Blue[®] não é tão expressivo como o aumento verificado por citometria de fluxo. Tal poderá ser explicado pelo facto de este ensaio permitir apenas avaliar as alterações na actividade mitocondrial (Al-Nasiry, Geusens, Hanssens, Luyten, & Pijnenborg, 2007). Assim, uma célula em morte por AI poderá ainda possuir a mitocôndria activa, o que interfere com as alterações nos resultados. Por este motivo, este ensaio deve ser sempre complementado com outros ensaios que avaliem a proliferação ou viabilidade celular. Quanto ao tipo de morte associada, verificou-se que é, maioritariamente, por AI, o que é consistente com as características da morte induzida por RI, como são os RX (Han *et al.*, 2009; S.-yeon Lee, Choi, Wu, & Kim, 2008). A viabilidade celular foi verificada recorrendo ao ensaio clonogénico, considerado o ensaio “*gold standard*” para estudos que envolvam radiação (Anoopkumar-Dukie *et al.*, 2005). Com este ensaio verificou-se um aumento da inibição da sobrevivência celular com o aumento da dose de radiação, o que está de acordo com os restantes resultados obtidos. Ainda para esta linha celular, verificou-se uma paragem do ciclo celular na fase G0/G1 do ciclo celular, em todas as condições de estudo. A proteína supressora tumoral p53 é o regulador primário do *checkpoint* G1 (Fei & El-Deiry, 2003). A paragem do ciclo celular na fase G1 desencadeada pela RI ocorre principalmente através da transactivação da proteína p21^{Waf1} pela *wild-type* (WT) p53, o que inibe as cinases ciclina-dependentes da fase G1, mantém o complexo Rb/E2F e, conseqüentemente, evita a entrada da célula na fase S (Fei & El-Deiry, 2003). Assim, uma vez que a linha celular A549 expressa normalmente a proteína p53, a paragem do ciclo celular em G0/G1 é consistente com a acção desta proteína no *checkpoint* G1.

Na linha celular H1299 verificaram-se resultados distintos a curto (de 24 até 96 horas) e a longo prazo (12 dias). Esta linha celular revelou ser resistente à radioterapia

isolada a curto prazo, uma vez que não se verificaram diferenças significativas na inibição da proliferação nas diferentes condições em estudo, quer por citometria de fluxo que por Alamar Blue[®], verificando-se uma radiorresistência acentuada a curto prazo (48 horas). Já na avaliação da viabilidade celular por ensaio clonogénico observou-se uma radiosensibilidade elevada nesta linha celular, contrariamente ao observado nos ensaios de citometria de fluxo. Assim, os resultados obtidos pelos ensaios clonogénicos para a linha celular H1299 sugerem que a sensibilidade desta linha celular é tempo-dependente.

Uma vez que esta linha celular não expressa a proteína p53, as vias de morte dependentes desta proteína não podem ser activadas. Uma via apoptótica tempo-dependente é a via das caspases (Liang *et al.*, 2004).

A via das caspases é uma via independente da p53 sendo comumente designada como via extrínseca da activação da apoptose. Esta é iniciada pela ligação de um receptor de morte transmembranar da família do TNF do tipo 1, nomeadamente o Fas, também conhecido como antígeno apoptótico 1. Após a ligação, o receptor Fas forma microagregados na superfície celular, permitindo o recrutamento do adaptador molecular FADD (do inglês, *Fas-associated protein with death domain*). O FADD recruta a caspase-8 pela interação homofílica com o terminal N dos seus domínios efectores de morte (DEDs, do inglês *death effector domains*), formando um complexo de sinalização de indução de morte (DISC, do inglês *death-inducing signaling complex*). O sinal de morte é induzido através deste complexo, sendo que o ligando pode ser o TNF (Boatright & Salvesen, 2003).

Os danos provocados pela RI não são apenas aqueles verificados no DNA, como DSB e SSB, mas também, maioritariamente, por stresse oxidativo. Na avaliação do

ciclo celular da linha celular H1299 verificou-se uma paragem do ciclo celular na fase G0/G1 na condição de controlo e na condição de irradiação com 0,5Gy, havendo paragem do ciclo na fase G2/M com as doses de radiação de 15Gy e 30Gy. Assim, parece-nos que com uma irradiação de 0,5Gy os danos provocados nas células, provavelmente por stresse oxidativo, poderão ter sido reparados. Já com maiores doses parecem terem ocorrido danos no DNA, estando já documentado que células com alterações na proteína p53 não são capazes de atrasar o ciclo celular na fase G1 em resposta a danos no DNA, demonstrando ainda pouca morte por apoptose, tal como foi verificado por citometria de fluxo (P. J. Smith *et al.*, 1999).

Flatmark *et al.* em estudos com linhas celulares de cancro da mama verificaram que a paragem do ciclo celular na fase G2/M compreende a repressão do gene para a cinase *Polo-like1* (Plk1), *PLK*. O mecanismo de sinalização da activação do *checkpoint* G2 para danos no DNA é iniciado pela ATM (uma proteína essencial na activação dos *checkpoints* e tem um papel chave na iniciação da reparação das DSB), e envolve a inibição da actividade enzimática da Plk1 e subsequente atraso na activação da cinase de transição G2/M (DiPaola, 2002; Flatmark *et al.*, 2006). Uma vez que está descrito que a linha celular H1299 não expressa p53, as vias apoptóticas podem não ter sido activadas após danos no DNA, permitindo a sua síntese na fase S. No entanto, as células não tiveram a capacidade de se dividirem, podendo dever-se tal facto à alteração de genes necessários à activação do *checkpoint* G2.

Na linha celular H69 verificou-se um aumento da inibição celular com o aumento da dose, bem como com o aumento do tempo de incubação, tendo este aumento mais significado quando avaliado pelo método de exclusão de azul tripano. Estes resultados vão de encontro aos resultados obtidos por citometria de fluxo, nos

quais se verifica também um aumento da inibição da proliferação com o aumento da dose de radiação, bem como um aumento de morte celular por apoptose.

No que diz respeito à avaliação do ciclo celular, verificou-se que na condição de controlo e na condição de 0,5Gy de dose de radiação ocorreu paragem do ciclo celular na fase G0/G1, tal como para as restantes linhas celulares em estudo. Com uma dose de radiação mais elevada (15 e 30Gy) verificou-se uma paragem do ciclo celular na fase S. Tal como a linha celular H1299, esta linha celular não apresenta uma p53 normal e, assim, não é capaz de parar o ciclo celular na fase G0/G1 quando há danos no DNA (Fei & El-Deiry, 2003). Foi já descrito que a proteína Nbs1 (*Nibrin*), codificada pelo gene *NBS1*, é necessária para a activação do *checkpoint* S induzido pela RI. Assim, esta paragem na fase S do ciclo celular poderá estar relacionada com a activação desta proteína (B. Xu, Kim, Kastan, & Xu, 2001).

As diferenças de proliferação e morte entre as linhas celulares poderão explicar-se devido às diferenças na expressão da proteína p53 e respectivas vias de sinalização envolvidas. A proteína p53 foi identificada como supressora tumoral em 1979 (Kozlowski, 2003) e é codificada pelo gene *TP53*. Esta proteína actua principalmente como um activador transcripcional pela ligação a sequências específicas de DNA de genes alvo envolvidos numa série de funções biológicas, tais como paragem do ciclo celular, reparação de DNA, senescência, apoptose e inibição da angiogénese (Martinez-rivera & Siddik, 2012). Sobre condições de stresse, tal como danos no DNA, cinases específicas (ATM, ATR, Chk1 e Chk2) ficam activas e fosforilam *sites* alvo da p53, sendo que esta fosforilação força a dissociação da p53 do complexo *murine double minute 2* (Mdm2)-p53, complexo que leva à degradação da p53 (Kozlowski, 2003). A estabilização da p53 resultante e a sua translocação para o núcleo permite a ligação desta proteína como um tetrâmero específico para sequências de DNA, transactivando

genes alvo. Esta transactivação pela p53 revela-se crítica para as suas funções celulares, as quais incluem a paragem do ciclo celular para permitir a reparação de DNA e, se o dano não for reparado, activar vias de morte celular (Martinez-Rivera & Siddik, 2012; Mitchell *et al.*, 2010).

Entre as três linhas celulares, o que mais se destacou foi o pico de proliferação das 48 horas de incubação, tanto no Alamar Blue[®] como no azul tripano na linha H69, uma vez que demonstra um aumento ligeiro da proliferação que se segue de um aumento da inibição da proliferação. Assim, de modo a perceber este pico de proliferação, para os ensaios de terapia combinada apenas se realizaram ensaios de citometria de fluxo a este tempo de incubação.

A cisplatina é um citostático muito eficaz em algumas formas de cancro, inibindo o crescimento celular através da interferência com a transcrição e outras funções celulares mediadas pelo DNA, induzindo assim morte celular por apoptose. Este composto produz ligações cruzadas entre as cadeias de DNA inibindo, assim, a sua síntese. Esta inibição, por norma, ocorre na fase S do ciclo celular (Candelaria, Garcia-arias, Cetina, & Dueñas, 2006; Goodsell, 2006; Hall, 2000). A carboplatina, um análogo da cisplatina, liga-se igualmente à cadeia de DNA, interferindo assim com o mecanismo celular de reparação e, conseqüentemente, impedindo o crescimento do tumor pela paragem da divisão das células oncológicas (Candelaria *et al.*, 2006). O etoposido é comumente designado como um “veneno” da topoisomerase II, uma enzima essencial que altera a topologia do DNA. Na ausência desta enzima as células são incapazes de segregar cromossomas filhos, morrendo de insuficiência mitótica. O etoposido actua principalmente nas fases S e G2 do ciclo celular (Bromberg *et al.*, 2003).

Para avaliar o efeito anti-proliferativo dos diferentes fármacos, para posterior aplicação na terapia combinada, realizou-se o ensaio do Alamar Blue[®] nas três linhas celulares de CP, após incubação com os fármacos em estudo. De forma geral, verificou-se uma diminuição do IC₅₀ ao longo do tempo. Para a cisplatina verificou-se, em geral, uma maior sensibilidade na linha H69 e uma maior resistência na linha A549. Por outro lado, a linha A549 demonstrou ser a mais sensível à acção dos fármacos carboplatina e etoposido, revelando-se mais resistente a linha H1299 para estes fármacos. Contudo, na linha celular H69 verificou-se um aumento significativo ($p=0,011$) do valor do IC₅₀ das 48 para as 72 horas após incubação celular com etoposido. Tal facto poder-se-á dever a uma aquisição de quimiorresistência ao agente citostático ao longo do tempo. Blandino *et al.* realizaram estudos na linha celular H1299, transfectando p53 com diferentes mutações para esta linha, a qual não expressa esta proteína. As mutações verificadas na p53 induziram resistência ao etoposido, o que vai de encontro com resultados obtidos, uma vez que a linha celular H69 expressa p53 mutada (Blandino, Levine, & Oren, 1999). Martinez-Rivera *et al.* efectuaram um estudo semelhante, no qual transfectaram duas mutações diferentes da p53, verificando que com uma delas (p53-R175H) se induziu resistência a este mesmo fármaco (Martinez-Rivera & Siddik, 2012).

Após a determinação do IC₅₀ dos diferentes fármacos com incubação de 48 horas, combinou-se a acção da cisplatina e do etoposido com a radioterapia.

Na linha celular A549 verificou-se através dos ensaios clonogénicos que houve um efeito antagonista quando utilizada a combinação de cisplatina com RX comparativamente à radioterapia isolada.

Através da citometria de fluxo, a curto prazo (48 horas), não se verificaram diferenças significativas entre as diferentes terapias. Vários estudos demonstraram que

se verifica resistência a uma grande variedade de fármacos, incluindo a cisplatina, em linhas celulares com p53 normal (*WT*) (Crescenzi *et al.*, 2006; Martinez-rivera & Siddik, 2012). Assim, os efeitos observados poderão ser devidos, em grande parte, à acção da radioterapia, não se verificando efeitos adicionais com a combinação da cisplatina. A cisplatina actua induzindo apoptose celular, sendo tal facto comprovado pelos resultados obtidos através deste ensaio. No controlo da terapia combinada, que consiste na concentração correspondente ao IC_{50} ou ao IC_{75} das 48 horas calculado para a incubação deste fármaco, verificou-se que este não só inibe a proliferação como induz morte celular por apoptose. Ainda nesta linha celular, a avaliação do ciclo celular revelou que houve paragem do ciclo na fase G0/G1 em todas as condições (Tabelas X e XI), revelando que houve paragem no *checkpoint* tardio desta fase G1, de modo a permitir a reparação dos danos no DNA, tal como se verificou com a radioterapia isolada.

Na linha celular H1299 verificou-se, a longo prazo (12 dias), um efeito de potenciação relativamente à radioterapia isolada quando combinada com o IC_{50} da cisplatina. Já com uma menor concentração verificou-se um efeito semelhante ao observado com a radioterapia isolada. A curto prazo (48 horas), recorrendo à citometria de fluxo, não se verificaram diferenças significativas entre as diferentes terapias, verificando-se uma viabilidade celular elevada em todos os casos. Gorodetsky *et al.* verificaram também que com uma dose superior a 2Gy a combinação com a cisplatina não surtiu diferenças relativamente ao tratamento de radioterapia isolada, o que implica que o efeito adicional deste fármaco foi completamente eliminado (Gorodetsky, Levy-Agababa, Mou, & Vexler, 1998).

Na avaliação do ciclo celular verificou-se que na terapia combinada de cisplatina com RX, houve uma paragem do ciclo celular na fase S. Crescenzi *et al.* realizaram um

estudo com a linha H1299, no qual verificaram que a administração de cisplatina a estas células causou uma acumulação da população celular na fase S, o que corrobora os resultados obtidos por citometria de fluxo no controlo (IC₅₀ Cis ou IC₇₅ Cis) desta linha celular (Crescenzi *et al.*, 2006).

Por último, na linha celular de CPPC (H69), verificou-se que, tal como na linha celular A549, a terapia combinada com cisplatina induziu um efeito antagónico a longo prazo, comparativamente (7dias) à radioterapia isolada. Já na avaliação a curto prazo (48 horas), verificou-se um efeito de potenciação quando utilizada uma concentração mais elevada, não havendo efeitos adicionais significativos quando utilizada uma concentração menor deste fármaco. Na avaliação do ciclo celular, tal como na linha celular H1299, verificou-se uma paragem na fase S em todas as condições. Assim, pressupõe-se que esta paragem seja, maioritariamente, devida à acção da cisplatina no ciclo celular (Crescenzi *et al.*, 2006).

A terapia combinada de etoposido com RX foi apenas realizada nas linhas celulares de CPNPC. Assim, na linha celular A549 verificou-se um efeito semelhante ao efeito verificado na radioterapia isolada quando se utilizou a combinação de uma baixa concentração de etoposido com as diferentes doses de RX (0,5Gy, 15Gy e 30Gy). Contrariamente, quando combinada uma concentração mais elevada deste fármaco com RX verificou-se um efeito de potenciação relativamente à utilização de RX. Na avaliação do ciclo celular não se verificaram diferenças relativamente às restantes terapias, revelando-se uma paragem do ciclo celular na fase G₀/G₁, consistente com a acção da proteína p53 que, nesta linha celular, é expressa normalmente (Fei & El-Deiry, 2003).

Na linha celular H1299 verificou-se um efeito de potenciação a longo prazo relativamente aos RX quando combinado este com o fármaco etoposido. A curto prazo, verificou-se não haver qualquer efeito adicional com a utilização deste fármaco, quer com a concentração mais alta utilizada quer com a concentração mais baixa. A avaliação do ciclo celular revelou uma paragem na fase S, tal como na combinação com a cisplatina. Esta paragem na fase de síntese na linha H1299 poderá ser explicada pelo mecanismo de acção do etoposido. Este fármaco, inibindo a topoisomerase II, vai impedir a segregação de cromossomas filhos (Bromberg *et al.*, 2003).

Uma vez que quer a RI, quer a cisplatina ou o etoposido actuam a nível do DNA, o tempo de exposição a este fármaco poderá não ter sido suficiente para este surtir os efeitos esperados. Assim, deveria ter-se administrado os fármacos com o tempo necessário destes actuarem a nível do ciclo celular, por exemplo, de modo a amplificar os efeitos esperados.

VI. Conclusão e Perspectivas Futuras

Através deste estudo, cujo objectivo geral foi investigar os efeitos da radiação no CP, os resultados obtidos com o ensaio de Alamar Blue[®] realizado em três linhas celulares deste tipo de cancro revelaram uma diminuição da proliferação celular após irradiação com diferentes doses, sendo que, como seria de esperar, as doses mais eficazes revelaram ser as de 15Gy e 30Gy, em todas as linhas celulares em estudo. Revelaram ainda que com a menor dose de radiação em estudo as células respondem de modo semelhante às células da condição de controlo, havendo inibição da proliferação e posterior recuperação.

Os resultados obtidos com recurso à citometria de fluxo, após irradiação, permitiram-nos observar uma diminuição da viabilidade celular com o aumento da dose e, conseqüentemente, aumento da morte celular, maioritariamente por apoptose inicial, em duas linhas em estudo, A549 e H69, sendo que na terceira linha celular em estudo, H1299, os resultados sugerem-nos que esta linha apresenta resistência aos RX.

Com o objectivo de compreender a existência de efeitos sinérgicos ou antagónicos quando combinamos a terapia com radiação e citostáticos, os estudos de citometria de fluxo realizados sugerem que, em geral, há um efeito sinérgico na terapia com cisplatina, nas linhas A549 e H69, verificando-se um efeito pouco evidente na linha celular H1299 relativamente à terapia isolada. Na terapia combinada com etoposido os resultados não nos parecem surtir qualquer efeito, relativamente à terapia isolada.

Com estes resultados verificou-se que a resposta a diferentes tratamentos poderá depender da diferente expressão de proteínas intracelulares, bem como o seu envolvimento nas diferentes vias de sinalização e de morte. Sendo que estas diferenças

influenciam o tratamento deste cancro, é de todo o interesse continuar a estudar o seu comportamento *in vitro* e também *in vivo*, de modo a optimizá-lo.

No seguimento destes estudos, julgamos pertinente realizar estudos complementares ao AlamarBlue[®], como por exemplo o ensaio de Sulforodamina B (SRB) que permite avaliar a síntese proteica, bem como estudos de citometria de fluxo com a finalidade de avaliar as moléculas intracelulares, tais como bax e bcl-2, e stresse oxidativo, DHE (Dihidroetídio), GSH e DCF (2'-7'-diclorofluoresceína), de modo a melhor compreender as diferentes respostas à terapia por parte das três linhas celulares. Será ainda pertinente realizarem-se estudos para avaliar a expressão da proteína p53 por *Western Blot*, bem como a realização do ensaio cometa, de modo a verificar a existência ou inexistência de danos no DNA após irradiação das diferentes linhas celulares.

Especificamente para a linha celular H1299 e uma vez que se obtiveram resultados contraditórios, futuramente propomos a realização do estudo do proteosoma, de modo a compreender que proteínas apoptóticas se estão a libertar e de que modo influência a resposta a diferentes tratamentos.

VII. Bibliografia

- Aichinger, H., Dierker, J., Joite-Barfuß, S., & Säbel, M. (2012). Production and Measurement of X-Rays. *RADIATION EXPOSURE AND IMAGE QUALITY IN X-RAY DIAGNOSTIC RADIOLOGY* (pp. 13-20). Retrieved from <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-2922&Template=cellBiology>
- Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C. and, & Pijnenborg, R. (2007). The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human reproduction (Oxford, England)*, 22(5), 1304-9. doi:10.1093/humrep/dem011
- American Cancer Society. (2011). *Cancer Facts & Figures*. American Cancer Society (pp. 1-58).
- Anoopkumar-Dukie, S., Carey, J. B., Conere, T., O'sullivan, E., van Pelt, F. N., & Allshire, a. (2005). Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *The British journal of radiology*, 78(934), 945-7. doi:10.1259/bjr/54004230
- Banfi, A. (1988). Principles of radiotherapy. In G. Bonnadona & R. della C. G (Eds.), *Handbook of medical oncology* (pp. 191-196).
- Barreiros, A. L. B. S., & David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reactivas e defesa do organismo, 29(1), 113-123.
- Bartek, Jiri, & Lukas, J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 738-747.
- Beau-Faller, M., Gaub, M. P., Schneider, A., Guérin, E., Meyer, N., Ducrocq, X., Massard, G., et al. (2003). Allelic imbalance at loci containing FGFR, FGF, c-Met and HGF candidate genes in non-small cell lung cancer sub-types, implication for progression. *European Journal of Cancer*, 39(17), 2538-2547. doi:10.1016/S0959-8049(03)00623-3
- Begg, A. C., Stewart, F. a, & Vens, C. (2011). Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nature reviews. Cancer*, 11(4), 239-53. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nrc3007
- Belka, C., Schmid, B., Marini, P., Durand, E., Rudner, J., Faltin, H., Bamberg, M., et al. (2001). Sensitization of resistant lymphoma cells to irradiation-induced apoptosis by the death ligand TRAIL. *Oncogene*, 20(17), 2190-6. doi:10.1038/sj.onc.1204318
- Bepler, G., Blum, M. G., Chang, A., Cheney, R. T., Chirieac, L. R., Amico, T. A. D., Demmy, T. L., et al. (2010). Non – Small Cell Lung Cancer Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Oncologist, The*, 8(7), 740-801.
- Bernier, J., Hall, E. J., & Giaccia, A. (2004). Radiation oncology: a century of achievements. *Nature reviews. Cancer*, 4(9), 737-47. doi:10.1038/nrc1451
- Bitomsky, N., & Hofmann, T. G. (2009). Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling - roles of p53, p73 and HIPK2. *The FEBS journal*, 276(21), 6074-83. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07331.x

- Blandino, G., Levine, A. J., & Oren, M. (1999). Mutant p53 gain of function : differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Molecular Cell*.
- Boatright, K. M., & Salvesen, G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6), 725-731. doi:10.1016/j.ceb.2003.10.009
- Brady, L. W. (2011). *Advances in Radiation Oncology in Lung Cancer*. (J. Branislav, Ed.) *Radiation Oncology* (Second Edi.). Springer.
- Breen, L., Murphy, L., Keenan, J., & Clynes, M. (2008). Toxicology in Vitro Development of taxane resistance in a panel of human lung cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*, 22, 1234-1241. doi:10.1016/j.tiv.2008.04.005
- Bromberg, K. D., Burgin, A. B., & Osheroff, N. (2003). A Two-drug Model for Etoposide Action against Human Topoisomerase II. *Biochemistry*, 278(9), 7406-7412. doi:10.1074/jbc.M212056200
- Brown, M., & Wittwer, C. (2000). Flow Cytometry : Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry*, 8, 1221-1229.
- Candelaria, M., Garcia-arias, A., Cetina, L., & Dueñas-, A. (2006). Radiosensitizers in cervical cancer . Cisplatin and beyond. *Radiation Oncology*, 17, 1-17. doi:10.1186/1748-717X-1-15
- Carvalho, H. de A. (2002). Radioterapia no câncer de pulmão. *J Pneumol*, 28(6), 345-350.
- Ceresoli, G. L. (2012). FDG PET/CT metabolic tumour volume in small-cell lung cancer: better staging and prognostic stratification for an improved therapeutic strategy. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 39(6), 921-4. doi:10.1007/s00259-012-2094-z
- Chen, N., & Karantza-Wadsworth, V. (2009). Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(9), 1516-23. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.12.013
- Crescenzi, E., Chiaviello, A., Canti, G., Reddi, E., Veneziani, B. M., & Palumbo, G. (2006). Low doses of cisplatin or gemcitabine plus Photofrin/photodynamic therapy: Disjointed cell cycle phase-related activity accounts for synergistic outcome in metastatic non-small cell lung cancer cells (H1299). *Molecular cancer therapeutics*, 5(3), 776-85. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0425
- Crinò, L., Weder, W., van Meerbeeck, J., & Felip, E. (2010). Early stage and locally advanced (non-metastatic) non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 21 Suppl 5(Supplement 5), v103-15. doi:10.1093/annonc/mdq207
- Dal, C. (2008). alamarBlue ® Cell Viability Reagent. *Cell*, 1-10.
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-19. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744432>

- Daniel, P. T., Wieder, T., Sturm, I., & Schulze-Osthoff, K. (2001). The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 15(7), 1022-32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11455969>
- Davey, R. a, Locke, V. L., Hennes, S., Harvie, R. M., & Davey, M. W. (2004). Cellular models of drug- and radiation-resistant small cell lung cancer. *Anticancer research*, 24(2A), 465-71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15152945>
- DeVita, V. T., & Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer research*, 68(21), 8643-53. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6611
- Deng, C.-X. (2006). BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic acids research*, 34(5), 1416-26. doi:10.1093/nar/gkl010
- Desai, S. R. (2007). *Contemporary Issues in Cancer Imaging: A Multidisciplinary Approach*. (R. Reznik & J. Husband, Eds.) *Consultant*. Cambridge University Press.
- Dipaola, R. S. (2002). To Arrest or Not To G 2 -M Cell-Cycle Arrest : Commentary re : A . K . Tyagi et al ., Silibinin Strongly Synergizes Human Prostate Carcinoma DU145 Cells to Doxorubicin-induced Res ., 8 : 3512 – 3519 , 2002 . To Arrest or Not To G 2 -M Cell-Cycle Arrest. *Clinical Cancer Research*, 8, 3311-3314.
- Du, C., Gao, Z., Kalen, A. L., Chaudhuri, L., & Cullen, J. J. (2010). NIH Public Access. *October*, 8(20), 1962-1971.
- Duarte, R. L. de M., & Paschoal, M. E. M. (2005). Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. *J Bras Pneumol*, 32(1), 56-65.
- Edwards, B. K., Brown, M. L., Wingo, P. A., Howe, H. L., Ward, E., Ries, L. A. G., Schrag, D., et al. (2005). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(19), 1407-27. doi:10.1093/jnci/dji289
- Ettinger, D. S., Akerley, W., Borghaei, H., Chang, A., Cheney, R. T., & Chirieac, L. R. (2012). *NCCN Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Small Cell Lung Cancer*.
- Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R. G., Bartek, J., & Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, 410(6830), 842-7. doi:10.1038/35071124
- Fei, P., & El-Deiry, W. S. (2003). P53 and radiation responses. *Oncogene*, 22(37), 5774-83. doi:10.1038/sj.onc.1206677
- Ferreiro, C. (2007). *Lung Cancer*. (Edward Alcamo, Ed.) *Lung Cancer*. Chelsea House.
- Flatmark, K., Nome, R. V., Folkvord, S., Bratland, A., Rasmussen, H., Ellefsen, M. S., Fodstad, Ø., et al. (2006). Radiosensitization of colorectal carcinoma cell lines by histone deacetylase inhibition. *Radiation oncology (London, England)*, 1, 25. doi:10.1186/1748-717X-1-25
- Formenti, S. C., & Demaria, S. (2009). Systemic effects of local radiotherapy. *Review Literature And Arts Of The Americas*, 10(July). doi:10.1016/S1470-2045(09)70082-8

- 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), 2315-9. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nprot.2006.339
- Gazda, M. J., & Coia, L. R. (1995). *Principles of radiation therapy. Cancer Management* (9th ed., Vol. 10, pp. 129-34). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22089022>
- Gewies, A. (2003). Introduction to Apoptosis. *ApoReview*, 1-26.
- Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences*, 32(1), 37-43. doi:10.1016/j.tibs.2006.11.001
- Goodsell, D. S. (2006). Cancer Biology The Molecular Perspective: Cisplatin. *Chemical Reviews*, 316-317.
- Gorodetsky, R., Levy-Agababa, F., Mou, X., & Vexler, a M. (1998). Combination of cisplatin and radiation in cell culture: effect of duration of exposure to drug and timing of irradiation. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 75(4), 635-42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466668>
- Grivicich, I., Regner, A., & Rocha, A. B. (2007). Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53(3), 335-343.
- Gudkov, A. V., & Komarova, E. A. (2010). Radioprotection : smart games with death, 120(7). doi:10.1172/JCI43794.2270
- Hall, E. J. (2000). *Radiobiology for the Radiologist* (Fifth Edit.). Lippicott Williams & Wilkins.
- Han, Y., Wang, Y., Xu, H.-T., Yang, L.-H., Wei, Q., Liu, Y., Zhang, Y., et al. (2009). X-radiation induces non-small-cell lung cancer apoptosis by upregulation of Axin expression. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 75(2), 518-26. doi:10.1016/j.ijrobp.2009.05.040
- Hande, K. R. (1998). Clinical Oncology Update Etoposide : Four Decades of Development of a Topoisomerase II Inhibitor. *Science*, 34(10), 1514-1521.
- Herrmann, M. K. a, Bloch, E., Overbeck, T., Koerber, W., Wolff, H. a, Hille, a, Vorwerk, H., et al. (2011). Mediastinal radiotherapy after multidrug chemotherapy and prophylactic cranial irradiation in patients with SCLC--treatment results after long-term follow-up and literature overview. *Cancer radiothérapie : journal de la Société française de radiothérapie oncologique*, 15(2), 81-8. Elsevier Masson SAS. doi:10.1016/j.canrad.2010.03.017
- Hou, X.-M., Zhang, X.-H., Wei, K.-J., Ji, C., Dou, S.-X., Wang, W.-C., Li, M., et al. (2009). Cisplatin induces loop structures and condensation of single DNA molecules. *Nucleic acids research*, 37(5), 1400-10. doi:10.1093/nar/gkn933
- Howlander N, Noone A, K. M. (2011). *SEER Cancer Statistics Review 1975-2009. National Cancer Institute*. Retrieved from http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/index.html
- Hsu, Y.-L., Kuo, P.-L., Liu, C.-F., & Lin, C.-C. (2004). Acacetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Cancer letters*, 212(1), 53-60. doi:10.1016/j.canlet.2004.02.019

- Invitrogen Corporation. (1996). alamarBlue® Assay.
- Jemal, A., Bray, F., & Ferlay, J. (2011). Global Cancer Statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69-90. doi:10.3322/caac.20107. Available
- Kalemkerian, G. P., Akerley, W., Bogner, P., & Borghaei, H. (2012). NCCN Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Small Cell Lung Cancer. *Cancer*.
- Kastan, M. B., & Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015), 316-23. doi:10.1038/nature03097
- Katz, D., Ito, E., & Liu, F.-F. (2009). On the path to seeking novel radiosensitizers. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 73(4), 988-96. doi:10.1016/j.ijrobp.2008.12.002
- Kozlowski, J. M. (2003). THE p53 TUMOR SUPPRESSOR GENE AND NUCLEAR PROTEIN : BASIC SCIENCE REVIEW AND RELEVANCE IN THE MANAGEMENT OF BLADDER CANCER. *The Journal of Urology*, 169(April), 1219-1228. doi:10.1097/01.ju.0000056085.58221.80
- Kvols, L. K. (2005). Radiation sensitizers: a selective review of molecules targeting DNA and non-DNA targets. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 46 Suppl 1, 187S-90S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15653668>
- Le Chevalier, T., Arriagada, R., Le Péchoux, C., Dunant, A., & Pignon, J. P. (2004). Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients with Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *The new england journal of medicine*, 350(4), 351-360.
- Lee, J., Park, J. O., Kim, W. S., Park, S. H., Park, K. W., Choi, M. S., Lee, J. H., et al. (2004). Phase II study of doxorubicin and cisplatin in patients with metastatic hepatocellular carcinoma. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 54(5), 385-90. doi:10.1007/s00280-004-0837-7
- Lee, S.-yeon, Choi, M.-kyung, Wu, H.-gyun, & Kim, J. H. (2008). Differential Expressions of Apoptosis-related Genes in Lung Cancer Cell Lines Determine the Responsiveness to Ionizing Radiation. *Genomics*, 6(March), 36-43.
- Lewanski, C. R., & Gullick, W. J. (2001). Radiotherapy and cellular signalling. *The lancet oncology*, 2(6), 366-70. doi:10.1016/S1470-2045(00)00391-0
- Liang, H., Salinas, R. A., Leal, B. Z., Kosakowska-Cholody, T., Michejda, C. J., Waters, S. J., Herman, T. S., et al. (2004). Caspase-mediated apoptosis and caspase-independent cell death induced by irifolven in prostate cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 3(11), 1385-96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15542777>
- Lukas, Jiri, Lukas, C., & Bartek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA repair*, 3(8-9), 997-1007. doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.006
- Lum, J. J., DeBerardinis, R. J., & Thompson, C. B. (2005). Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(6), 439-48. doi:10.1038/nrm1660

- Mann, J. (2002). Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future, 2(February), 3-8.
- Martinez-rivera, M., & Siddik, Z. H. (2012). Resistance and gain-of-resistance phenotypes in cancers harboring wild-type. *Biochemical Pharmacology*, 83(8), 1049-1062. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.bcp.2011.12.026
- Meléndez, A., & Levine, B. (2009). Autophagy in *C. elegans*. *Autophagy*, 1-26. doi:10.1895/wormbook.1.147.1
- Mitchell, J. B., Choudhuri, R., Fabre, K., Sowers, A. L., Citrin, D., Zabludoff, S. D., & Cook, J. a. (2010). In vitro and in vivo radiation sensitization of human tumor cells by a novel checkpoint kinase inhibitor, AZD7762. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(7), 2076-84. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-3277
- Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., & Adjei, A. A. (2008). Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clinic Proceedings*, 83(May), 584-594.
- Molinari, M., Mercurio, C., Dominguez, J., Goubin, F., & Draetta, G. F. (2000). Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Reports*, 1(1), 71-79. doi:10.1093/embo-reports/kvd018
- Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, 116(2), 221-34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744433>
- Nome, R. V., Bratland, A., Harman, G., Fodstad, O., Andersson, Y., & Ree, A. H. (2005). Cell cycle checkpoint signaling involved in histone deacetylase inhibition and radiation-induced cell death. *Molecular cancer therapeutics*, 4(8), 1231-8. doi:10.1158/1535-7163.MCT-04-0304
- Pawlik, T. M., & Keyomarsi, K. (2004). Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 59(4), 928-42. doi:10.1016/j.ijrobp.2004.03.005
- Pazdur, R., Coia, L., & Hoskins, W. J. (2009). *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach* (12th ed.).
- Perrot, S. (2003). Resazurin Metabolism Assay Is a New Sensitive Alternative Test in Isolated Pig Cornea. *Toxicological Sciences*, 72(1), 122-129. doi:10.1093/toxsci/kfg014
- Pharmaceuticals, G. (1998). Etoposide Injection.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2011). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med*, 49(11), 1603-1616. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.Oxidative
- Ross, G. M. (1999). Induction of cell death by radiotherapy. *Endocrine-related cancer*, 6(1), 41-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10732785>
- Roth, J.A., Hong, W. K. & Cox, J.-D. (2008). *Lung Cancer*. (J. A. Roth, W. K. & Hong, & J.-D. Cox, Eds.)*Medical Oncology* (third edit.). Blackwell.

- Rupnarain, C., Dlamini, Z., Naicker, S., & Bhoola, K. (2004). Colon cancer: genomics and apoptotic events. *Biological chemistry*, 385(6), 449-64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15255176>
- Sak, A., Wurm, R., Elo, B., Grehl, S., Pöttgen, C., Stüben, G., Sinn, B., et al. (2003). Increased radiation-induced apoptosis and altered cell cycle progression of human lung cancer cell lines by antisense oligodeoxynucleotides targeting p53 and p21(WAF1/CIP1). *Cancer gene therapy*, 10(12), 926-34. doi:10.1038/sj.cgt.7700649
- Saraste, A., & Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular research*, 45(3), 528-37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10728374>
- Sato, M., Shames, D. S., Gazdar, A. F., & Minna, J. D. (2007). A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 2(4), 327-43. doi:10.1097/01.JTO.0000263718.69320.4c
- Saunders, M., Dische, S., Barrett, a, Harvey, a, Gibson, D., & Parmar, M. (1997). Continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy (CHART) versus conventional radiotherapy in non-small-cell lung cancer: a randomised multicentre trial. CHART Steering Committee. *Lancet*, 350(9072), 161-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9250182>
- Saúde, M. da. (2009). Recomendações nacionais para diagnóstico e tratamento do cancro do pulmão.
- Schmid, K., Kuwert, T., & Drexler, H. (2010). Radon in indoor spaces: an underestimated risk factor for lung cancer in environmental medicine. *Deutsches Ärzteblatt international*, 107(11), 181-6. doi:10.3238/arztebl.2010.0181
- Shackelford, R. E., Kaufmann, W. K., & Paules, R. S. (1999). Cell Cycle Control , Checkpoint Mechanisms , and Genotoxic Stress Biology of the Cell Cycle. *Environmental Health*, 107(February), 5-24.
- Sher, T., Dy, G. K., & Adjei, A. A. (2008). Small Cell Lung Cancer. *Medical Education*, 83(March), 355-367.
- Shimizu, K., Nakata, M., Maeda, A., Yukawa, T., Hiram, Y., Tanemoto, K., & Oka, M. (2010). Induction chemoradiation therapy with cisplatin plus irinotecan followed by surgical resection for superior sulcus tumor. *Annals of thoracic and cardiovascular surgery : official journal of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia*, 16(5), 326-30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21030918>
- Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), 7265-79. doi:10.1038/sj.onc.1206933
- Simon, G. R., & Wagner, H. (2003). Small Cell Lung Cancer. *Chest*, 123. doi:10.1378/chest.123.1
- Slotman, B., Faivre-Finn, C., Kramer, G., Rankin, E., Snee, M., Hatton, M., Postmus, P., et al. (2007). Prophylactic Cranial Irradiation in Extensive Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 664-672.

- Smith, M. L., Ford, J. M., Hollander, M. C., Bortnick, R. A., Amundson, S. A., Seo, Y. R., Deng, C.-xia, et al. (2000). p53-Mediated DNA Repair Responses to UV Radiation : Studies of Mouse Cells Lacking p53 , p21 , and / or gadd45 Genes p53-Mediated DNA Repair Responses to UV Radiation : Studies of Mouse Cells Lacking p53 , p21 , and / or gadd45 Genes. *Society*. doi:10.1128/MCB.20.10.3705-3714.2000.Updated
- Smith, P. J., Wiltshire, M., Chin, S. F., Rabbitts, P., & Souès, S. (1999). Cell cycle checkpoint evasion and protracted cell cycle arrest in X-irradiated small-cell lung carcinoma cells. *International journal of radiation biology*, 75(9), 1137-47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10528922>
- Stage, I., Evidence-based, S. I. I. A., Scott, W. J., Howington, J., Feigenberg, S., Movsas, B., & Pisters, K. (2007). Treatment of Non-small Cell Lung Cancer Stage I and Stage II *. *Chest*. doi:10.1378/chest.07-1378
- Stordal, B., & Davey, R. (2008). ERCC1 expression and RAD51B activity correlate with cell cycle response to platinum drug treatment not DNA repair. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 63(4), 661-72. doi:10.1007/s00280-008-0783-x
- Stordal, B., Pavlakis, N., & Davey, R. (2007). A systematic review of platinum and taxane resistance from bench to clinic : An inverse relationship. *Cancer Research*, 688-703. doi:10.1016/j.ctrv.2007.07.013
- Strother, D., Ashley, D., Kellie, S. J., Patel, a, Jones-Wallace, D., Thompson, S., Heideman, R., et al. (2001). Feasibility of four consecutive high-dose chemotherapy cycles with stem-cell rescue for patients with newly diagnosed medulloblastoma or supratentorial primitive neuroectodermal tumor after craniospinal radiotherapy: results of a collaborative study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19(10), 2696-704. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11352962>
- Tanaka, T., Munshi, A., Brooks, C., Liu, J., Hobbs, M. L., & Meyn, R. E. (2008). Gefitinib Radiosensitizes Non – Small Cell Lung Cancer Cells by Suppressing Cellular DNA Repair Capacity by Suppressing Cellular DNA Repair Capacity. *Clinical Cancer Research*, 1266-1273. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1606
- Taylor, W. R., & Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20(15), 1803-15. doi:10.1038/sj.onc.1204252
- Turner, M. C., Krewski, D., Chen, Y., Pope, C. A., Gapstur, S., & Thun, M. J. (2011). Radon and lung cancer in the American Cancer Society cohort. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 20(3), 438-48. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-1153
- Ushio-fukai, M., & Nakamura, Y. (2008). Reactive oxygen species and angiogenesis : NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Letters*, 266, 37-52. doi:10.1016/j.canlet.2008.02.044
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001

- Verheij, M. (2008). Clinical biomarkers and imaging for radiotherapy-induced cell death. *Cancer metastasis reviews*, 27(3), 471-80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18470482>
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36(3), 131-49. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12814430>
- Vieira, S. C. (2006). Radicais oxidantes: *Química*, 66-71.
- Wahl, G. M., & Carr, A. M. (2001). The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nature cell biology*, 3(12), E277-86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781586>
- Wang, J., & Yi, J. (2008). Cancer cell killing via ROS. *Cancer Biology & Therapy*, (December), 1875-1884.
- Weisenthal, L. M., Marsden, J. A., Dill, P. L., & 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*.
- Xu, B., Kim, S.-tae, Kastan, M. B., & Xu, B. O. (2001). Involvement of Brca1 in S-Phase and G 2 -Phase Checkpoints after Ionizing Irradiation Involvement of Brca1 in S-Phase and G 2 -Phase Checkpoints after Ionizing Irradiation. *Society*, 21(10), 3445-3450. doi:10.1128/MCB.21.10.3445
- Yin, E., Nelson, D. O., Coleman, M. A., Peterson, L. E., & Wyrobek, A. J. (2003). Gene expression changes in mouse brain after exposure to low-dose ionizing radiation. *International journal of radiation biology*, 79(10), 759-75. Informa UK Ltd UK. doi:10.1080/09553000310001610961
- Zhou, B.-bing S., & Elledge, S. J. (2000). checkpoints in perspective. *Nature*, 408(November), 433-439.
- Ziegler, U., & Groscurth, P. (2004). Morphological features of cell death. *News in physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 19, 124-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15143207>

Páginas Web consultadas:

- ATCC.. LGC: Advanced Catalogue Search, H1299. Retrieved April 13, 2012, a from <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-5803&Template=cellBiology>
- ATCC.. LGC: Advanced Catalogue Search, H69. Retrieved April 13, 2012, b from <http://www.lgcstandards->

atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HTB-119&Template=cellBiology

ATCC. LGC: Advanced Catalogue Search, A549. Retrieved April 13, 2012, c from <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CCL-185&Template=cellBiology>

The PubChem Project. Retrieved December 18, 2011, from <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

VIII. Anexos

1. Classificação TNM

T primary tumor

TX: Primary tumor cannot be assessed, or tumor proven by the presence of malignant cells in sputum or bronchial washings, but not visualized by imaging or bronchoscopy

T0: No evidence of primary tumor

Tis: Carcinoma in situ

T1: Tumor 3cm or less in greatest dimension, surrounded by lung or visceral pleura, without bronchoscopic evidence of invasion more proximal than the lobar bronchus (ie, not in the main bronchus)

T1a: Tumor 2cm or less in greatest dimension

T1b: Tumor more than 2cm but not more than 3cm in greatest dimension

T2: Tumor more than 3cm but not more than 7cm:

- Involves main bronchus, 2cm or more distal to the carina
- Invades visceral pleura
- Associated with atelectasis or obstructive pneumonitis that extends to the hilar region but does not involve the entire lung

T2a: Tumor more than 3cm but not more than 5cm in greatest dimension

T2b: Tumor more than 5cm but not more than 7cm in greatest dimension

T3: Tumor more than 7cm or one that directly invades any of the following chest wall (including superior sulcus tumors), diaphragm, phrenic nerve, mediastinal pleura, parietal pericardium; or tumor in the main bronchus less than 2cm distal to the carina but without involvement of the carina; or associated atelectasis or obstructive pneumonitis of the entire lung or separate tumor nodule(s) in the same lobe as the primary.

T4: Tumor of any size that invades any of the following: mediastinum, heart, great vessels, trachea, recurrent laryngeal nerve, esophagus, vertebral body, carina; separate tumor nodule(s) in a different ipsilateral lobe to that of the primary.

N- Regional lymph nodes

NX: Regional lymph nodes cannot be assessed

N0: No regional lymph nodes metastasis

N1: Metastasis in ipsilateral peribronchial and/or ipsilateral hilar lymph nodes and intrapulmonary nodes, including involvement by direct extension

N2: Metastasis in ipsilateral mediastinal and/or subcarinal lymph node(s)

N3: Metastasis in contralateral mediastinal, contralateral hilar, ipsilateral or contralateral scalene, or supraclavicular lymph node(s)

M- distant metastasis

M0: No distant metastasis

M1: Distant metastasis

M1a: Separate tumor nodule(s) in a contralateral lobe; tumor with pleural nodules or malignant pleural or pericardial effusion

M1b: Distant metastasis

The resultant groupings are:

Occult Carcinoma: TX, N0, M0

Stage 0: TisN0M0

Stage IA: T1a, bN0M0

Stage IB: T2aN0M0

Stage IIA: T2bN0M0; T1a, bN1M0; T2aN1M0

Stage IIB: T2bN1M0; T3N0M0

Stage IIIA: T1a,b, T2a,b, N2M0; T3N1, N2M0; T4N0, N1M0

Stage IIIB: T4N2M0; any T N3M0

Stage IV: Any T any NM1
