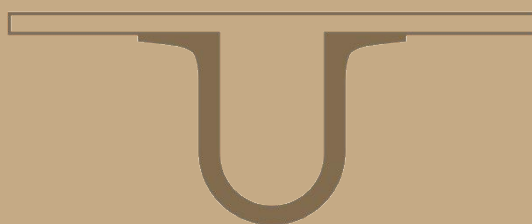




UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



Adriana Jesus Martins Duarte

**ESTUDO DE DIFERENTES ABORDAGENS TERAPÊUTICAS NO  
CANCRO DO COLO DO ÚTERO**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica orientada pela  
Professora Doutora Ana Margarida Coelho Abrantes e pelo Professor Doutor João  
Nuno Sereno Almeida Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da  
Universidade de Coimbra

Fevereiro de 2019

Adriana Jesus Martins Duarte

# **Estudo de diferentes abordagens terapêuticas no cancro do colo do útero**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica orientada  
pela Professora Doutora Ana Margarida Coelho Abrantes e pelo Professor  
Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira e apresentada à Faculdade de  
Farmácia da Universidade de Coimbra

Fevereiro 2018



UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA





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

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



*When you're up against a trouble,  
Meet it squarely, face to face,  
Lift your chin, and set your shoulders,  
Plant your feet and take a brace,  
When it's vain to try to dodge it,  
Do the best that you can do.  
You may fail, but you may conquer--  
See it through!*

**Edgar Albert Guest**



# Agradecimentos

O presente trabalho não ter-se-ia realizado sem o esforço não só individual, como também de um grupo multidisciplinar. Por isso, escrevo as seguintes palavras, as quais nunca serão suficientes para expressar a minha gratidão para com essas pessoas.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Diretora do Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e Professora Catedrática desta faculdade, agradeço por me ter acolhido na sua equipa, por estar sempre disposta a ajudar-me e pela orientação, experiência profissional e conhecimento partilhados. Agradeço ainda pelo rigor minucioso na revisão desta dissertação e pelas críticas construtivas apresentadas.

À Professora Doutora Ana Margarida Abrantes, Professora da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, orientadora desta dissertação, pela sua disponibilidade, ajuda, dedicação e trabalho demonstrados ao longo deste percurso. Agradeço igualmente pela inspiração dada e motivação para continuar este trabalho, pela partilha do saber, pelo reconhecimento do meu trabalho e pela confiança apresentada no mesmo, bem como a sua revisão rigorosa e conselhos construtivos.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira, Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, orientador interno desta tese, os meus agradecimentos pela partilha de conhecimentos e disponibilidade.

Ao Serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) que possibilitou e auxiliou os ensaios de irradiação celulares, que foi incansável e que sempre apoiou e ajudou durante o decorrer deste trabalho.

Aos Serviços Farmacêuticos do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) pela disponibilidade em ceder os citostáticos utilizados neste trabalho, que possibilitaram a sua realização.

À Doutora Ana Salomé Pires, o meu agradecimento especial pela partilha de conhecimentos, apoio demonstrado, incentivo constante e ajuda incondicional no trabalho realizado. Um obrigado, ainda, pela amizade e pelo aconselhamento, os quais foram fundamentais para esta dissertação.

À Mestre Inês Marques, pelo auxílio e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, pela sua dedicação e pela disponibilidade demonstrada e pelos ensinamentos adquiridos. À Mestre Rita Neves pela ajuda e disponibilidade constantes durante o desenvolvimento deste trabalho.



À Mestre Elisabete Resende, pela ajuda e aconselhamentos, profissionalismo e empenho demonstrados. Ainda um sincero agradecimento pela amizade e apoio durante esta dissertação. À Professora Doutora Henriqueta Coimbra Silva e ao Técnico Superior Luís Alcides Mesquita Nogueira pela confiança, apoio e partilha de conhecimentos que contribuíram para a minha aprendizagem e evolução enquanto estudante.

À Simone Graça pela ajuda no desenvolvimento da dissertação, pela partilha de conhecimentos, pelo companheirismo, incentivo e amizade. Ao Paulo Teixeira pela colaboração e todo o empenho durante o desenvolvimento deste trabalho, pela sua ajuda e contribuição. Ao André Salvada pela contribuição e apoio prestados.

À Doutora Leisa Aguiar e Doutora Ericka Costa pela ajuda no trabalho laboratorial, incentivo permanente, partilha de conhecimentos e amizade.

À Doutora Mafalda Laranjo e ao Mestre Miguel Marto, por se mostrarem disponíveis para ajudar sempre que necessário.

À Doutora Ana Cristina Gonçalves, pela ajuda prestada nos estudos de citometria de fluxo.

À Mestre Beatriz Serambeque, Mestre Ricardo Teixo, Licenciada Isabel Meireles, Licenciada Catarina Ferreira e Mestre Catarina Guilherme pelo apoio e dedicação, pelas palavras de incentivo e pela amizade e conselhos.

Aos restantes colegas, Mestre Gonçalo Brites, Mestre Gonçalo Balteiro, Mestre Beatriz Lopes, Licenciada Patrícia Santos, Mestre Juliana Araújo, Mestre Márcia Campos, Mestre João Simões, Licenciada Rosana Martins, agradeço porque em algum momento contribuíram para o meu percurso.

À D.<sup>a</sup> Cláudia Caridade, secretária do Instituto de Biofísica, pela simpatia e disponibilidade contínuas.

Aos meus amigos e à minha família, obrigado pelo incentivo, carinho e apoio durante este percurso.

Aos meus pais e irmã, um profundo agradecimento por todo o incentivo, carinho e motivação, por acreditarem em mim e me apoiarem incansavelmente.

## Resumo

O cancro do colo do útero tem sido considerado um importante problema de saúde, sendo o quarto cancro mais incidente nas mulheres a nível mundial. A taxa de mortalidade tem diminuído devido aos programas de rastreio e pela deteção da doença em estádios cada vez mais precoces. Para além disso, o acesso a terapias eficazes, nomeadamente a radioterapia externa, a braquiterapia e a quimioterapia contribuem para a diminuição dos casos de morte por este cancro, principalmente nos países desenvolvidos. Em casos de cancro avançado a quimioterapia, com base em cisplatina concomitante com radioterapia, constitui um regime terapêutico padrão amplamente usado e eficaz. No entanto, algumas doentes revelam resistência à cisplatina, que juntamente com os efeitos adversos limitam a sua aplicação clínica nestes casos.

O potencial quimioterapêutico do docetaxel tem sido avaliado no cancro do colo do útero, nomeadamente a sua aplicação seguida de radioterapia ou em conjunto com cisplatina concomitante com a irradiação. Com base no seu mecanismo de ação e na sua possível aplicação como radiosensibilizador, devem realizar-se mais estudos de citotoxicidade e de combinações terapêuticas.

Neste contexto, o nosso estudo teve como principal objetivo avaliar o efeito citotóxico de diferentes abordagens terapêuticas, nomeadamente da cisplatina, do docetaxel e da radiação ionizante na linha celular HeLa, de adenocarcinoma do colo do útero. Assim, pretendeu-se avaliar o efeito antiproliferativo da cisplatina e do docetaxel, bem como o efeito da radiação ionizante na sobrevivência celular. O efeito na viabilidade e morte celulares, na progressão do ciclo celular, no stresse oxidativo da célula e o efeito do inibidor do radical hidroxilo também foram alvo deste estudo. Para a realização dos vários ensaios recorreu-se a várias técnicas, sendo elas, o ensaio de sulforrodamina B, o ensaio clonogénico, a citometria de fluxo e a microscopia ótica.

Os estudos de citotoxicidade demonstram o efeito antiproliferativo tanto da cisplatina como do docetaxel, bem como o efeito da radiação na diminuição da sobrevivência celular de forma dependente da dose. As vias de morte celular ativadas pelos diferentes tratamentos sugerem ser dependentes da concentração e da dose depositada, sendo a apoptose a via de morte preferencial em situações de baixas concentrações, ao invés da morte celular por necrose observada aquando da aplicação de elevadas concentrações de fármacos e de doses de radiação ionizante. Para além disso, o stresse oxidativo surge como

efeito de elevadas concentrações de cisplatina e de docetaxel, assim como de radiação, que poderá também sustentar a morte por necrose.

Este trabalho contribuiu para o melhor conhecimento do potencial citotóxico da cisplatina, do docetaxel e da radiação ionizante e os seus possíveis mecanismos envolvidos no cancro do colo do útero. De igual forma, sustenta o conhecimento sobre o docetaxel e a sua vantajosa aplicação no tratamento desta neoplasia, pelo que incentiva à realização de mais estudos a fim de melhor avaliar a sua possível eficácia clínica no cancro do colo do útero.

**Palavras-Chave:** cancro do colo do útero; quimioterapia; radioterapia; docetaxel; cisplatina

# Abstract

Cervical cancer has been considered an important health problem, being the fourth most frequent cancer among women worldwide. The mortality rate has decreased due to screening programs and detection of the disease at earlier stages. Furthermore, the access to effective therapies, namely external radiotherapy, brachytherapy and chemotherapy contribute to the decrease of the death numbers by this cancer, mainly in developed countries. In cases of advanced cancer, cisplatin-based chemotherapy followed by radiotherapy is a widely used and effective standard therapeutic regimen. However, some patients report cisplatin resistance, which coupled with the adverse effects limiting their clinical application in these cases.

The chemotherapeutic potential of docetaxel has been measured on the cervical cancer, namely its application followed by radiotherapy or with cisplatin plus radiotherapy. Based on its mechanism of action and on their possible application as radiosensitizer, more cytotoxic and therapeutic combinations studies should be carried out.

In this context, the main goal of our study was to evaluate the cytotoxic effect of different therapeutic approaches, namely of cisplatin, of docetaxel and of ionizing radiation on HeLa cell line, a cervical adenocarcinoma cell line. Thus, we evaluated the antiproliferative effect of cisplatin and of docetaxel, as well as the effect of ionizing radiation on cell survival. The effect on cell viability and death, the progression of cell cycle, the cell oxidative stress state and the effect of the hydroxyl radical inhibitor were also studied. Some techniques were used to perform the assays, including the sulforhodamine B assay, the clonogenic assay, flow cytometry and light microscopy.

Cytotoxic studies demonstrate the antiproliferative effect of both cisplatin and docetaxel as well as the radiation effect on decreasing cell survival in dose dependent manner. The cell death pathways activated by the different treatments suggest to be concentration and dose dependent, where apoptosis is the preferred death pathway in low concentrations, rather than necrotic cell death observed when high drug concentrations and doses of ionizing radiation were used. Furthermore, oxidative stress appears as an effect of high concentrations of cisplatin and docetaxel, as well as of radiation, which may also sustain death by necrosis.

This work contributed to a better knowledge of cytotoxic potential of cisplatin, docetaxel and ionizing radiation and their possible mechanisms involved on cervical cancer. In the same way, supports the knowledge about docetaxel and its advantageous application

on the treatment of this neoplasia, therefore encourages further studies in order to evaluate its possible clinical efficacy on cervical cancer.

**Keywords:** cervical cancer; chemotherapy; radiotherapy; docetaxel; cisplatin.

# Índice

<b>Introdução .....</b>	<b>15</b>
CANCRO .....	- 17 -
CANCRO DO COLO DO ÚTERO .....	- 18 -
Epidemiologia.....	- 18 -
Fatores de risco .....	- 21 -
Carcinogênese do cancro do colo do útero .....	- 24 -
Diagnóstico e Terapêutica.....	- 26 -
Radioterapia.....	- 31 -
Quimioterapia.....	- 34 -
<b>Objetivos.....</b>	<b>- 41 -</b>
<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>- 45 -</b>
Cultura de células.....	- 47 -
Tratamento com cisplatina e docetaxel.....	- 48 -
Tratamento com radiação ionizante.....	- 49 -
Citotoxicidade celular .....	- 51 -
Avaliação da proliferação celular pelo ensaio SRB.....	- 51 -
Avaliação da sobrevivência celular pelo ensaio clonogénico .....	- 52 -
Análise da viabilidade e morte celular.....	- 53 -
Avaliação do ciclo celular.....	- 55 -
Análise do stresse oxidativo celular .....	- 56 -
Avaliação dos níveis intracelulares de peróxidos.....	- 56 -
Avaliação da produção intracelular do radical superóxido .....	- 57 -
Avaliação da expressão de glutatona reduzida.....	- 58 -
Avaliação da inibição do radical hidroxilo pelo manitol .....	- 58 -
Análise estatística .....	- 59 -
<b>Resultados* .....</b>	<b>- 61 -</b>
Proliferação Celular .....	- 63 -

Sobrevivência celular .....	- 65 -
Viabilidade e morte celular .....	- 66 -
Ciclo celular.....	- 74 -
Stresse oxidativo .....	- 76 -
<b>Discussão .....</b>	<b>- 85 -</b>
<b>Conclusões e Perspetivas Futuras .....</b>	<b>- 101 -</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>- 105 -</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Símbolos .....</b>	<b>- 119 -</b>
<b>Índice de Figuras e Tabelas .....</b>	<b>- 125 -</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>- 133 -</b>

## **Introdução**





## CANCRO

O cancro é uma doença caracterizada pelo descontrolado crescimento e proliferação de células com mutações no DNA (do inglês *Deoxyribonucleic acid*). Associado a este processo poderá estar a formação de metástases à distância, devido à capacidade das células em invadir os tecidos envolventes e migrarem para locais distantes do tumor primário (Kelsey et al., 2014).

O cancro é um dos maiores problemas de saúde pública mundial, com milhões de novos casos diagnosticados todos os anos, sendo uma das principais causas de morte (Yaacob et al., 2010). Atualmente, em média, o risco de ter cancro antes dos 75 anos de idade é de aproximadamente 20%, sendo que há 10% de risco de morrer desta doença (Ferlay et al., 2018). Em 2018, a *International Agency for Research on Cancer (IARC)* estima que ocorram, a nível mundial, 18,1 milhões de novos casos de cancro e 9,6 milhões de mortes devidas ao cancro (Ferlay et al., 2018). O aumento da incidência do cancro ocorre principalmente em partes do mundo com menor acessibilidade a técnicas terapêuticas, como é o caso da radioterapia (Baggarley et al., 2013).

Em 2018, a nível mundial estima-se que os tipos de cancro com maior incidência sejam o cancro do pulmão (11,6%), seguido do cancro da mama (11,6%), do cancro colorretal (10,2%), do cancro da próstata (7,1%) e em quinto do cancro do estômago (5,7%). Relativamente à mortalidade, estima-se que o cancro que apresenta a maior taxa seja o cancro do pulmão (18,4%), seguido do cancro colorretal (9,2%), do cancro do estômago (8,2%), do cancro do fígado (8,2%) e do cancro da mama (6,6%), tal como representado na Figura 1 (Ferlay et al., 2018). Entre as mulheres, os cancros mais incidentes são o cancro da mama, seguido do cancro colorretal, do cancro do pulmão, do cancro do colo do útero e em quinto do cancro da tiroide. Os cancros com maior taxa de mortalidade, nas mulheres, são o cancro da mama, o cancro do pulmão, o cancro colorretal, o cancro do colo do útero e o cancro do estômago. Deste modo, o cancro do colo do útero é o quarto cancro nas mulheres com uma maior incidência e mortalidade (Ferlay et al., 2018).

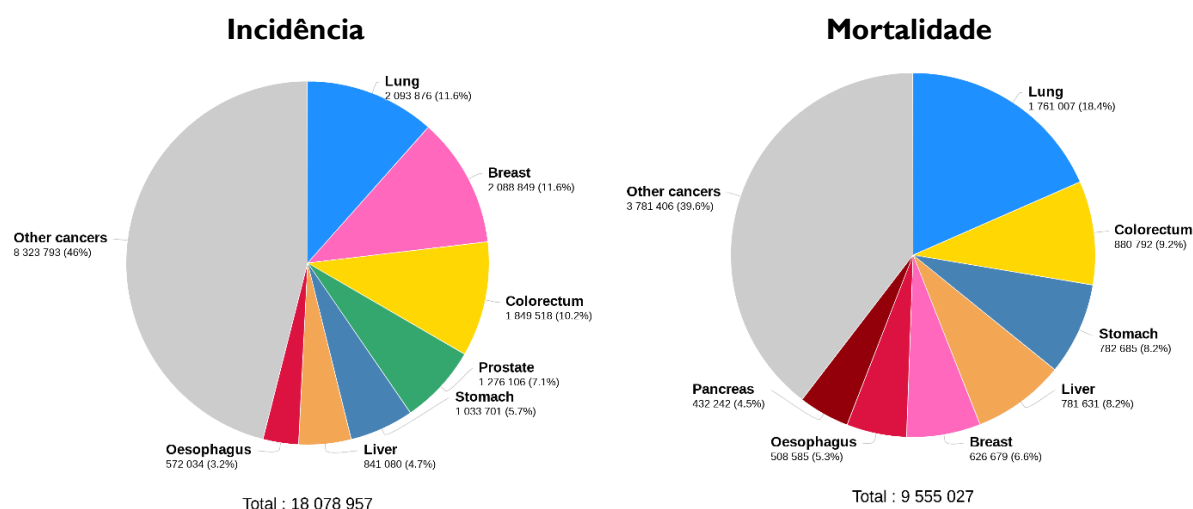


Figura 1 – Estimativa da incidência e da mortalidade do cancro em ambos os sexos, em todo o mundo em 2018. Retirado de *International Agency for Research on Cancer*, 2018.

## CANCRO DO COLO DO ÚTERO

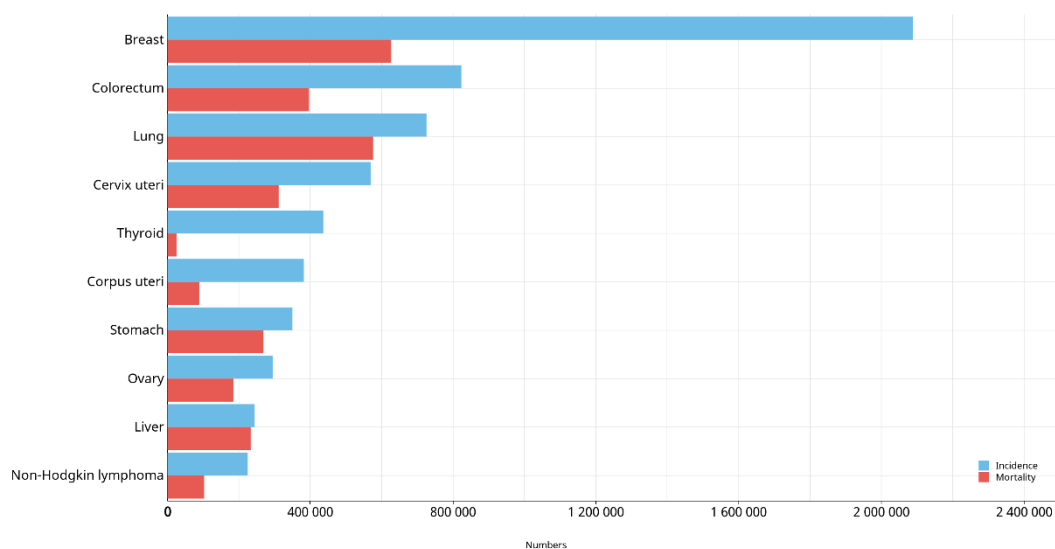
### Epidemiologia

O cancro do colo do útero (CCU) tem sido considerado um importante problema de saúde pública, tanto pela incidência como pela mortalidade nas mulheres com mais de 15 anos. A incidência global de cancro do colo do útero tem aumentado ao longo dos últimos anos (Forouzanfar *et al.*, 2011), no entanto, com a introdução dos programas de rastreio a mortalidade tem diminuído (Weiderpass e Labrèche, 2012). Em países desenvolvidos, o declínio da incidência e da mortalidade do carcinoma escamoso do colo do útero pode dever-se a um rastreio efetivo e acessível à maioria das mulheres, que permite detetar lesões precursoras (Matsumoto *et al.*, 2011). Em países em desenvolvimento, com menos recursos para o rastreio da população e inacessibilidade a boas técnicas terapêuticas, o cancro do colo do útero é uma das principais causas de morte entre as mulheres (Baggarley *et al.*, 2013; Weiderpass e Labrèche, 2012).

Em 2012, o cancro do colo do útero foi o sétimo cancro mais comum mundialmente, representando 528 mil novos casos estimados. Entre as mulheres, o cancro do colo do útero foi o quarto cancro mais frequente, no mesmo ano (Ferlay *et al.*, 2015). A maioria dos casos de cancro do colo do útero, cerca de 85%, ocorreram nos países menos

desenvolvidos. Deste modo, este tipo de cancro é o segundo mais comum nas regiões menos desenvolvidas, com uma incidência de 445 mil casos. Cerca de 12% dos casos de cancro nas mulheres são de cancro do colo do útero, sendo o tipo de cancro que mais afeta as mulheres na África oriental e central. A sua menor frequência nas regiões mais desenvolvidas coloca-o como o décimo primeiro cancro mais comum, com cerca de 83 mil casos (Ferlay *et al.*, 2015). Assim, as regiões consideradas de elevado risco são a África central, sul e oriental e a Melanésia e as de menor risco são a Austrália, a Nova Zelândia e a Ásia ocidental. A mortalidade causada por este cancro correspondeu a 266 mil mulheres, sendo que cerca de 87% das mortes ocorreram nos países menos desenvolvidos. Na África e América central, o cancro do colo do útero é a principal causa de morte relacionada com o cancro entre as mulheres. O risco médio de morrer por cancro do colo do útero antes dos 75 anos de idade é três vezes maior nos países menos desenvolvidos do que nos mais desenvolvidos (Ferlay *et al.*, 2015; Vu *et al.*, 2018).

Em 2018, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) estima que ocorram cerca de 570 mil novos casos de mulheres com cancro do colo do útero e mais de 300 mil mortes associadas a esta doença a nível mundial. Assim, o cancro do colo do útero apresenta-se como o oitavo cancro mais incidente a nível mundial e o quarto mais frequente entre as mulheres, sendo o cancro da mama o mais comum, seguido do cancro colorretal e do cancro do pulmão, Figura 2 (Ferlay *et al.*, 2018).



**Figura 2** - Estimativa da incidência e da mortalidade dos cancros mais comuns nas mulheres, em todo o mundo em 2018. Retirado de *International Agency for Research on Cancer*, 2018.

Relativamente à estatística deste cancro em Portugal, a mortalidade por cancro do colo do útero nas mulheres diminuiu nas últimas décadas (Pinheiro *et al.*, 2003). Em 2012, a

incidência de cancro do colo do útero foi de 720 novos casos estimados, sendo que o número de mortes por esta doença foi de 390 mulheres (Ferlay *et al.*, 2013).

A prevenção do cancro do colo do útero é constituída por prevenção primária e secundária. A prevenção primária consiste na vacinação contra a infeção pelo HPV (HPV, do inglês *human papillomavirus*), enquanto a prevenção secundária se baseia no rastreio de lesões e anormalidades e no seu tratamento precoce a fim de prevenir a progressão para cancro (Bhatla *et al.*, 2009). A combinação da prevenção desta doença por vacinação contra a infeção pelo HPV com os programas de rastreio e as respetivas terapêuticas constitui uma potencial forma de reduzir a incidência e a mortalidade por cancro do colo do útero (Bhatla *et al.*, 2009). A infeção pelo vírus do papiloma humano é um fator importante no desenvolvimento do cancro do colo do útero, sendo que a infeção com HPV de alto risco compreende um risco acrescido. A vacina contra o HPV constitui assim a forma preventiva primária do CCU. Atualmente, existem duas vacinas aprovadas e licenciadas, na maioria dos países, para a prevenção da infeção pelo HPV, a Cerarix™ (bivalente) e a Gardasil® (quadrivalente) (Vu *et al.*, 2018). A Cervarix™ é uma vacina que apenas protege contra a infeção pelo HPV 16 e o HPV 18. A Gardasil®, para além de prevenir infeção contra estes dois tipos de HPV de maior risco, também protege contra o HPV 6 e o HPV 11, que podem causar verrugas genitais e neoplasias de baixo grau (Schiffman *et al.*, 2007; Vu *et al.*, 2018). A vacinação contra o HPV está introduzida na maioria dos países desenvolvidos e constitui a primeira linha de prevenção deste cancro (Sant *et al.*, 2015). A introdução de programas de rastreio do cancro do colo do útero e a melhoria do tratamento contribuíram para a redução das taxas de mortalidade nos países industrializados (Freeman *et al.*, 2012), pelo que o seu rastreio tem sido bem sucedido como medida preventiva secundária (Sant *et al.*, 2015). Contudo, nos países em desenvolvimento, os tumores ainda são diagnosticados nos estádios mais avançados da doença e o cancro do colo do útero ainda constitui uma causa frequente de morte nas mulheres (Freeman *et al.*, 2012).

Ao longo dos últimos anos, na Europa, verificou-se um aumento da sobrevivência, que passou de 61% entre 1999 e 2001, para 65% em 2005 a 2007 (Sant *et al.*, 2015). Nos países desenvolvidos, ao invés dos países em desenvolvimento, melhores condições no sistema de saúde, permitem uma maior taxa de sobrevivência, sendo a sobrevivência aos cinco anos de 66% (Chang e Guo, 2017). O cancro do colo do útero afeta primeiramente mulheres jovens, com a maioria dos casos a surgirem entre as idades de 35 e de 50 anos (Arbyn *et al.*, 2010). Assim, a incidência do cancro do colo do útero começa a aumentar depois dos 30 anos, sendo o seu risco maior entre os 50 e os 60 anos (Padilha, Araújo e Souza, 2017). A

sobrevivência está associada à idade da doente aquando do diagnóstico, pelo que a taxa de sobrevivência diminui com a idade no momento do diagnóstico. A nível europeu, entre os 15 e os 44 anos, a sobrevivência é de 81%, mas diminui para 34% em mulheres com 75 anos ou mais (Sant *et al.*, 2015). Para além disso, quando o diagnóstico é realizado em estádios iniciais da doença, o prognóstico das doentes é mais favorável, com uma sobrevivência aos cinco anos acima de 90%. Ao invés, quando o diagnóstico é realizado em estádios mais avançados, o prognóstico é pobre, mesmo em países com bons cuidados de saúde e acessíveis a todas as doentes (Weiderpass e Labrèche, 2012).

### **Fatores de risco**

Durante os anos 80, surgiram evidências de que o vírus do papiloma humano (HPV) podia estar envolvido na etiologia de alguns tipos de cancro, nomeadamente no cancro do colo do útero. O estudo de zur Hausen (Dürst *et al.*, 1983) foi um dos primeiros a identificar a presença do vírus do papiloma humano do tipo 16 (HPV 16) em amostras de biopsias de cancro do colo do útero (Dürst *et al.*, 1983). Previamente já tinha sido identificada a presença de HPV 10 e HPV 11 em algumas biopsias deste tipo de cancro (Dürst *et al.*, 1983). Desde então, a intensa pesquisa da presença de infeção pelo HPV em amostras de cancro genital e da sua relação causal com o cancro do colo do útero conduziu à criação de rastreios de cancro do colo do útero baseados na deteção de DNA de HPV e na criação de vacinas para o vírus do papiloma humano, que previnem 70 a 80% dos casos de cancro do colo do útero (Crosbie *et al.*, 2013). A infeção pelo HPV é um fator causal importante para o aparecimento de cancro do colo do útero invasivo (Serrano *et al.*, 2015), sendo responsável por cerca de 93% dos casos (Chang e Guo, 2017). Mais de 100 tipos de HPV são conhecidos e caracterizados, e cerca de 40 tipos têm a capacidade de infetar o trato genital (Muñoz *et al.*, 2006). Os HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58 são os tipos mais detetados no cancro do colo do útero invasivo. Estes tipos de HPV mais comuns são responsáveis por cerca de 90% dos casos de cancro do colo do útero a nível mundial (Muñoz *et al.*, 2006; Serrano *et al.*, 2015). Mais concretamente, os HPV do tipo 16 e 18 são os de maior risco e também os mais comuns. Pelo que, a persistência da infeção com estes dois tipos de HPV de elevado risco causa cerca de 70% dos cancros do colo do útero mundialmente (Schiffman *et al.*, 2007; Weiderpass e Labrèche, 2012). A idade na qual se verifica o pico da infeção pelo HPV é em mulheres com menos de 25 anos, seguido de um declínio da incidência da infeção. Em mulheres com mais de 50 anos verifica-se um aumento da infeção pelo HPV, em alguns países (Moscicki *et al.*, 2012).

O potencial carcinogénico do HPV deve-se maioritariamente a duas oncoproteínas, a E6 e a E7. Estas proteínas virais interagem com proteínas celulares, nomeadamente a proteína supressora tumoral P53 (P53) e a proteína do retinoblastoma (RB). A ligação da proteína E7 à RB induz a ativação do fator de transcrição E2F que desencadeia a expressão de proteínas necessárias à replicação do DNA. Por sua vez, a proteína E6 liga-se à proteína P53 para a sua degradação proteolítica, não ocorrendo o processo de morte por apoptose, que seria induzido pela P53. Deste modo, a infeção pelo vírus do HPV induz, nas células hospedeiras, uma atividade viral constante pela ação das proteínas E6 e E7, incitando à desregulação do ciclo celular, ao aumento da instabilidade genética, à acumulação de mutações e consequente desregulação do crescimento celular com desenvolvimento de neoplasia maligna (Muñoz *et al.*, 2006; Schiffman *et al.*, 2007).

As infeções pelo vírus do papiloma humano na zona genital são, maioritariamente, transmitidas por contacto pele com pele ou mucosa com mucosa. Deste modo, através do ato sexual há uma grande probabilidade de transmissão deste vírus, sendo que pode ocorrer a transmissão de mais de um tipo de HPV em simultâneo (Schiffman *et al.*, 2007). A maioria das mulheres são infetadas com pelo menos um ou mais tipos de HPV durante a sua vida sexual ativa (Kovács *et al.*, 2009; Schiffman *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2003). O tempo de persistência da infeção pelo HPV diminui a probabilidade da sua eliminação e o risco de diagnóstico de neoplasia maligna aumenta (Schiffman *et al.*, 2007).

A infeção pelo HPV é o principal agente carcinogénico para o cancro do colo do útero. No entanto, existem alguns fatores que parecem estar envolvidos na carcinogénese do colo do útero, tais como o tabagismo, o uso de contraceptivos hormonais por um período prolongado, a paridade e a infeção simultânea com agentes sexualmente transmissíveis ou com outros tipos de HPV (Chang e Guo, 2017; Cogliano *et al.*, 2011; Moscicki *et al.*, 2012; Muñoz *et al.*, 2006).

O tabagismo é um agente carcinogénico que constitui um fator de risco para o cancro. Os fumadores ativos têm um risco aumentado de desenvolver carcinoma de células escamosas do colo do útero, quando comparados com os que nunca fumaram. Em relação ao tabagismo, o risco aumenta com o aumento do número de cigarros consumidos diariamente e também com a idade precoce com que se inicia o consumo de tabaco. No entanto, não parece haver associação entre o tabagismo e o adenocarcinoma do colo do útero (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer *et al.*, 2006a; Muñoz *et al.*, 2006). O processo inerente à carcinogénese induzida pelo tabagismo associado ao risco da mulher desenvolver cancro do colo do útero ainda não é bem

conhecido. No entanto, tal pode dever-se à ação do tabaco no metabolismo hormonal da mulher, com indução da redução da resposta imunológica do consumidor e aos danos diretos causados no DNA (Muñoz *et al.*, 2006).

O uso de contraceptivos hormonais tem demonstrado ser um agente carcinogénico para o cancro do colo do útero em mulheres com HPV, sendo que o aumento do tempo de consumo dos mesmos, por cinco ou mais anos, induz o aumento do risco deste cancro (Muñoz *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2003). O mecanismo associado poderá relacionar-se com a estimulação da expressão génica do HPV pelo estrogénio ou pela progesterona, componentes dos contraceptivos orais (Muñoz *et al.*, 2006). Além disso, as diferenças nas escolhas reprodutivas parece contribuir para os padrões de incidência do cancro do colo do útero nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer *et al.*, 2006b). Um elevado número de gestações de uma mulher, HPV positiva, parece relacionar-se com um risco acrescido de carcinoma invasivo do colo do útero, quando comparado com mulheres sem filhos (Bosch e Sanjosé, 2007; International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer *et al.*, 2006b). A idade precoce na primeira gravidez está associada com o risco de carcinoma *in situ*/neoplasia intraepitelial do colo do útero de grau 3 (CIN3, do inglês *cervical intraepithelial neoplasia*) e de cancro do colo do útero invasivo (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer *et al.*, 2006b; Muñoz *et al.*, 2006). A gestação está associada à produção de elevadas concentrações de estrogénio e de progesterona, pois uma mulher com vários filhos esteve sujeita a uma exposição prolongada a estas hormonas. Além disso, lesões associadas ao parto podem favorecer a exposição à infeção pelo HPV (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer *et al.*, 2006b). O uso prolongado, por mais de cinco anos, de contraceptivos orais associado ao elevado número de gestações aumentam o risco de cancro do colo do útero (Bosch e Sanjosé, 2007). Adicionalmente, o comportamento sexual, nomeadamente o número de parceiros sexuais e a idade precoce da primeira relação sexual, aumentam a probabilidade de adquirir infeção pelo HPV e demonstram estar associados com o risco de desenvolver CCU (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer *et al.*, 2009).

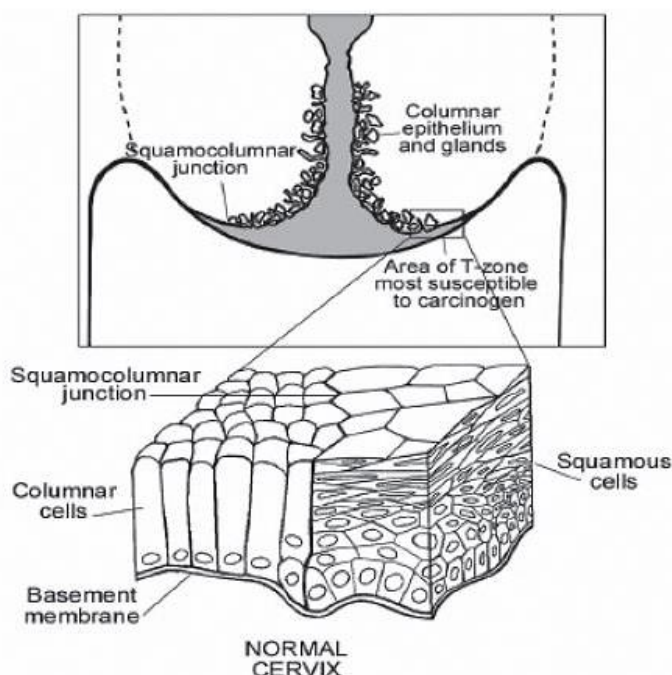
Para além destes fatores externos, a coinfeção com outros vírus pode estar associada ao desenvolvimento desta doença. Assim, agentes infecciosos sexualmente transmissíveis que atuam como cofatores da carcinogénese do colo do útero são o vírus do *Herpes simplex 2* (HSV-2, do inglês *Herpes simplex virus type 2*) e também o vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*). O vírus da imunodeficiência humana tipo 2



pode aumentar o risco de infecção pelo HPV. Alguns estudos evidenciam um risco acrescido de cancro do colo do útero invasivo em mulheres infetadas com HSV-2 e HPV positivas (Smith *et al.*, 2002). Esta associação pode, em parte, dever-se à resposta inflamatória desencadeada, que tem sido associada com a geração de radicais livres e desenvolvimento de instabilidade genética. As mulheres com imunossupressão, causada pela infecção com HIV tipo I, têm um risco aumentado da persistência da infecção pelo HPV e de cancro do colo do útero (Cogliano *et al.*, 2011; Koshiol *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2006).

### **Carcinogénese do cancro do colo do útero**

O colo uterino contém três regiões anatómicas distintas, incluindo a ectocérvice, a zona de transformação e a endocérvice, Figura 3. A ectocérvice é revestida pelo epitélio escamoso estratificado, enquanto a endocérvice tem epitélio colunar (Blumenthal e McIntosh, 2005; Deng *et al.*, 2019). A transição entre estas duas populações de células designa-se junção escamocolunar, que caracteriza a zona de transformação, e constitui a zona de risco para a infecção viral (Small *et al.*, 2017).



**Figura 3** – Revestimento do colo do útero, constituído por epitélio escamoso e pelo epitélio colunar. Retirado de (Blumenthal e McIntosh, 2005).

A infecção pelo HPV é o fator etiológico mais importante na carcinogénese do colo do útero (Kovács *et al.*, 2009; Moscicki *et al.*, 2012). A maioria das infecções são transitórias, pelo que cerca de 90% são eliminadas espontaneamente de um a dois anos (Kovács *et al.*, 2009;

Schiffman *et al.*, 2005, 2007) e não há desenvolvimento de lesões ou cancro (Moscicki *et al.*, 2012). Contudo, mulheres com persistência da infeção apresentam um maior risco carcinogénico, com possibilidade de desenvolver neoplasias intraepiteliais do colo do útero (CIN, do inglês *cervical intraepithelial neoplasia*) ou adenocarcinoma *in situ*, que podem progredir para cancro do colo do útero invasivo (Koshiol *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2008; Small *et al.*, 2017). Neste caso, doentes com lesões que não são tratadas podem demorar anos a desenvolver carcinoma invasivo. Enquanto que, cerca de 10% das doentes podem ter uma progressão de carcinoma *in situ* para invasivo em menos de 1 ano (Small *et al.*, 2017).

A infeção pelo HPV de elevado risco, principalmente por HPV 16, tem a capacidade de persistir por um maior período de tempo, comparativamente a outros tipos de HPV (Koshiol *et al.*, 2006). As mulheres com citologia normal e positivas para HPV, nomeadamente 16 e 18, apresentam um maior risco de desenvolver lesões do colo do útero, nomeadamente CIN2 e CIN3 (Matsumoto *et al.*, 2011; Muñoz *et al.*, 2006). Assim, a persistência de infeções por HPV de elevado risco está associada ao desenvolvimento da maioria dos carcinomas do colo do útero (Kovács *et al.*, 2009). Em adição, o tipo de HPV presente nas lesões pode funcionar como um marcador de previsão da persistência da infeção e da progressão da lesão (Matsumoto *et al.*, 2011), permitindo a estratificação das mulheres consoante o risco de desenvolverem cancro do colo do útero (Kovács *et al.*, 2009).

Deste modo, a carcinogénese associada à infeção do colo do útero pelo HPV envolve a infeção do epitélio da zona de transformação do colo do útero que, quando seguida de manutenção da persistência viral prolongada, aumenta a probabilidade de progressão para neoplasia, que pode evoluir para cancro invasivo (Moscicki *et al.*, 2012). A maioria das lesões do colo do útero de baixo grau, CIN1, regredem de forma espontânea, enquanto cerca de 10 a 20% das lesões progredem para CIN3 ou cancro. Deste modo, a lesão de grau 1 (CIN1) é geralmente acompanhada sem tratamento. As lesões de grau 2 (CIN2), entre 40 a 60% dos casos regredem espontaneamente, no entanto, estas lesões devem ser tratadas (Matsumoto *et al.*, 2011). De entre os três graus de neoplasia intraepitelial do colo do útero (CIN), o CIN2 apresenta maior propensão de persistir e progredir e menor de regredir em relação a CIN1. Consequentemente, o risco de progressão para CIN3 é maior em caso de lesão de grau 2 em relação a lesão de grau 1 (Matsumoto *et al.*, 2011). A probabilidade de regressão espontânea da lesão correlaciona-se com a idade da mulher, pelo que a probabilidade é maior em mulheres mais jovens (Matsumoto *et al.*, 2011).

Os tumores que se desenvolvem no ectocérvix são na sua maioria carcinomas de células escamosas e os que surgem no endocérvix são do tipo adenocarcinoma (Small *et al.*, 2017). Deste modo, a maioria dos casos de cancro do colo do útero, cerca de 70 a 80%, são carcinomas de células escamosas, enquanto o adenocarcinoma é menos frequente, representando cerca de 20% dos casos de CCU (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer *et al.*, 2006a; Marth *et al.*, 2017; Parkin e Bray, 2006). Os subtipos histológicos ainda menos comuns são o carcinoma adenoescamoso, o tumor neuroendócrino, o cancro papilar e o adenocarcinoma de células claras (Small *et al.*, 2017). A infeção pelo HPV está relacionada com o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas e de adenocarcinoma do colo do útero, nomeadamente o HPV 16 e o HPV 18 que são comuns a ambos os tipos histológicos (Muñoz *et al.*, 2006). A presença de HPV 16 no carcinoma de células escamosas ou em lesões intraepiteliais escamosas precursoras está associado a um pobre prognóstico (Marth *et al.*, 2017). Infeção pelo HPV 18 é mais comum em adenocarcinomas e em carcinomas adenoescamosos, em relação ao carcinoma de células escamosas (Marth *et al.*, 2017). No entanto, tanto a presença de DNA de HPV 16 como de HPV 18 tem sido associada ao risco de desenvolver adenocarcinoma (Moscicki *et al.*, 2012). O adenocarcinoma do colo do útero tem aumentado nas últimas três décadas, provavelmente devido ao rastreio citológico que é pouco efetivo e sensível em caso de adenocarcinoma *in situ*, uma vez que este afeta áreas do colo do útero que são difíceis de obter uma amostra representativa do canal endocervical (Parkin e Bray, 2006; Small *et al.*, 2017).

## **Diagnóstico e Terapêutica**

A característica assintomática do cancro do colo do útero, em estádios precoces da doença, evidencia a necessidade da prevenção e de um diagnóstico precoce. Em caso de cancro invasivo localmente avançado pode haver a manifestação de alguns sintomas, como hemorragia vaginal anormal, corrimento vaginal incomum, dor pélvica, hidronefrose e dispareunia, que consiste numa dor intensa durante ou após a relação sexual, o que pode alertar a mulher para o rastreio da doença (Baggarley *et al.*, 2013; Marth *et al.*, 2017).

A existência de programas de rastreio do colo do útero e o acesso aos mesmos facilitam a identificação precoce de mulheres com risco de desenvolver lesões precursoras de cancro do colo do útero. A implementação do programa de rastreio com base no exame citológico de Papanicolau e na colposcopia resultou na redução de até 80% da incidência de cancro do colo do útero nos países desenvolvidos. No entanto, a regularização deste

programa ainda não ocorreu em muitas regiões menos desenvolvidas, como se constata pela elevada incidência deste cancro (Vu *et al.*, 2018). O exame citológico permite a deteção de anormalidades e de cancro do colo do útero ainda numa fase inicial da doença (Marth *et al.*, 2017). Contudo, as limitações de sensibilidade do exame citológico, incluindo a subjetividade na análise de alterações morfológicas presentes nas amostras ou na qualidade indevida das amostras, fez com que nos últimos anos houvesse a introdução do teste de HPV como ferramenta de rastreio, o qual apresenta uma maior sensibilidade (Marth *et al.*, 2017; Small *et al.*, 2017). O DNA de HPV está presente na maioria dos casos de cancro do colo do útero visto que é uma causa estritamente relacionada com o aparecimento deste cancro. No caso de se obter citologia do colo do útero anormal ou de teste positivo para presença HPV de elevado risco, deve realizar-se um diagnóstico mais preciso com colposcopia e biopsia (Marth *et al.*, 2017).

O sistema de estadiamento da FIGO recomenda a realização de exames de imagem, sempre que possível. Principalmente, no caso de estágio igual ou superior a IBI a fim de ser aplicada a terapêutica mais adequada, uma vez que é importante avaliar o tamanho do tumor, se existe invasão do paramétrio ou da zona inferior da vagina e ainda a presença de metástases. Deste modo, procede-se a exames de imagem como a ressonância magnética (RM) pélvica ou, em caso de contraindicação, opta-se pela tomografia computadorizada (TC) abdominal e pélvica, de modo a obter informação relativa à extensão do tumor e ao prognóstico. A imagem por RM permite obter informação do tamanho do tumor, de invasão do paramétrio e da parede pélvica, de invasão da bexiga ou do reto e da presença de metástases ganglionares. A informação fornecida pela TC é mais limitada, evidenciando a disseminação da doença, incluindo gânglios linfáticos aumentados, fístula para a bexiga ou para o reto e a presença de metástases à distância (Freeman *et al.*, 2012; Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2016). Adicionalmente, a tomografia por emissão de positrões (PET), uma técnica com elevada sensibilidade, tem demonstrado potencial na avaliação da extensão da doença, principalmente dos gânglios linfáticos, tanto em fases iniciais da doença como em estádios mais avançados (Marth *et al.*, 2017; Small *et al.*, 2017).

Deste modo, o estadiamento efetivo do cancro do colo do útero é essencial para a aplicação do tratamento mais assertivo para a doente. Atualmente, o sistema de estadiamento da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) é o método mais amplamente aceite para o cancro do colo do útero, de acordo com a sua revisão em 2009 (Freeman *et al.*, 2012). Tal consiste num estadiamento clínico à base de observação e de exame ginecológico. Estudos de imagem contribuem para definir com maior precisão a

extensão da doença. O estadiamento é baseado no tamanho do tumor, na extensão à vagina, no envolvimento do paramétrio, na extensão à bexiga ou reto e na presença de metástases à distância (Marth *et al.*, 2017). O estadiamento FIGO, segundo as normas de classificação da revisão de 2009, encontra-se descrito na Tabela I.

**Tabela I** – Estadiamento do cancro do colo do útero segundo as normas FIGO de 2009.

<b>ESTÁDIO</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
<b>I</b>	Tumor limitado ao colo do útero com extensão mais profunda, apenas diagnóstico histológico
<b>IA</b>	Carcinoma invasivo, com diagnóstico microscópico
<b>IA1</b>	Invasão do estroma $\leq 3$ mm em profundidade e extensão $\leq 7$ mm
<b>IA2</b>	Invasão do estroma $> 3$ mm e $\leq 5$ mm em profundidade e extensão $\leq 7$ mm
<b>IB</b>	Lesões clinicamente visíveis limitadas ao colo uterino ou pré-clínicas superiores ao estágio IA
<b>IB1</b>	Carcinoma clinicamente visível com tamanho $\leq 4$ cm
<b>IB2</b>	Carcinoma clinicamente visível com tamanho $> 4$ cm
<b>II</b>	Carcinoma estende-se para além do colo, envolvendo até 2/3 superiores da vagina mas não atinge a parede pélvica
<b>IIA</b>	Não há invasão do paramétrio
<b>IIA1</b>	Carcinoma clinicamente visível com $\leq 4$ cm
<b>IIA2</b>	Carcinoma clinicamente visível com $> 4$ cm
<b>IIB</b>	Carcinoma com invasão do paramétrio mas não há extensão à parede pélvica
<b>III</b>	Carcinoma estende-se à parede pélvica, pode invadir o 1/3 inferior da vagina; possibilidade de hidronefrose ou ausência de funcionamento renal
<b>IIIA</b>	Envolvimento do 1/3 inferior da vagina sem extensão à parede pélvica
<b>IIIB</b>	Extensão à parede pélvica, possibilidade de hidronefrose ou ausência de funcionamento renal
<b>IV</b>	Carcinoma estende-se para além da pelve, pode invadir a mucosa da bexiga e/ou do reto
<b>IVA</b>	Estende-se aos órgãos adjacentes (mucosa da bexiga e/ou reto)
<b>IVB</b>	Estende-se aos órgãos distantes (metástases à distância)

Adaptado de (Freeman *et al.*, 2012; Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2016).

A sobrevivência aos cinco anos é superior para doentes diagnosticadas com estágio inicial da doença e sem metástases. Em doentes com estágio entre IB e IIA, a taxa de sobrevivência aos cinco anos sem a presença de metástases ganglionares é entre 88% e 95% e na presença de metástases ganglionares diminui para 51% a 78% (Freeman *et al.*, 2012; Marth *et al.*, 2017). Nas doentes com estágio II e III a sobrevivência aos cinco anos é entre

30% e 50%, dependendo do tamanho do tumor e da presença de gânglios linfáticos (Baggarley *et al.*, 2013). Além disso, o tipo histológico parece associar-se à sobrevivência aos cinco anos, em que o adenocarcinoma apresenta um pior prognóstico com cerca de 10% a 20% de diferença para os restantes carcinomas (Marth *et al.*, 2017). As doentes com cancro do colo do útero avançado ou recorrente têm um pobre prognóstico, com uma sobrevivência a um ano entre 10% a 20% (Zhu *et al.*, 2016).

Após a fase de diagnóstico e de estadiamento clínico, segue-se o planeamento terapêutico. No carcinoma do colo do útero, a escolha terapêutica é adequada ao estágio do cancro e à condição da doente, de modo a que a terapia seja personalizada. Assim, o tratamento do carcinoma do colo do útero é determinado pelo tipo histológico, presença de invasão linfovascular, volume tumoral, estágio clínico e preferência/concordância da doente (Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2016). De entre as opções disponíveis estão a cirurgia, a radioterapia interna e/ou externa e a quimioterapia com radioterapia. Nos tumores microinvasivos, por norma, recorre-se à cirurgia conservadora. Nos tumores precocemente invasivos, nomeadamente nos estádios IBI e IIAI, as terapêuticas adequadas são a cirurgia radical e a radioterapia. Nos tumores de maior extensão, a partir do estágio IB2 até IVA, a quimiorradioterapia é, normalmente, a opção mais adequada (Leal, Cunha e Jorge, 2010). Segundo o *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* o adenocarcinoma é tipicamente tratado de forma similar ao carcinoma escamoso do colo do útero.

No carcinoma invasivo em fase precoce, no estágio IAI, sem invasão dos espaços linfovasculares, realiza-se histerectomia extrafascial, com remoção do útero, incluindo o colo do útero, com a possibilidade de anexectomia bilateral, com remoção das trompas de Falópio e dos ovários. Em caso de a doente pretender preservar a fertilidade, como opção realiza-se a conização que consiste na remoção, em forma de cone, por laser ou por bisturi da lesão existente no colo do útero. No caso de haver invasão linfovascular realiza-se ainda linfadenectomia pélvica bilateral, que consiste na dissecação bilateral dos gânglios linfáticos. Em doentes com estágio IA2, a opção terapêutica baseia-se na histerectomia extrafascial com linfadenectomia pélvica bilateral e possibilidade de realizar também anexectomia bilateral. No caso de a doente pretender manter a fertilidade ou em situações em que a doente é jovem poderá ser possível realizar traquelectomia e linfadenectomia pélvica bilateral, havendo a preservação do útero e dos ovários. Em ambos os estádios, IAI e IA2, na ausência de invasão linfovascular, em doentes que apresentem contraindicação cirúrgica opta-se por braquiterapia intracavitária. Em caso de invasão linfovascular está indicado

radioterapia externa e braquiterapia intracavitária (Bhatla *et al.*, 2009; Leal, Cunha e Jorge, 2010; Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2016).

Em doentes com estágio IB1 com carcinoma com menos de 2cm, a terapêutica consiste na histerectomia radical, com possibilidade de linfadenectomia pélvica bilateral e anexectomia bilateral. Na situação de a doente não se apresentar elegível para cirurgia opta-se pela radioterapia externa seguida de braquiterapia intracavitária. Ainda, na eventualidade de se pretender manter a fertilidade da mulher pode optar-se pela traquelectomia radical com linfadenectomia pélvica bilateral. No caso do carcinoma ter mais de 2cm, o tratamento compreende a histerectomia radical, anexectomia bilateral e linfadenectomia pélvica bilateral. Pode ainda recorrer-se a radioterapia externa com possibilidade de braquiterapia intracavitária. As doentes com estágio IB2, em que a extensão do tumor é superior a 4 cm, a quimiorradioterapia concomitante é por norma a terapêutica aplicada (Bhatla *et al.*, 2009; Leal, Cunha e Jorge, 2010; Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2016).

No estágio IIA1 a terapêutica é igual à aplicada no carcinoma de estágio IB1 com mais de 2cm. Da mesma forma, o tratamento no estágio IIA2 deve ser igual ao praticado no estágio IB2. Em doentes com cancro localmente avançado, nomeadamente os estádios IIB, III e IVA, a terapia mais adequada é radioterapia concomitante com quimioterapia, principalmente com cisplatina, ou apenas radioterapia. O plano normalmente aplicado consiste numa dose semanal de 40mg/m<sup>2</sup> de cisplatina em conjunto com radioterapia (6 ciclos). No caso de haver contra-indicação à cisplatina, deve ser administrada carboplatina (Bhatla *et al.*, 2009; Leal, Cunha e Jorge, 2010; Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2016). Segundo os resultados de Chen *et al.* (2017), no tratamento do cancro do colo do útero avançado, por comparação entre radioterapia com cisplatina semanal (30 a 40mg/m<sup>2</sup>) e a cada três semanas (50 a 100mg/m<sup>2</sup>), ambas as formas apresentaram a mesma eficácia de tratamento, no entanto a opção de cisplatina semanal teve menos efeitos de toxicidade hematológica nas doentes (Chen *et al.*, 2017).

No estágio IVB, em que se verificam metástases à distância, opta-se por um tratamento paliativo, não invasivo e simples de administrar, com a finalidade de aliviar e controlar os sintomas da doença e possibilitar uma melhor qualidade de vida às doentes, com reduzida toxicidade (Baggarley *et al.*, 2013). A quimioterapia ou radioterapia paliativa são as opções a aplicar. No caso de quimioterapia, recorre-se à cisplatina numa concentração de 50mg/m<sup>2</sup> a cada 3 semanas. No entanto, o fraco sucesso do tratamento e os resultados de ensaios clínicos indicam que a quimioterapia combinada, especificamente combinações com base em cisplatina, com topotecano ou paclitaxel, têm demonstrado melhores resultados. Por norma,

a primeira linha de tratamento é constituída por cisplatina e paclitaxel, no entanto, em doentes com contraindicação para a cisplatina, a opção terapêutica é carboplatina e paclitaxel (Marth *et al.*, 2017; Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2016). Em alternativa, em doentes com um PS (do inglês *Performance Status*) entre 0 e 1, pode ser considerada a associação de bevacizumab (anticorpo monoclonal anti-fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*)) à quimioterapia (cisplatina e paclitaxel) (Marth *et al.*, 2017; Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2016). Relativamente à radioterapia, a dose total de radiação ionizante a aplicar para o tratamento paliativo adequa-se à extensão da doença, ao grau de sintomatologia, ao desempenho da doente, ao risco de toxicidade e de acordo com a vontade da doente. O planeamento da radioterapia tem em conta a administração da dose necessária e a minimização dos efeitos adversos. Os fatores que contribuem para a toxicidade causada pela radiação incluem o volume a irradiar, a dose total e a dose diária, bem como a radiosensibilidade dos tecidos envolventes (Baggarley *et al.*, 2013).

### **Radioterapia**

Ao longo dos últimos anos, o conhecimento acerca da radioterapia e da sua aplicabilidade na área da saúde possibilitaram o seu uso como uma importante ferramenta terapêutica em oncologia (Bernier, Hall e Giaccia, 2004). Assim, a radioterapia consiste no uso de radiação ionizante com finalidades terapêuticas, tanto no tratamento do cancro, que visa a cura deste, como para tratamento paliativo (Baggarley *et al.*, 2013). O uso da radiação para terapia do cancro evoluiu com grandes inovações nos dispositivos de produção de radiação como na maneira de entregar as doses de radiação ao tumor, percebendo os efeitos nas células irradiadas e nos tecidos normais, testando desde doses únicas elevadas a pequenas doses administradas periodicamente, até ao estudo da combinação da radioterapia com agentes quimioterapêuticos a fim de melhorar a *performance* do tratamento (Bernier, Hall e Giaccia, 2004).

A radioterapia é um método capaz de destruir células tumorais por emissão de feixes de radiação ionizante (Padilha, Araújo e Souza, 2017). Esta é energia sob a forma de ondas eletromagnéticas ou de partículas subatómicas (Kelsey *et al.*, 2014). Os diferentes tipos de radiação ionizante são fótons de alta energia (energia eletromagnética), como os raios-X e os raios gama, e partículas alfa, partículas beta, neutrões, prótons e até núcleos pesados (Baggarley *et al.*, 2013; Kelsey *et al.*, 2014). Estes vários tipos de radiação caracterizam-se



pelo diferente poder de penetração e de ionização (Padilha, Araújo e Souza, 2017). Assim, a radiação ionizante consiste em radiação com energia suficiente para ionizar átomos ou moléculas, com conseqüente formação de iões (Kelsey *et al.*, 2014). Os raios-X são um tipo de radiação eletromagnética, invisível, que têm um comprimento de onda menor que a luz, e apresentam capacidade de penetrar materiais sólidos (Baggarley *et al.*, 2013).

A radioterapia pode ser administrada de duas formas distintas, a radioterapia externa e a braquiterapia. A radioterapia externa caracteriza-se pela deposição de doses fracionadas, através de um acelerador linear, sendo que a dose total depende do objetivo terapêutico, distinguindo-se doses totais entre terapia de caráter curativo e a terapia paliativa. Assim, as doses usadas são de 60 a 70Gy e de 30 a 50Gy, respetivamente (Kelsey *et al.*, 2014). Na radioterapia fracionada, as doses são administradas diariamente, entre 3 a 7 semanas de tratamento. No tratamento paliativo, as frações a administrar normalmente são mais elevadas, não havendo tanta ponderação dos efeitos nos tecidos normais. No que diz respeito à braquiterapia, esta é administrada através de uma fonte radioativa que é implantada diretamente no tumor ou próximo dele, de modo que a dose de radiação fique limitada a essa zona, por um período permanente ou limitado de tempo (Kelsey *et al.*, 2014). Normalmente, a fonte usada emite raios gama ou partículas beta (Baggarley *et al.*, 2013).

O crescimento de células normais é estritamente regulado e controlado, ao contrário das células tumorais, onde este controlo se perde (Kelsey *et al.*, 2014). Assim, células tumorais resultam da não reparação de mutações génicas, sendo geneticamente instáveis, induzindo a um aumento da taxa de replicação e de mutações. O seu crescimento descontrolado, sem ocorrer apoptose, e o processo de neoangiogénese proporcionam o crescimento da massa tumoral e a migração para locais distantes (metastização). Para além disto, as células malignas caracterizam-se pela perda de diferenciação celular (Kelsey *et al.*, 2014). Segundo as leis de Bergonie e Tribondeau, as células tumorais, que apresentam uma rápida proliferação, são mais radiosensíveis do que os tecidos normais (Formenti e Demaria, 2009; Vogin e Foray, 2013).

Apesar da eficácia da radioterapia como tratamento do cancro é necessário que o plano terapêutico seja o mais adequado às características do tumor. Deste modo, a aplicação assertiva das doses de radiação, de forma a erradicar as células tumorais, bem como a delimitação do volume tumoral a irradiar, de forma a minimizar os efeitos nos tecidos normais, são aspetos importantes para o sucesso clínico (Bernier, Hall e Giaccia, 2004). Por conseqüente, o objetivo principal da radioterapia é destruir as células tumorais sem afetar as células normais (Baggarley *et al.*, 2013). Ainda assim, sendo a radioterapia fracionada e

administrada com os intervalos de tempo corretos, de forma a diminuir os efeitos nos tecidos saudáveis (Padilha, Araújo e Souza, 2017), este tratamento tem sempre efeitos na doente. Os efeitos desta modalidade, por norma, surgem de uma a duas semanas após o início do tratamento, tais como, fadiga, náuseas (que podem surgir horas após a irradiação), diarreia, toxicidade da pele, como eritema, prurido ou pele seca, alopecia e dor (Baggarley et al., 2013).

A radiação ionizante pode causar danos nas células expostas à mesma, ou seja, efeitos biológicos, de forma direta ou indireta (Baggarley et al., 2013). Os efeitos diretos traduzem-se por lesões diretas em biomoléculas, como o DNA, enquanto os efeitos indiretos são produzidos por produtos intermediários (Kinsella, Sohn e Wessels, 2006). Apesar de os diferentes tipos de radiação induzirem o mesmo tipo de efeito, a ionização de átomos ou moléculas, a radiação de elevada transferência linear de energia (LET, do inglês *linear energy transfer*) causa predominantemente danos diretos, enquanto a radiação de baixo LET, como os raios-X, são responsáveis por cerca de dois terços das lesões indiretas (Andreo et al., 2005).

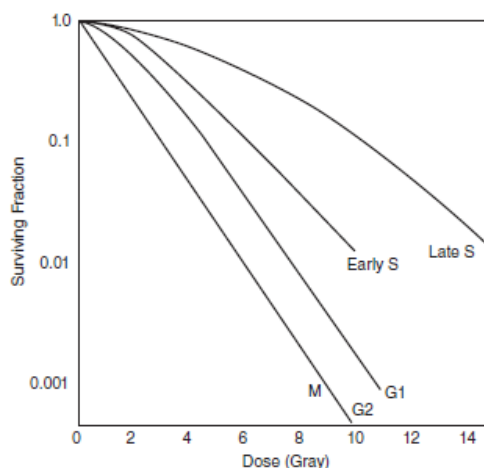
A ação direta da radiação pode provocar lesões em macromoléculas com relevância celular, nomeadamente o DNA, que é o alvo mais crítico na célula (Andreo et al., 2005). Os danos no DNA causados, quer pela deposição de energia, quer por radicais livres produzidos pela ação da radiação, incluem quebras em apenas uma das cadeias ou em ambas as cadeias (Kinsella, Sohn e Wessels, 2006).

A ação indireta da radiação resulta da sua interação com outras moléculas e/ou átomos, principalmente com a água, visto que é a molécula mais abundante na célula, produzindo radicais livres altamente reativos (Baggarley et al., 2013). A interação da radiação ionizante com as moléculas de água designa-se por radiólise da água. Neste processo há perda de um eletrão da molécula de água ( $H_2O$ ) que, por intermédio de reações químicas, origina radicais livres e iões. São vários os radicais livres que se podem formar, em especial o radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ). Estes radicais podem recombinar-se e produzir o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) (Andreo et al., 2005; Kinsella, Sohn e Wessels, 2006). Estes podem provocar danos noutras moléculas, tais como a quebra de ligações químicas do DNA (Kinsella, Sohn e Wessels, 2006).

Os efeitos biológicos celulares resultantes da interação da radiação com o material biológico, assim como os danos químicos originados, podem resultar na perda da capacidade reprodutora celular e, conseqüentemente, levar à senescência e à morte celular (Kinsella, Sohn e Wessels, 2006). A morte celular provocada pela ação da radiação ionizante em

células tumorais humanas é resultado maioritariamente (cerca de 70%) de efeitos indiretos, induzindo a formação de radicais livres pela radiólise da água, do que por lesões diretas no DNA (Kinsella, Sohn e Wessels, 2006).

Existem dois tipos de danos, os danos subletais, que podem ser reparados (Andreo *et al.*, 2005) e os danos letais que são irreversíveis, podendo culminar na falha da função e divisão celulares (Kelsey *et al.*, 2014), levando à morte celular (Andreo *et al.*, 2005). Os danos em apenas uma cadeia de DNA são mais fáceis de reparar, pois a cadeia intacta é utilizada como molde. A quebra da dupla cadeia de DNA é mais difícil de reparar, podendo ocorrer erros neste processo. Danos no DNA são normalmente reconhecidos por enzimas de reparação, durante o processo de replicação (Kelsey *et al.*, 2014). No entanto, os danos na dupla cadeia de DNA que não são reparados, são consideradas como as lesões mais citotóxicas, dando origem a danos letais causados pela radiação ionizante (Kinsella, Sohn e Wessels, 2006). As células são mais sensíveis à radiação em determinadas fases do seu ciclo celular, nomeadamente na fase G2 e M. A maioria destes casos resulta na morte celular, enquanto que células na fase S são mais radorresistentes, acabando por sobreviver (Kelsey *et al.*, 2014), Figura 4.



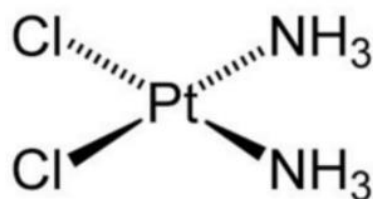
**Figura 4** – Curvas de sobrevivência celular de cada fase do ciclo celular (Retirado de (Kelsey *et al.*, 2014)).

## Quimioterapia

Em doentes com cancro do colo do útero avançado ou recorrente, o tratamento padrão é a quimioterapia com base em cisplatina (Eskander e Tewari, 2014; Zhu *et al.*, 2016). A cis-diaminodicloroplatina (II), comumente designada por cisplatina, é um agente quimioterapêutico muito usado no tratamento do cancro, incluindo o cancro colorretal, da

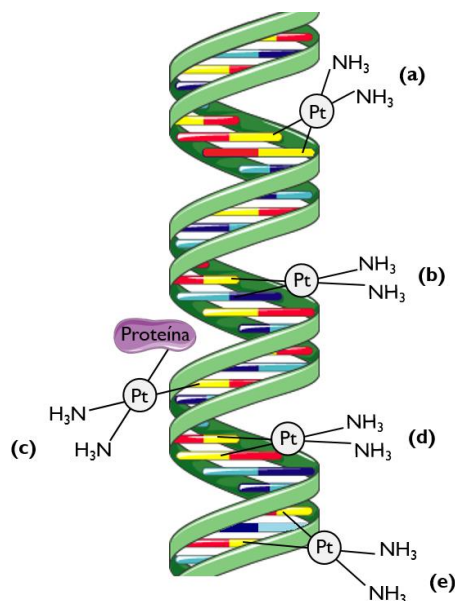
bexiga, da cabeça e pescoço, do pulmão, do ovário e dos testículos, bem como do cancro do colo do útero (Dasari e Tchounwou, 2014; Galluzzi *et al.*, 2012).

A cisplatina é um composto de platina, com pouca solubilidade em água, estável à temperatura e pressão normais. A cisplatina é composta por um átomo de platina ligado a dois iões cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) na posição *cis* e a dois de amónia ( $\text{NH}_3$ ), também na posição *cis*, Figura 5 (Dasari e Tchounwou, 2014; Quintanilha *et al.*, 2017).



**Figura 5** – Estrutura química da cisplatina (Retirado de (Quintanilha *et al.*, 2017)).

A capacidade antitumoral subjacente à cisplatina deve-se principalmente à sua ligação ao DNA, Figura 6. A internalização deste fármaco ocorre através da membrana celular por difusão passiva. Outro mecanismo também reconhecido na regulação da captação da cisplatina para o interior da célula é pela proteína transmembranar transportadora de cobre I (CTR1, do inglês *copper transporter 1*) (Quintanilha *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2016). No citoplasma da célula, onde a concentração de iões cloreto é mais baixa, entre 3 e 20mM, em relação ao meio extracelular (com aproximadamente 100mM), o composto é hidrolisado, com substituição de um ou dois grupos cloro por moléculas de água (Brozovic, Ambriović-Ristov e Osmak, 2010; Galluzzi *et al.*, 2012; Quintanilha *et al.*, 2017). De seguida, a cisplatina interage com o DNA, preferencialmente na posição N7 da guanina e da adenina. Assim, as ligações cruzadas intra-cadeias e inter-cadeias com o DNA e a formação de complexos proteína e DNA são responsáveis pela inibição da sua síntese e transcrição, culminando em apoptose. A cisplatina pode também ligar-se a proteínas citoplasmáticas causando efeitos citotóxicos (Brozovic, Ambriović-Ristov e Osmak, 2010; Dasari e Tchounwou, 2014; Galluzzi *et al.*, 2012; Quintanilha *et al.*, 2017). Quando os danos provocados pela cisplatina são limitados, há indução do bloqueio do ciclo celular, principalmente nas fases S e G2 do ciclo celular, para que os mecanismos de reparação atuem de forma a prosseguir sem danos no DNA (Galluzzi *et al.*, 2012).



**Figura 6** – Mecanismo de ação da cisplatina. Ligações cruzadas formadas pela interação da cisplatina com o DNA: (a) ligação intra-cadeia 1,2-GpG; (b) ligação intra-cadeia 1,2-ApG; (c) ligação com DNA e proteína; (d) ligação inter-cadeia com guaninas; (e) ligação intra-cadeia 1,3-GpXpG. As ligações representadas em (a) são as mais frequentes. Esquema elaborado com recurso a smart.servier.com.

A quimioterapia à base de cisplatina tem sido associada a vários efeitos adversos, tais como nefrotoxicidade, ototoxicidade, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, gastrotoxicidade e mielosupressão (Dasari e Tchounwou, 2014; Galluzzi *et al.*, 2012; Thakur *et al.*, 2009). Os rins são o principal órgão responsável pela excreção de cisplatina, sendo que esta é eliminada pela filtração glomerular e secreção tubular. A nefrotoxicidade é uma das principais manifestações de toxicidade nos doentes com este tratamento, que limita a aplicação clínica da cisplatina em 25 a 35% dos doentes (Dasari e Tchounwou, 2014; Quintanilha *et al.*, 2017). A nível cardiovascular, a peroxidação lipídica das membranas cardíacas é um dos principais efeitos cardiotóxicos da cisplatina (Dasari e Tchounwou, 2014). A ototoxicidade tem-se manifestado principalmente em doentes mais jovens com perda de audição ou zumbidos nos ouvidos (Dasari e Tchounwou, 2014).

Apesar do sucesso terapêutico da cisplatina, o seu uso apresenta algumas limitações, além dos seus efeitos adversos, a resistência a este agente quimioterapêutico também se verifica entre doentes de cancro (Galluzzi *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2016). Deste modo, a resistência à cisplatina pode ser intrínseca ou adquirida. Alguns mecanismos moleculares associados à resistência à cisplatina são a redução da acumulação intracelular dos compostos de platina, aumento do efluxo da cisplatina, aumento da reparação dos danos no DNA, inativação da cisplatina pela ligação à GSH e decréscimo da morte celular por apoptose

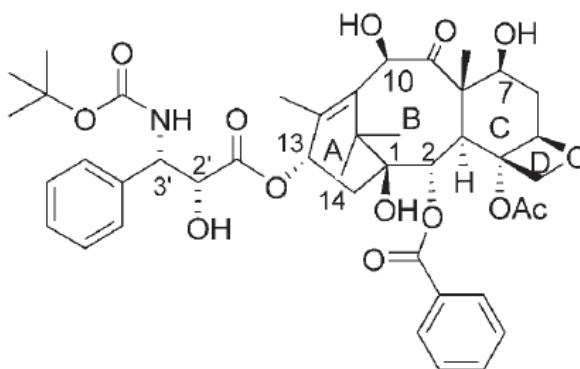
(Brozovic, Ambriović-Ristov e Osmak, 2010; Dasari e Tchounwou, 2014; Zhu *et al.*, 2016). A redução da acumulação intracelular de cisplatina pode ser uma das principais causas para a resistência a esta platina. Uma menor captação da cisplatina resulta na redução da formação de aductos entre o DNA e a cisplatina. Este mecanismo de resistência tem sido observado em linhas do cancro do colo do útero, nomeadamente em células HeLa, com resistência adquirida à cisplatina (Zhu *et al.*, 2016).

De entre os vários análogos da cisplatina, testados para fins terapêuticos, a carboplatina demonstrou ser mais vantajosa que a cisplatina, sendo atualmente usada na clínica. A carboplatina é um agente quimioterapêutico usado no tratamento de alguns cancros, nomeadamente o cancro do ovário, do pulmão e da cabeça e pescoço (Dasari e Tchounwou, 2014). A sua atividade bioquímica e antitumoral é semelhante à da cisplatina, mas apresenta menor toxicidade, nomeadamente reduzida nefrotoxicidade. No entanto, o tratamento com carboplatina associa-se a um maior risco de mielosupressão, com diminuição da produção de células sanguíneas pela medula óssea (Xue *et al.*, 2018). Além disso, a taxa de excreção da carboplatina é muito menor que a da cisplatina, permanecendo mais tempo no organismo, com um tempo de semi-vida de 30 horas em comparação com as 1,5 a 3,6 horas da cisplatina (Dasari e Tchounwou, 2014). No entanto, a carboplatina, em terapia isolada, é menos eficaz do que a cisplatina, sendo necessário administrar maior concentração para obter o mesmo efeito (Dasari e Tchounwou, 2014). A carboplatina quando combinada com o paclitaxel demonstra eficácia semelhante à cisplatina no tratamento do cancro do colo do útero recorrente ou metastático (Xue *et al.*, 2018). Na radioterapia combinada com quimioterapia, a cisplatina é correntemente usada, melhorando a eficácia da radiação. No entanto, os seus efeitos adversos bem como doentes com contraindicação para este fármaco como, por exemplo, doentes com disfunção renal, evidenciam a necessidade de uma opção terapêutica alternativa. Assim, a carboplatina concomitante com radioterapia pode ser uma potencial opção, com eficácia e reduzida toxicidade com um regime semanal (Xue *et al.*, 2018).

De forma a contornar a resistência associada ao tratamento com cisplatina, a aplicação desta combinada com outro agente quimioterapêutico é uma opção terapêutica promissora no tratamento do cancro, incluindo o do colo do útero (Dasari e Tchounwou, 2014; Eskander e Tewari, 2014). Para além da quimioterapia padrão com base em cisplatina ou em alternativa, a carboplatina, outros compostos têm sido estudados para o tratamento do cancro do colo do útero avançado ou recorrente (Eskander e Tewari, 2014). Por exemplo, vários estudos têm incluído o docetaxel na quimiorradioterapia, inclusivamente na

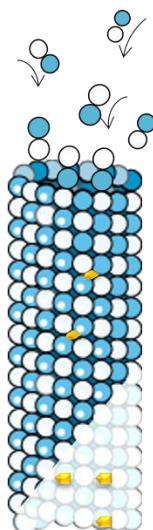
quimioterapia com base em cisplatina seguida de radioterapia. Os resultados obtidos sugerem o potencial uso do docetaxel no tratamento do cancro do colo do útero avançado (Alvarez *et al.*, 2009; Ke *et al.*, 2012; Pu *et al.*, 2013).

O docetaxel é um taxano correntemente utilizado no tratamento do cancro, incluindo o cancro do ovário, da mama, da cabeça e pescoço, do pulmão e da próstata (Galletti *et al.*, 2007). Este composto apresenta um anel de taxano complexo ligado a um éster na posição C13, Figura 7 (Rowinsky e Eric, 1997).



**Figura 7** - Estrutura química da cisplatina (Retirado de (Galletti *et al.*, 2007)).

Os taxanos atuam como promotores da polimerização dos microtúbulos, Figura 8 (Clarke e Rivory, 1999). O docetaxel atua como estabilizador de microtúbulos, impedindo a sua dinâmica e despolimerização, induzindo o bloqueio da mitose, culminando na morte celular por apoptose (Choy, 2000; Galletti *et al.*, 2007). O mecanismo de ação dos taxanos nas células induz a inibição da proliferação celular, pelo bloqueio na fase G2/M do ciclo celular, mais precisamente, na metáfase/anáfase (Choy, 2000; Rowinsky e Eric, 1997).



**Figura 8** – Mecanismo de ação do docetaxel. Interação do docetaxel com a tubulina na formação dos microtúbulos, promovendo a sua polimerização e atuando como estabilizador. Esquema elaborado com recurso a smart.servier.com.

O tratamento com docetaxel apresenta efeitos adversos nos doentes a este submetidos. Um dos seus principais efeitos tóxicos é a mielossupressão, que se manifesta maioritariamente pela neutropenia reversível. A incidência da neutropenia grave parece ser dependente da concentração de docetaxel aplicada, sendo que é menos pronunciada com baixas concentrações deste fármaco (Rowinsky e Eric, 1997). Outra reação adversa é a hipersensibilidade, que é manifestada por cerca de 33% dos doentes que recebem docetaxel sem pré-medicação. A incidência e a severidade destas reações pode ser controlada por pré-medicação com corticosteroides e anti-histamínicos (Rowinsky e Eric, 1997). A retenção de líquidos e o aparecimento de edemas pode ocorrer no tratamento com este fármaco, devido provavelmente ao aumento da permeabilidade capilar. De forma a contornar esta situação recorre-se a diuréticos que são relativamente eficazes. Para além disso, o uso de concentrações mais baixas de fármaco pode reduzir a incidência deste efeito (Rowinsky e Eric, 1997). A toxicidade cutânea pode ser outra manifestação do tratamento, e surge em 50 a 75% dos doentes (Rowinsky e Eric, 1997). Para além disso, a neurotoxicidade periférica bem como vômitos e diarreia podem manifestar-se em doentes sujeitos a tratamento com docetaxel (Rowinsky e Eric, 1997).

Apesar da melhor qualidade de vida e sobrevivência global das doentes tratadas com taxanos, o desenvolvimento de resistência celular representa uma limitação do seu uso na clínica. Assim, os dois principais mecanismos envolvidos na resistência aos taxanos são a expressão do fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (MDR, do inglês *multidrug resistance*) e alterações nos alvos celulares destes compostos, nomeadamente no sistema tubulina/microtúbulo (Galletti *et al.*, 2007). A MDR envolve a amplificação de glicoproteína-P



da membrana, que funciona como bomba de efluxo de fármacos, promovendo a resistência a taxanos (Rowinsky e Eric, 1997). Para além disso, a presença de alfa e beta tubulina, com défice na capacidade de polimerização em microtúbulos, em alguns tumores torna-os resistentes à ação deste grupo de fármacos (Rowinsky e Eric, 1997).

A associação da quimioterapia com base em docetaxel com a radioterapia tem demonstrado melhorar os efeitos citotóxicos da radiação em ensaios *in vitro*, tal pode dever-se à ação do docetaxel na inibição da progressão do ciclo celular nas fases mais radiosensíveis do ciclo (Choy, 2000; Rowinsky e Eric, 1997). Deste modo, os taxanos, como o docetaxel, combinados com outros fármacos ou com radioterapia podem causar menor toxicidade, apresentando potencial no tratamento do cancro (Choy, 2001).

## **Objetivos**



O cancro do colo do útero é um dos mais frequentes nas mulheres, tendo um grande impacto principalmente nos países em desenvolvimento. Apesar da eficácia da terapêutica, que consiste em cisplatina e/ou radioterapia em cancro localmente avançado, a resistência e os efeitos secundários da cisplatina enfatizam a necessidade de estabelecer novos regimes terapêuticos. Vários estudos sugerem o docetaxel como um potencial fármaco a incluir no tratamento de quimioterapia com base em cisplatina concomitante à radioterapia ou como um novo plano terapêutico composto por docetaxel seguido de radioterapia, para o tratamento deste cancro.

O principal objetivo deste trabalho foi estudar o efeito citotóxico de diferentes abordagens terapêuticas numa linha celular de adenocarcinoma do colo do útero, nomeadamente da cisplatina, do docetaxel e da radiação ionizante. Deste modo, e como objetivos secundários, este trabalho pretendeu avaliar o efeito citotóxico de diferentes concentrações de cisplatina e docetaxel e de várias doses de radiação recorrendo a ensaios de proliferação e de sobrevivência celulares, bem como a ensaios de viabilidade e tipo de morte e progressão do ciclo celular. Alterações dos níveis de stresse oxidativo e efeito do inibidor do radical hidroxilo, manitol, nas células HeLa também foram alvo de estudo.



## **Materiais e Métodos**



Os estudos *in vitro* permitiram avaliar o efeito de diferentes regimes terapêuticos no cancro do colo do útero. Para tal, estudou-se a resposta das células HeLa à terapia com cisplatina e com docetaxel e à terapia com radiação ionizante, raio-X, através de ensaios de citotoxicidade. Deste modo, avaliou-se a proliferação e a sobrevivência celulares e, para além disso, foi analisada a viabilidade e consequentemente o tipo de morte induzida, a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular, a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive oxygen species*) e as defesas antioxidantes.

## **Cultura de células**

Neste estudo utilizou-se a linha celular HeLa (ATCC® CCL-2™) que foi estabelecida a partir de tecido do colo do útero de uma mulher de etnia negra de 31 anos de idade com adenocarcinoma do colo do útero. Esta linha caracteriza-se por conter sequências do HPV 18, uma baixa expressão da proteína P53 e níveis normais de RB. A linha celular em estudo foi cedida ao Instituto de Biofísica pela Professora Doutora Carmen Lima, investigadora da Universidade de Campinas do Estado de São Paulo, Brasil.

Primeiramente, a linha foi descongelada e propagada em cultura celular aderente. As células HeLa foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma, D5648), a um pH de 7,4, com 250µM piruvato de sódio (Gibco 11360-039), 1 % de antibiótico (100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 0,25µg/mL de anfotericina B, Sigma A5955) e suplementado a 5% de soro fetal bovino (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*, Sigma F7524), e foram mantidas numa atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), a 37°C numa incubadora *Binder* (Binder®, CB 60).

A manutenção celular realizada duas vezes por semana seguiu o protocolo de culturas aderentes *in vitro* em condições assépticas. De forma a realizar todas as experiências, as células foram destacadas do frasco obtendo-se uma suspensão celular. Para tal, retirou-se o meio de cultura do respetivo frasco, procedeu-se à lavagem das células com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*), constituído por 137mM de cloreto de sódio (Sigma S7653), 2,7mM de cloreto de potássio (Sigma P9333), 0,8mM de fosfato de sódio monohidratado (Sigma S9638), 1,5mM de fosfato de potássio monobásico (Sigma P0662) e 0,54mM de EDTA (Ameresco M101), ajustado a pH de 7,4, a fim de remover o meio que ainda restou, e de seguida incubaram-se as células com 2 mL de solução tripsina (solução tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma T4049)), durante 5 minutos a 37°C. Após a visualização ao microscópio ótico invertido (Nikon Eclipse TS 100) e a confirmação do



destacamento celular, adicionaram-se 5 mL de meio de cultura a fim de inativar a ação da enzima. Posteriormente, procedeu-se à contagem do número de células da suspensão celular obtida, em que uma amostra de suspensão celular corada com igual volume de uma solução de azul tripano (0,02%) foi colocada numa câmara de *neubauer* e observada num microscópio ótico invertido numa ampliação de 100x. Para a realização dos vários ensaios, a suspensão celular foi ajustada consoante a concentração pretendida.

### **Tratamento com cisplatina e docetaxel**

Neste trabalho estudou-se o efeito antiproliferativo e citotóxico da cisplatina (1mg/mL TEVA) e do docetaxel (20mg/mL Docetaxel Aurovitas), cedidos pela Farmácia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), na linha celular HeLa. Para tal, avaliou-se a proliferação celular, por quantificação do conteúdo proteico total através do ensaio sulforrodamina B (do inglês *sulforhodamine B*), analisou-se a viabilidade e tipos de morte celular induzidos, assim como alterações no ciclo celular e o estado de stresse oxidativo, por citometria de fluxo. Os ensaios referidos encontram-se descritos posteriormente.

Para realização do ensaio SRB (do inglês *sulforhodamine B*), as células foram previamente incubadas com os fármacos em estudo. Para tal, foi preparada uma suspensão celular de concentração  $0,05 \times 10^6$  células/mL e adicionaram-se 500µL da mesma por poço, em placas de 48 poços (Costar 3548). De seguida, incubaram-se as células com concentrações crescentes de fármaco, nomeadamente entre 0,5 e 33µM de cisplatina e entre 0,01 e 180nM de docetaxel, diluídos em soro fisiológico e em água ultra-pura estéril, respetivamente, durante 24, 48 e 72 horas. Durante o tempo de incubação, as placas foram mantidas em condições húmidas com 95% de ar e 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), a 37°C numa incubadora Binder.

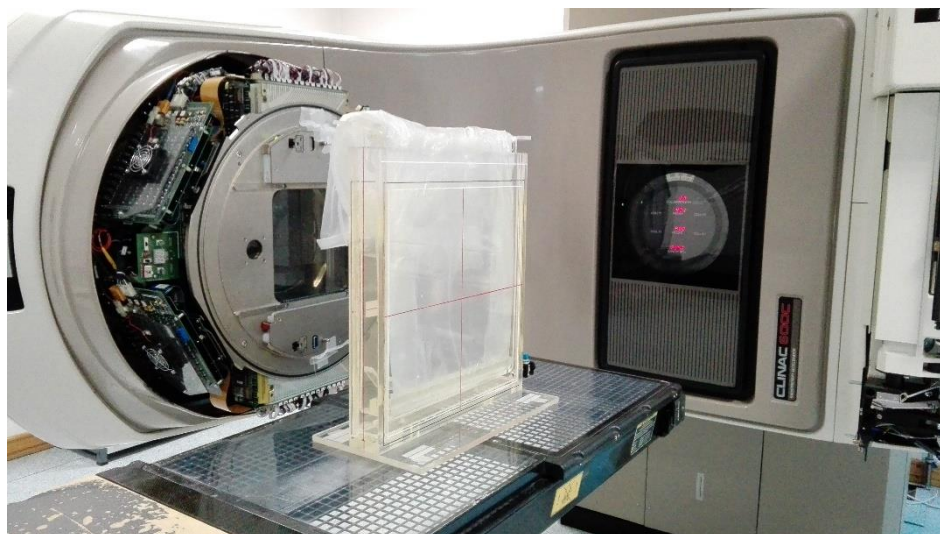
Para ensaios de análise de viabilidade e tipos de morte celular induzidos, análise de alterações no ciclo celular e do estado de stresse oxidativo celular recorreu-se à técnica de citometria de fluxo. Neste caso, as células foram incubadas com três concentrações diferentes dos respetivos fármacos, sempre na presença de um controlo sem tratamento. A primeira concentração corresponde a uma concentração de fármaco com baixo efeito na inibição da proliferação celular, nomeadamente, a concentração que corresponde ao valor de IC<sub>20</sub>, concentração de fármaco inibitória da proliferação celular em 20%. A segunda concentração corresponde à concentração de fármaco inibitória de 50% da proliferação celular, IC<sub>50</sub> (do inglês *Half maximal inhibitory concentration*). E por fim, a última concentração

apresenta uma maior capacidade de inibição da proliferação celular, nomeadamente o IC<sub>80</sub>, concentração de fármaco com capacidade inibitória de 80% da proliferação celular. Após 48 horas de incubação com os valores de IC<sub>20</sub>, de IC<sub>50</sub> e de IC<sub>80</sub> de cisplatina e de docetaxel, numa atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, procedeu-se ao desenvolvimento dos ensaios referidos.

### **Tratamento com radiação ionizante**

Com o objetivo de avaliar qual o efeito da radiação ionizante na linha celular HeLa, nomeadamente na sobrevivência celular, viabilidade e tipo de morte induzidos, bem como o efeito na produção de espécies reativas de oxigénio e defesas antioxidantes procedeu-se à irradiação desta linha celular. Previamente à irradiação, procedeu-se ao destacamento das células, que crescem em monocamada aderente, a fim de obter uma suspensão celular com uma concentração de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, no volume necessário para a realização dos ensaios pretendidos. As suspensões celulares foram irradiadas em *eppendorfs* e em todas as irradiações realizadas em dias independentes houve o cuidado de perfazer os *eppendorfs* até ao volume máximo, de modo a não conter ar aquando da irradiação. As doses de irradiação utilizadas foram entre 0,5 e 10Gy para o ensaio clonogénico, enquanto a dose de 2Gy, a dose correspondente à DL<sub>50</sub> e a dose de 10Gy foram as utilizadas para os ensaios de viabilidade e morte celular, de produção de espécies reativas de oxigénio e defesas antioxidantes, que foram realizados 48 horas após irradiação das células. Para cada irradiação foi realizado um controlo, em que as células foram submetidas exatamente às mesmas condições e procedimentos que as células irradiadas, com exceção da irradiação.

A irradiação celular foi realizada recorrendo a uma caixa previamente desenhada e desenvolvida, feita em acrílico com paredes de 1 cm de espessura que garante uma irradiação reprodutível, fiável e homogénea da dose em todo o volume, onde foram colocadas as amostras, Figura 9 (Mendes, 2016).



**Figura 9** – Fotografia da caixa de irradiação utilizada para irradiação das células, juntamente com o acelerador *Varian Clinac 600C*.

Esta caixa é utilizada juntamente com o acelerador linear, Figura 9, permitindo um posicionamento e acondicionamento reproduzíveis e fiáveis. Deste modo, o acelerador linear utilizado para a irradiação foi o acelerador *Varian Clinac 600C* (Varian, California, EUA), que foi utilizado na rotina clínica de tratamento de radioterapia do Serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). Antes de se iniciar a sessão de irradiação, a caixa é colocada sobre o tampo da mesa de tratamento e posicionada com os seus eixos longitudinais e latitudinal paralelamente com os eixos do feixe. Posteriormente, colocaram-se os *eppendorfs* com as suspensões celulares para as diferentes doses no interior da caixa, que foram submersos em água à temperatura de 37°C, de forma a garantir a homogeneidade da dose recebida pelas células. As células controlo são mantidas fora da sala durante todo o processo de irradiação. Assim, garantidas todas as especificações acima descritas prossegue-se com a sessão de irradiação com raios-X de energia de 4 MeV (Mega electrão-Volt). A deposição da dose foi realizada de forma faseada, com a *gantry* posicionada a 90° e posteriormente a 270°, para uma deposição da dose completa, perfazendo o total pretendido. As doses são depositadas em unidades motoras (MU de *Monitor Units*). A primeira dose corresponde assim a 0,5Gy, sendo que após irradiação nos dois ângulos, o *eppendorf* correspondente a esta dose foi retirado da caixa de irradiação e foram mantidos os restantes. Deste modo, este processo foi repetido até se completarem as doses pretendidas por irradiação cumulativa. As doses administradas nas células encontram-se descritas na Tabela II. Findo o processo de irradiação celular procedeu-se com a realização dos ensaios já nomeados.

**Tabela II** - Doses administradas nas amostras na caixa de irradiação, sendo que a dose é completa por acumulação e deposição faseada (MU – Monitor units).

	<b>0,5Gy</b>	<b>1Gy</b>	<b>1,5Gy</b>	<b>2Gy</b>	<b>3Gy</b>	<b>4Gy</b>	<b>6Gy</b>	<b>8Gy</b>	<b>10Gy</b>
<b>90°</b>	23 MU	23 MU	23 MU	23 MU	46 MU	92 MU	92 MU	92 MU	92 UM
<b>270°</b>	23 MU	23 MU	23 MU	23 MU	47 MU	93 MU	93 MU	93 MU	93 UM

### **Citotoxicidade celular**

Neste trabalho, com o objetivo de estudar o efeito das diferentes terapias, cisplatina, docetaxel e radiação ionizante, no cancro do colo do útero, avaliou-se a citotoxicidade dos tratamentos. Para tal, recorreu-se à avaliação da proliferação e sobrevivência celulares, viabilidade e tipos de morte induzidos, alterações no ciclo celular e ainda o estado de stresse oxidativo das células.

#### **Avaliação da proliferação celular pelo ensaio SRB**

De forma a avaliar o efeito antiproliferativo da cisplatina e do docetaxel na linha celular HeLa procedeu-se à realização do ensaio sulforodamina B (SRB) que permite avaliar a massa total proteica através da ligação deste composto, em condições ácidas, aos resíduos de aminoácidos da proteína indicando o conteúdo proteico celular, que está relacionado com o número total de células. Este ensaio, quando comparado com outros, demonstra maior sensibilidade e reprodutibilidade, bem como um menor custo. O ensaio SRB foi desenvolvido com o intuito de avaliar a citotoxicidade induzida por fármacos (Voigt, 2005).

Após o respetivo período de incubação de 24, 48 ou 72 horas com os respetivos fármacos, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS. Seguidamente, procedeu-se à fixação das mesmas com 200 µL de ácido acético 1% (Sigma 33209) em metanol (Sigma 32213), incubando-se durante duas horas a 4°C. Decorrido o tempo, descartou-se a solução fixadora e deixou-se secar a placa à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionaram-se 200 µL de corante SRB (solução de SRB a 0,5% (Sigma S9012) em ácido acético a 1%) e incubou-se por uma hora, protegido da luz e à temperatura ambiente. Findo o tempo, lavou-se a placa com água corrente, de forma a eliminar o excesso de SRB, e, após a secagem da placa, adicionaram-se 200 µL de Tris-NaOH a 10 mM (pH=10), de forma a dissolver o corante ligado aos aminoácidos. Por fim, após a passagem das

soluções obtidas para uma placa de 96 poços (Costar 3596), efetuou-se a leitura da absorvância com um comprimento de onda de 540nm com um filtro de referência a 690nm recorrendo a um espetofotómetro de ELISA (Biotek® Synergy HT). Os resultados obtidos foram expressos em percentagem de inibição de proliferação celular normalizada ao controlo. Deste modo, foi possível obter uma curva de concentração-resposta, com determinação da concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>), bem como do IC<sub>20</sub> e do IC<sub>80</sub>. O valor de IC<sub>50</sub> é utilizado como uma medida de citotoxicidade *in vitro*. Os ensaios subsequentes foram avaliados após 48 horas de ação do fármaco nas concentrações correspondente aos valores de IC<sub>20</sub>, de IC<sub>50</sub> e de IC<sub>80</sub> (Vichai e Kirtikara, 2006; Voigt, 2005).

### **Avaliação da sobrevivência celular pelo ensaio clonogénico**

Com o objetivo de avaliar a sobrevivência celular após tratamento com radiação ionizante procedeu-se à realização do ensaio clonogénico, *gold standard* para avaliação de efeitos da radiação. Este ensaio baseia-se na capacidade de uma única célula dar origem a uma colónia de células, sendo estas contabilizadas quando apresentam pelo menos 50 células. Deste modo, recorreu-se a este ensaio para avaliar a agressão induzida pela radiação ionizante e para determinar a sobrevivência celular após as diferentes doses, a fim de obter a dose letal média (DL<sub>50</sub>), ou seja a dose em que 50% da população de células perde a viabilidade e/ou a capacidade proliferativa (Franken *et al.*, 2006; Rafahi *et al.*, 2011).

Para a realização do ensaio clonogénico, procedeu-se previamente ao revestimento de placas de 6 poços (Costar 3516) com poli-D-lisina (Sigma P6407), de forma a permitir uma maior aderência das células ao fundo do poço. Para tal, preparou-se uma solução de poli-D-lisina (0,1 mg/mL), eluindo em 50 mL de água ultra-pura estéril. De seguida, distribuiu-se 1 mL desta solução por poço e deixou-se atuar por 10 minutos. Findo o tempo, precedeu-se à lavagem dos poços com água ultra-pura estéril, a fim de remover o excesso de poli-D-lisina. Por fim, as placas, expostas à luz UV (ultravioleta), permaneceram *overnight* a secar e foram seladas e armazenadas a 4°C até uso posterior.

Posteriormente, um número conhecido de células foi semeado por poço, sendo feito em triplicado para cada dose de radiação. O número de células semeadas encontra-se descrito na Tabela III.

**Tabela III** - Número de células semeadas após irradiação de acordo com a dose.

	CT	0,5Gy	1Gy	1,5Gy	2Gy	3Gy	4Gy	6Gy	8Gy	10Gy
Nº de células semeadas	1200	1200	1200	1200	1200	1400	1400	1600	1600	2500

Após semear as células foram adicionados 3 mL de meio DMEM suplementado com 10% de FBS em cada poço. As placas foram incubadas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 10 dias. Durante o tempo do ensaio foi realizada a manutenção, com troca de meio de cultura por duas vezes.

Findo o tempo de crescimento celular descartou-se o meio de cultura das placas e lavou-se cada poço com 2 mL de PBS 1x. De seguida, adicionaram-se 2 mL de metanol por poço e deixou-se a fixar por 20 minutos. Posteriormente, removeu-se o metanol e após a secagem das placas adicionaram-se 2 mL de solução violeta de cristal a 0,5% (Sigma C3836) em metanol, incubando-se por 5 minutos. Após este tempo, removeu-se o corante e procede-se à lavagem das placas agitando-as suavemente em água. Posteriormente, colocaram-se as placas a secar e procedeu-se à contagem das colónias com pelo menos 50 células. Desta forma, foi possível determinar a eficiência da placa (PE, do inglês *plate efficiency*) e o fator de sobrevivência (SF, do inglês *surviving factor*), como representado na Equação 1 e na Equação 2, respetivamente (Franken *et al.*, 2006; Rafehi *et al.*, 2011).

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

$$\text{Fator de sobrevivência} = \frac{\text{PE Amostras Tratadas}}{\text{PE Amostras Controlo}} \quad \text{Equação 2}$$

Deste modo, com os resultados obtidos traçou-se a curva dose-resposta, correlacionando o fator de sobrevivência celular com a dose de radiação ionizante. Os resultados obtidos foram ajustados a um modelo linear-quadrático como indicado na Equação 3, onde D corresponde à dose de radiação ionizante e  $\alpha$  e  $\beta$  representam os parâmetros linear e quadrático do ajuste, respetivamente.

$$\text{Fator de Sobrevivência (y)} = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad \text{Equação 3}$$

### **Análise da viabilidade e morte celular**

Com o objetivo de avaliar a viabilidade celular bem como o tipo de morte induzido pelos diferentes tratamentos em estudo na linha celular HeLa recorreu-se à citometria de fluxo e à análise morfológica por microscopia ótica.

Primeiramente, a viabilidade e a morte celulares foram determinadas através da dupla marcação com Anexina V (AV) com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC do inglês *Fluorescein isothiocyanate*) e iodeto de propídeo, por citometria de fluxo. Anexina V é uma proteína que tem a capacidade de se ligar a fosfolípidos aniônicos, como a fosfatidilserina. Células viáveis caracterizam-se por uma distribuição assimétrica dos fosfolípidos na bicamada lipídica, sendo que o folheto interno contém fosfatidilserina, enquanto o folheto externo apresenta fosfatidilcolina e esfingomiéline. Durante o processo apoptótico, com manutenção da integridade membranar, ocorre a translocação da fosfatidilserina do folheto interno para o externo, ficando exposta para ligação com Anexina V, permitindo assim a sua deteção (Heerde *et al.*, 2000; Telford, Tamul e Bradford, 2016). No entanto, em apoptose tardia as células, para além de apresentarem a fosfatidilserina no folheto externo da membrana, também demonstram comprometimento da integridade membranar, característica da morte por necrose. Deste modo, o corante iodeto de propídeo, que se liga aos ácidos nucleicos, e que, em condições de viabilidade, não tem capacidade de atravessar a bicamada lipídica, consegue facilmente intercalar com a molécula de DNA (Cevik e Dalkara, 2003; Crowley *et al.*, 2016; Elmore, 2007). Assim, através da dupla marcação por Anexina V e iodeto de propídeo é possível distinguir diferentes populações de células de acordo com a sua viabilidade ou tipo de morte segundo o perfil de marcação que apresentam, tal como resumido na Tabela IV. Desta forma, as células que se encontram viáveis caracterizam-se por não apresentarem qualquer marcação. As células em apoptose inicial apresentam marcação positiva somente para Anexina V, enquanto que o grupo de células em apoptose tardia/necrose apresentam dupla marcação para Anexina V bem como para iodeto de propídeo. E por fim, as células que se encontram em morte por necrose apresentam marcação negativa para Anexina V e positiva para iodeto de propídeo.

**Tabela IV** - Representação da marcação por Anexina V e iodeto de propídeo de acordo com a viabilidade celular.

	Anexina V	Iodeto de Propídeo
Células viáveis	-	-
Células em apoptose inicial	+	-
Células em apoptose tardia/necrose	+	+
Células em necrose	-	+

Para este ensaio, procedeu-se à preparação das suspensões celulares, numa concentração de  $1 \times 10^6$  células por condição em estudo em tubos de citometria (Sarstedt

55.1579) e centrifugou-se a 2500 rpm durante 5 minutos (Heraeus, Multifuge 1L-R). O *pellet* obtido foi ressuspensionado em PBS e centrifugado novamente. De seguida, após decantação do sobrenadante, adicionaram-se 100µL de tampão de ligação 1x, constituído por 139,9mM de cloreto de sódio (Sigma 7653), 7mM de Hepes (Sigma H7523) e 3,3mM cloreto de cálcio (Sigma C4901) e incubaram-se as células com 2,5µL de Anexina V (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Immunostep, Espanha) e 1µL de iodeto de propídeo por 15 minutos à temperatura ambiente mas protegido da luz. Findo o tempo, adicionou-se 400µL de tampão de ligação 1x e procedeu-se à leitura no citómetro (FACSCalibur, BD Biosystems, San Diego, USA), utilizando como comprimentos de onda de excitação 525nm para Anexina V-FITC e 640nm para o iodeto de propídeo. Os resultados obtidos foram expressos na forma de percentagem de células presentes em cada grupo de células.

Para além da análise da viabilidade e morte celular por citometria de fluxo também se realizou a caracterização morfológica pela coloração *May-Grünwald Giemsa*. Esta coloração permite a visualização geral da célula, em que os núcleos aparecem corados de vermelho a violeta e o citoplasma de rosa a azul (Gonçalves *et al.*, 2013).

Assim, foram realizados esfregaços das diferentes condições de tratamento em lâminas, que depois de secos ao ar, fixaram-se em metanol durante 5 minutos e de seguida submergiram-se as lâminas na solução *May-Grünwald* durante 3 minutos. Depois de retirar o corante, repetiu-se o processo na solução *Giemsa* durante 10 minutos. Por fim, lavaram-se as lâminas em água corrente durante 5 minutos e observaram-se ao microscópio ótico Olympus U-D30 (Olympus, Tokyo, Japão). As lâminas foram fotografadas recorrendo a uma câmara Olympus SC30 (Olympus, Tokyo, Japão).

### **Avaliação do ciclo celular**

O ciclo celular é um conjunto de fases pela qual a célula cresce, duplica o seu material genético e se divide dando origem a duas células-filhas idênticas entre si. Assim sendo, o ciclo celular divide-se em interfase, fase mitótica e citocinese. A primeira fase, interfase, é a mais longa, em que a célula cresce e duplica o seu DNA, compreendendo-se ainda em três fases: G1, fase de crescimento celular acompanhado de síntese de enzimas e RNA, S, caracterizada pela duplicação do material genético da célula, e G2, síntese de proteínas e organização dos centrossomas e dos microtúbulos para a fase mitótica. Posteriormente, na mitose ocorre a divisão nuclear e por fim dá-se a citocinese, com a divisão citoplasmática e individualização celular (Tessemá *et al.*, 2004). Deste modo, a fim de analisar a existência de alterações provocadas pelas diferentes concentrações de cisplatina e de docetaxel no ciclo



celular das células HeLa, procedeu-se à análise da distribuição das células nas fases do ciclo celular.

Para o estudo do ciclo celular procedeu-se à centrifugação das suspensões celulares, com uma concentração celular de  $1 \times 10^6$  células por condição, a 2500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, após descartar o sobrenadante, adicionaram-se ao *pellet* 200 $\mu$ L de etanol a 70% com o tubo de citometria em constante agitação no vortex e incubou-se por 30 minutos a 4°C ao abrigo da luz. Terminado o tempo, 2mL de PBS foram adicionados e realizou-se nova centrifugação, a 2500 rpm por 5 minutos. De seguida, decantou-se o sobrenadante e adicionaram-se 200 $\mu$ L da solução iodeto de propídeo (IP/Solução de RNase) (Immunostep, S.L., Salamanca, Espanha), agitou-se suavemente no vortex e incubou-se por 15 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. Findo o tempo, a leitura no citómetro utilizando como comprimento de onda de excitação 488nm.

### **Análise do stresse oxidativo celular**

Com o objetivo de avaliar o efeito dos diferentes tratamentos no stresse oxidativo celular recorreu-se à técnica de citometria de fluxo avaliando a produção intracelular de peróxidos, através da sonda DCFH<sub>2</sub>-DA (do inglês *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*), e a produção intracelular do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), através da sonda DHE (do inglês *dihydroethidium*). Para avaliar as defesas antioxidantes, mais precisamente a expressão do glutationa reduzida (GSH), recorreu-se à marcação com alaranjado de mercúrio. Por fim, com o objetivo de analisar a formação de radical hidroxilo, de forma a perceber se estaria implicado na citotoxicidade dos fármacos, estudou-se o efeito do inibidor manitol em combinação com cisplatina e com docetaxel na proliferação celular.

### **Avaliação dos níveis intracelulares de peróxidos**

De modo a avaliar a produção intracelular de peróxidos nas células tratadas comparativamente às células controlo incubaram-se as células com a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA, pois apesar de não ser fluorescente, é lipossolúvel e atravessa a membrana das células, devido à presença de grupos acetatos. Assim, ocorre a sua acumulação no citosol, sendo desacetilado por ação de esterases intracelulares sob a forma de DCFH (do inglês *2',7'-dichlorodihydrofluorescein*). Posteriormente, este produto é oxidado por peróxidos intracelulares, formando-se DCF (do inglês *2',7'-dichlorofluorescein*), que é altamente fluorescente. DCF emite fluorescência no comprimento de onda de 530nm quando excitada

a 488nm. Deste modo, a fluorescência obtida é proporcional à concentração de peróxidos intracelulares, nomeadamente do peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) (O'Malley *et al.*, 2004; Brömme *et al.*, 2008). Assim, para proceder à avaliação da produção de peróxidos intracelulares, centrifugou-se a suspensão celular de cada condição em estudo com aproximadamente  $1 \times 10^6$  células a 2500rpm por 5 minutos. Posteriormente, decantou-se o sobrenadante e adicionou-se 1mL de PBS 1x e incubou-se com 1 $\mu$ L de sonda DCFH<sub>2</sub>-DA (numa concentração final de 5 $\mu$ M) (Molecular Probes, Invitrogen, USA) dissolvido em dimetilformamida a 1mM, por 45 minutos a 37°C, protegido da luz. Terminado o tempo, adicionaram-se 2mL de PBS 1x e centrifugou-se a 2500rpm por 5 minutos. De seguida, descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 400 $\mu$ L de PBS 1x, homogeneizou-se no vortex e fez-se a leitura no citómetro, com um comprimento de onda de excitação de 504nm e de emissão de 529nm. Os resultados obtidos são apresentados sob a forma de média das intensidades de fluorescência (MIF) obtidas.

### **Avaliação da produção intracelular do radical superóxido**

Com o objetivo de avaliar a produção intracelular do radical superóxido, utilizou-se a sonda dihidroetídeo (DHE). DHE atravessa facilmente a membrana celular, sendo posteriormente oxidada a etídeo, pelo radical superóxido. O etídeo é um composto que intercala no DNA e emite fluorescência de cor vermelha. Esta reação é específica para o radical superóxido com oxidação mínima induzida pelo peróxido de hidrogénio, peróxido de nitrito ou ácido hipocloroso (Tarpey *et al.*, 2004).

Para este procedimento, centrifugaram-se as suspensões celulares relativas a cada condição em estudo com cerca de  $1 \times 10^6$  células a 2500rpm por 5 minutos. Após decantar o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* em 1mL de PBS 1x e adicionaram-se 2,5 $\mu$ L de DHE conseguindo uma concentração final de 2,5 $\mu$ M (Sigma-Aldrich, USA). Após homogeneização no vortex, incubou-se por 15 minutos, protegido da luz a 37°C. Posteriormente, adicionaram-se 2 mL de PBS 1x e centrifugou-se a 2500rpm por 5 minutos. De seguida, adicionaram-se 400 $\mu$ L de PBS 1x e homogeneizou-se no vortex. Deste modo, fez-se a leitura no citómetro com um comprimento de onda de 620nm. Os resultados obtidos são apresentados sob a forma de média das intensidades de fluorescência.

### **Avaliação da expressão de glutathiona reduzida**

Glutathiona reduzida (GSH) é um antioxidante, que para além de conferir proteção às células de danos oxidativos não-específicos, bem como de radicais livres, oxidantes e eletrófilos, funcionando como dador de eletrões para a glutathiona peroxidase e glutaredoxina, reverte a sinalização pro-oxidativa mediada pelo peróxido de hidrogénio (McCarty *et al.*, 2018). A concentração de GSH nas células pode influenciar o efeito citotóxico de agentes quimioterapêuticos, bem como a sensibilidade à radioterapia (Rice *et al.*, 1986). Deste modo, a fim de avaliar a expressão de glutathiona reduzida nas células após tratamento, comparando com as células não submetidas a terapia recorreu-se à técnica de citometria de fluxo.

Para tal, utilizou-se o composto alaranjado de mercúrio. Assim, para deteção de GSH nas células, centrifugaram-se as suspensões celulares, com aproximadamente  $1 \times 10^6$  células, a 2500rpm por 5 minutos. De seguida, após decantar o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* em 1mL de PBS 1x e adicionou-se 1 $\mu$ L de alaranjado de mercúrio (concentração final de 40 $\mu$ M) (Sigma, EUA), homogeneizou-se no vortex e incubou-se 15 minutos a 37°C, protegido da luz. Findo o tempo, adicionaram-se 2mL de PBS 1x e centrifugou-se novamente. Posteriormente, adicionou-se 400 $\mu$ L de PBS 1x e, após homogeneização no vortex, fez-se a leitura no citómetro, utilizando como comprimento de onda de excitação 620nm. Os resultados obtidos são apresentados como média das intensidades de fluorescência obtidas para cada condição.

### **Avaliação da inibição do radical hidroxilo pelo manitol**

O manitol tem a capacidade de neutralizar o radical hidroxilo (OH $\bullet$ ) (Ding *et al.*, 2004), uma ROS altamente reativa que tem a capacidade provocar danos celulares, nomeadamente em proteínas, lípidos e DNA (Gill, Piskounova e Morrison, 2016). Assim, a fim de avaliar o efeito do radical hidroxilo na citotoxicidade causada pela cisplatina e pelo docetaxel utilizou-se o manitol, um inibidor desta ROS. De forma a perceber a influência deste radical na proliferação celular, como participante do mecanismo antiproliferativo dos fármacos recorreu-se ao ensaio SRB.

Para tal, as células foram semeadas numa concentração de  $0,05 \times 10^6$  células/mL num volume de 500 $\mu$ L por poço, em placas de 48 poços. De seguida, incubaram-se as células com concentrações crescentes de fármaco, nomeadamente entre 0,5 e 33 $\mu$ M de cisplatina e entre

0,01 e 180nM de docetaxel. Para além disso, as células foram tratadas com uma concentração fixa de manitol de 40mM (Sigma, M9647) durante 48 horas (Ding *et al.*, 2004). Durante este ensaio utilizaram-se dois controlos, o controlo negativo, sem administração de fármaco ou de manitol, e o controlo positivo, em que as células foram apenas tratadas com 40mM manitol. Findo o tempo de incubação, realizou-se o ensaio SRB, como descrito anteriormente, para determinar a proliferação celular. Os resultados conseguidos estão expressos em percentagem de inibição da proliferação, normalizada pelo controlo. Estabeleceram-se as respetivas curvas de concentração-resposta e determinaram-se os valores de IC<sub>20</sub>, de IC<sub>50</sub> e de IC<sub>80</sub>.

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do *software* IBM® SPSS® 24.0 (IBM Corporation, Armonk, Nova Iorque, EUA) e os gráficos recorrendo ao *GraphPad Prism* versão 5.0. Os resultados foram representados sob a forma de média e erro padrão.

Para a avaliação da normalidade de distribuição de variáveis quantitativas realizou-se o teste de Shapiro-Wilk e na avaliação da homogeneidade de variâncias utilizou-se o teste de Levene. Aplicaram-se testes paramétricos em caso de haver uma distribuição normal e homogeneidade de variâncias, e testes não paramétricos caso se tenha verificado o contrário.

As comparações entre as diferentes condições e o controlo em cada uma das condições terapêuticas avaliadas foram obtidas pelo teste *Analysis of Variance* (ANOVA) de um fator, em caso de haver distribuição normal e homogeneidade de variâncias, ou pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, em caso contrário. As comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Games-Howell, no caso de variâncias não presumidas, e pela correção de Bonferroni, no caso contrário.

Na análise dos resultados de proliferação celular, obtidos pelo ensaio SRB, foi utilizado o *software* OriginLab versão 9, aplicando um modelo sigmoidal de dose-resposta, representado na Equação 4.

$$\text{Proliferação (\%)} = A1 + \frac{A2 - A1}{1 + 10^{(\log x_0 - x)^p}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde A1 e A2 correspondem às assíntotas da curva,  $x_0$  corresponde ao valor da concentração inibitória de 50% da proliferação (IC<sub>50</sub>). A curva de sobrevivência, baseada no

ensaio clonogénico, foi conseguida através do modelo linear quadrático (Fator de Sobrevivência  $(y) = e^{-\alpha D - \beta D^2}$ ), através do software *GraphPad Prism* versão 5.0.

Em todas as comparações foi considerada uma significância de 0,05.

## **Resultados\***

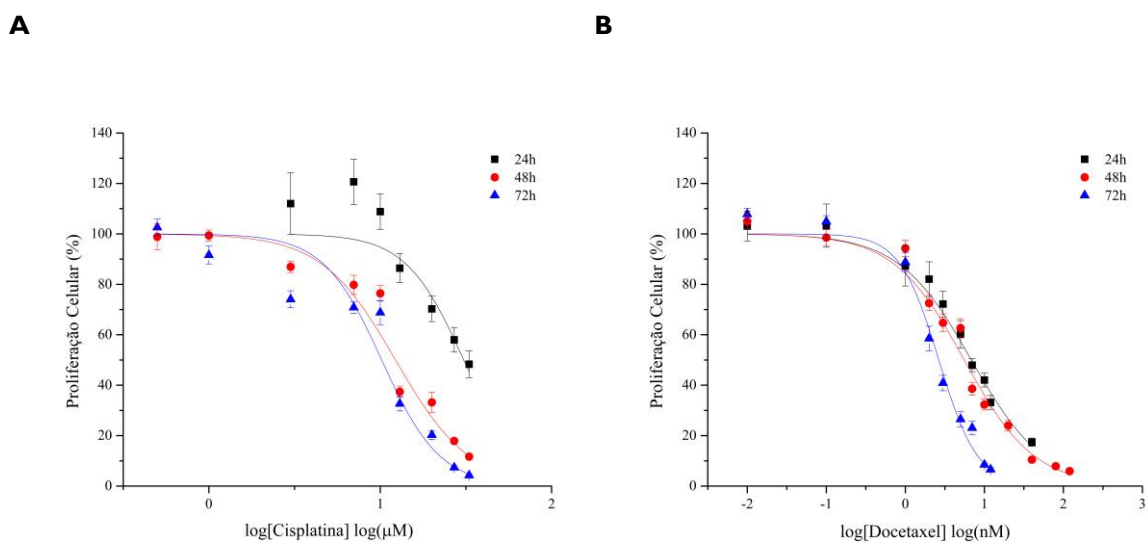
\*Os resultados abaixo representados foram obtidos em colaboração com André Salvada, Paulo Teixeira e Simone Graça.



Os ensaios de citotoxicidade permitiram analisar o efeito da cisplatina, do docetaxel e da radiação ionizante na linha celular HeLa. Deste modo, avaliou-se a proliferação celular pelo ensaio SRB, após tratamento com ambos os fármacos em estudo. A agressão da radiação ionizante às células foi avaliada pela capacidade de sobrevivência celular após exposição aos raios-X. Por fim, através de citometria de fluxo e análise morfológica analisou-se a viabilidade e tipo de morte celular induzidas, bem como as alterações no ciclo celular e a formação de espécies reativas de oxigénio e as defesas antioxidantes após tratamento.

## Proliferação Celular

De forma a averiguar a capacidade de proliferação celular da linha HeLa quando exposta a concentrações crescentes de cisplatina e de docetaxel durante 24, 48 e 72 horas de incubação, recorreu-se à avaliação do conteúdo proteico total, através do ensaio de sulforrodamina B. Este ensaio permitiu a obtenção de uma curva de concentração-resposta, representada na Figura 10, a partir da qual se determinou a concentração inibitória média ( $IC_{50}$ , do inglês half inhibitory concentration) que corresponde à concentração de fármaco inibitória de 50% da proliferação celular, bem como dos valores de  $IC_{20}$  e  $IC_{80}$ , que correspondem à concentração de fármaco inibitória de 20% e de 80% da proliferação celular, respetivamente. Os resultados obtidos relativos às concentrações inibitórias encontram-se descritos na Tabela V.



**Figura 10** - Curva de concentração-resposta da linha celular HeLa após exposição a concentrações crescentes de cisplatina (A) e de docetaxel (B) durante 24, 48 e 72 horas. Os resultados exprimem a percentagem de proliferação celular em função do logaritmo da concentração de fármaco, apresentados na forma de média e erro padrão, obtidos em pelo menos quatro experiências independentes em triplicado.



Como descreve a Figura 10, ambos os fármacos têm a capacidade de inibir a proliferação celular de forma dependente da concentração nos diferentes tempos de incubação estudados. No tratamento com cisplatina observou-se uma diminuição da proliferação celular, em percentagem, com o aumento da concentração de fármaco estudado, Figura 10A. No entanto, esta inibição da proliferação foi menos acentuada no menor tempo de incubação, sendo que após 24 horas de exposição à cisplatina, a maior concentração testada apresentou baixa capacidade de inibição proliferativa, apenas cerca de 50%. Já considerando os tempos de incubação de 48 e 72 horas, observou-se uma inibição da proliferação celular superior a 85% na maior concentração de cisplatina. No que diz respeito ao tratamento com docetaxel, este apresentou uma maior capacidade de inibição da proliferação celular nas maiores concentrações testadas, tal como em tempos de exposição mais prolongados, Figura 10B.

Na Tabela V encontram-se descritos os valores de concentração inibitória (IC) para ambos os fármacos, obtidos pelas curvas de concentração-resposta apresentadas anteriormente.

**Tabela V** - Valores de IC<sub>20</sub>, de IC<sub>50</sub> e de IC<sub>80</sub> obtidos após incubação das células HeLa com cisplatina e docetaxel durante 24, 48 e 72 horas.

<b>Cisplatina</b>	24h	48h	72h
<b>IC<sub>20</sub> (μM)</b>	-	6,17±0,93	5,92±0,78
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	-	12,27±1,04	10,20±0,88
<b>IC<sub>80</sub> (μM)</b>	-	24,43±1,21	17,54±1,01
<b>R<sup>2</sup></b>	-	0,98	0,97
<b>Docetaxel</b>	24h	48h	72h
<b>IC<sub>20</sub> (nM)</b>	1,58±0,20	1,35±0,23	1,21±0,19
<b>IC<sub>50</sub> (nM)</b>	6,85±0,37	5,57±0,56	2,65±0,26
<b>IC<sub>80</sub> (nM)</b>	29,75±2,34	23,01±1,94	5,83±0,32
<b>R<sup>2</sup></b>	0,99	0,99	0,99

No que se refere ao tratamento com cisplatina, podemos verificar que a concentração inibitória de 20% da proliferação celular (IC<sub>20</sub>) às 48 horas de estudo foi de 6,17μM e às 72 horas foi de 5,92μM. Relativamente ao valor de IC<sub>50</sub>, este diminui com o aumento do período de incubação do fármaco. Em células expostas à cisplatina durante 48 horas, a

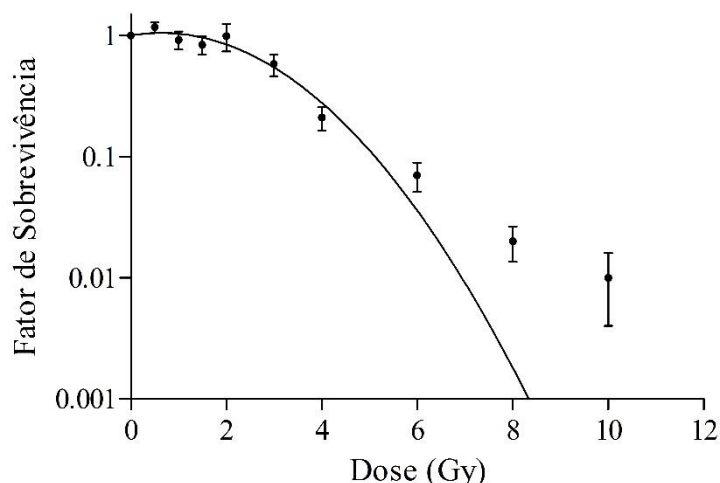
concentração inibitória média foi de  $12,27\mu\text{M}$ , superior à obtida às 72 horas ( $10,20\mu\text{M}$ ). Adicionalmente, a concentração inibitória de 80% da proliferação celular ( $\text{IC}_{80}$ ) no tempo de incubação de 48 horas ( $24,43\mu\text{M}$ ) foi superior ao valor obtido às 72 horas de estudo ( $17,54\mu\text{M}$ ) como sintetiza a Tabela V.

Analisando os valores de concentração inibitória média obtidos no tratamento com docetaxel, em períodos de incubação maiores houve uma diminuição do valor da concentração inibitória de 50% da proliferação celular comparativamente ao menor tempo de exposição. Pelo que, após 24 horas de docetaxel nas células HeLa, o valor de  $\text{IC}_{50}$  foi de  $6,85\text{nM}$ , enquanto que, após 48 horas de tratamento o valor de  $\text{IC}_{50}$  foi de  $5,57\text{nM}$ . Após 72 horas de tratamento com docetaxel, o valor de  $\text{IC}_{50}$  foi  $2,65\text{nM}$ , sendo inferior comparativamente às 48 horas e às 72 horas. O valor da concentração inibitória de 20% da proliferação celular não dependeu do tempo de incubação com o docetaxel, ao contrário do que se sucedeu com o valor de  $\text{IC}_{80}$ , que foi maior no menor tempo de estudo e que diminuiu com o aumento dos tempos de incubação com docetaxel, Tabela V.

### **Sobrevivência celular**

De forma a avaliar a agressão celular causada pela radiação ionizante, raios-X, na capacidade de sobrevivência das células HeLa realizou-se o ensaio clonogénico. Este ensaio permite avaliar o efeito do tratamento na sobrevivência celular, ou seja, na capacidade de células únicas formarem colónias com pelo menos 50 células (Franken *et al.*, 2006). Através deste ensaio obteve-se uma curva que traduz o fator de sobrevivência em função da dose de radiação (Gy).

A Figura II representa a curva de sobrevivência celular após exposição à irradiação, cujas doses de radiação compreenderam entre  $0,5\text{Gy}$  e  $10\text{Gy}$ . A curva de sobrevivência celular foi estabelecida de acordo com o modelo que apresentou o melhor ajuste, o modelo linear-quadrático com um valor de  $R^2$  de 0.90.



**Figura 11** – Curva de sobrevivência celular obtida após agressão celular por irradiação das células HeLa. Os resultados foram obtidos através do ensaio clonogénico e estão expressos na forma de média e erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. A curva foi ajustada ao modelo linear-quadrático.

Os resultados evidenciam uma diminuição da sobrevivência celular a partir da dose de 2Gy, havendo uma diminuição acentuada da mesma em doses de radiação mais elevadas, Figura 11. Com esta curva foi possível determinar a dose letal média ( $DL_{50}$ ) que foi de 3,15Gy (IC 2,54; 4,09), Tabela VI.

**Tabela VI** – Valores dos parâmetros do modelo linear-quadrático e da dose letal média obtidos.

P	V±EP	R <sup>2</sup>	$\alpha/\beta$ (Gy)	$DL_{50}$ (Gy)
$\alpha$	-0,15± 0,03	0,90	-1,28	3,15
$\beta$	0,12± 0,01			

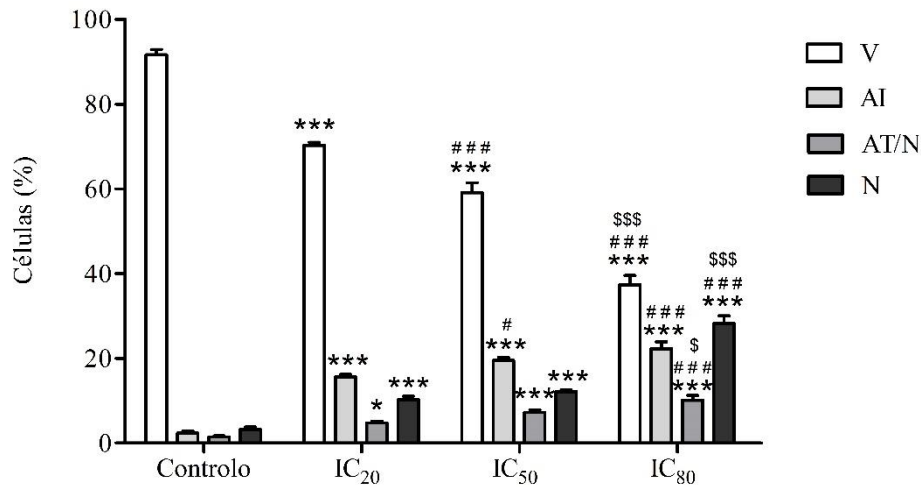
Legenda: P, parâmetro; V, valor; EP, erro padrão; R<sup>2</sup>, coeficiente de determinação;  $DL_{50}$ , dose letal média.

### Viabilidade e morte celular

A fim de estudar a influência da terapêutica com cisplatina, com docetaxel e com radiação ionizante na viabilidade e morte celulares recorreu-se à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo por citometria de fluxo.

A Figura 12 representa os resultados de viabilidade e tipos de morte celulares após 48 horas de incubação das células com cisplatina. Observou-se que a cisplatina afeta negativamente a viabilidade celular das células HeLa, verificando-se uma diminuição da população de células viáveis com o aumento da concentração de fármaco, acompanhada pelo aumento da morte celular por apoptose e por necrose, não havendo um tipo de morte

preferencial. Os valores obtidos na caracterização da viabilidade e tipo de morte no tratamento com cisplatina encontram-se sintetizados no Anexo na Tabela IX.



**Figura 12** - Viabilidade e tipos de morte celular induzidos na linha celular HeLa após incubação com cisplatina durante 48 horas. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo por dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Os resultados estão expressos em percentagem (%) de células viáveis (V), de células em apoptose inicial (AI), de células em apoptose tardia/necrose (AT/N) e de células em necrose (N). Os resultados são representados na forma de média e erro padrão de pelo menos três experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* para  $p < 0,05$ ; com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação ao valor de IC<sub>20</sub> estão representadas com # para  $p < 0,05$ ; com ## para  $p < 0,01$  e com ### para  $p < 0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação ao valor IC<sub>50</sub> estão assinaladas com \$ para  $p < 0,05$ ; com \$\$ para  $p < 0,01$  e com \$\$\$ para  $p < 0,001$ .

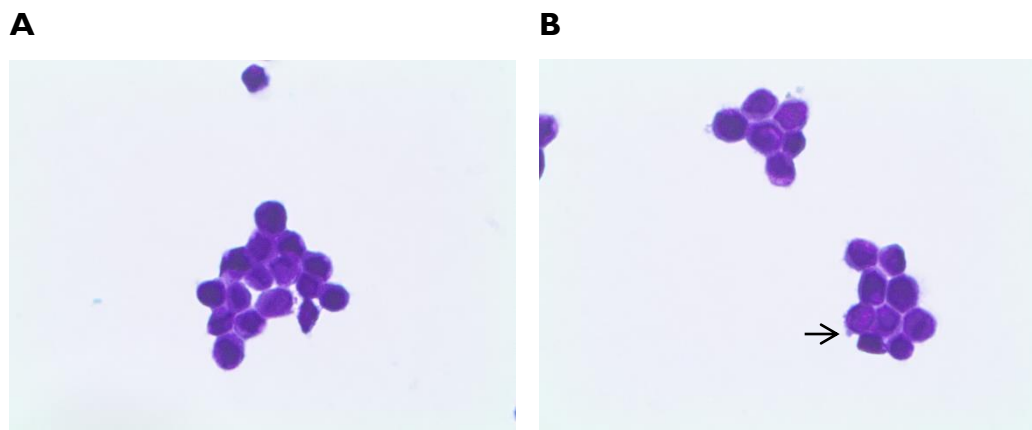
As células quando incubadas com cisplatina demonstraram uma diminuição significativa da viabilidade em relação ao controlo ( $91,63\% \pm 1,25\%$ ). Comparativamente à incubação com o valor de IC<sub>20</sub> apresentaram uma população de células viáveis de  $70,25\% \pm 0,70\%$  ( $p < 0,001$ ), com o valor de IC<sub>50</sub> uma percentagem de células viáveis de  $59,13\% \pm 2,32\%$  ( $p < 0,001$ ) e com o valor de IC<sub>80</sub> uma população de células viáveis de  $37,38\% \pm 2,19\%$  ( $p < 0,001$ ). Verificou-se um aumento significativo da morte celular por apoptose inicial, relativamente ao controlo, de  $2,38\% \pm 0,42\%$  para  $15,63\% \pm 0,56\%$  ( $p < 0,001$ ) no tratamento com IC<sub>20</sub>, para  $19,50\% \pm 0,68\%$  ( $p < 0,001$ ) no tratamento com IC<sub>50</sub> e para  $22,25\% \pm 1,62\%$  ( $p < 0,001$ ) no tratamento com IC<sub>80</sub>. Ainda, concentrações crescentes de cisplatina induziram o aumento significativo de morte celular também por necrose, comparativamente ao controlo ( $3,25\% \pm 0,56\%$ ), sendo que após tratamento com IC<sub>20</sub> a população de células em necrose foi de  $10,25\% \pm 0,80\%$  ( $p < 0,001$ ), com IC<sub>50</sub> foi de  $12,13\% \pm 0,40\%$  ( $p < 0,001$ ) e com IC<sub>80</sub> foi de  $28,25\% \pm 1,77\%$  ( $p < 0,001$ ). A população de células em morte por apoptose tardia/necrose aumentou significativamente em comparação com o controlo ( $1,50\% \pm 0,22\%$ ) nas condições IC<sub>20</sub> para  $4,75\% \pm 0,41\%$

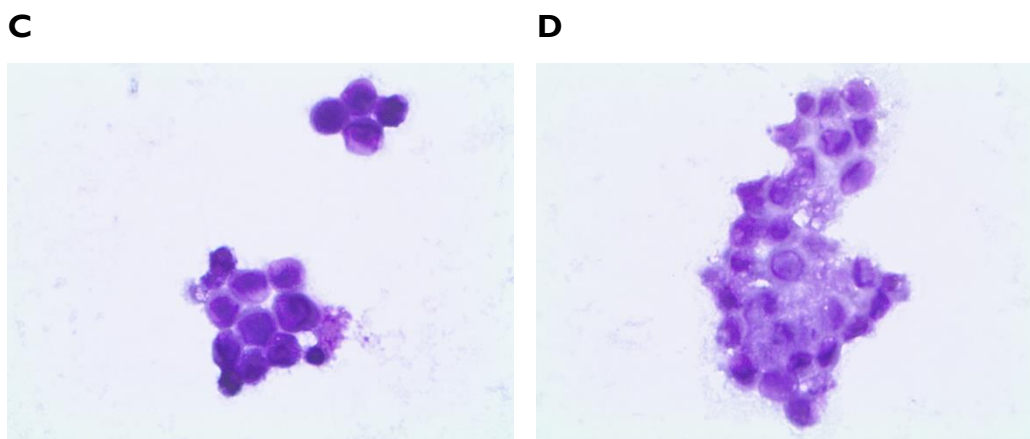
( $p=0,031$ ),  $IC_{50}$  para  $7,25\pm 0,62\%$  ( $p<0,001$ ) e  $IC_{80}$  para  $10,13\pm 1,11\%$  ( $p<0,001$ ), no entanto foi o tipo de morte menos predominante.

Em adição, entre as diferentes condições de tratamento com cisplatina (Figura 12) observaram-se diferenças significativas, particularmente entre a população de células viáveis no tratamento com  $IC_{20}$  e os tratamentos com  $IC_{50}$  ( $p<0,001$ ) e  $IC_{80}$  ( $p<0,001$ ), sendo que a percentagem de células viáveis foi também significativamente superior no tratamento com  $IC_{50}$  em relação ao tratamento com  $IC_{80}$  ( $p<0,001$ ). A população de células em apoptose inicial foi significativamente inferior no tratamento com  $IC_{20}$  relativamente aos tratamentos com  $IC_{50}$  ( $p=0,044$ ) e com  $IC_{80}$  ( $p<0,001$ ). No que diz respeito às células em apoptose tardia/necrose, o valor obtido no tratamento com  $IC_{80}$  foi significativamente superior à condição de  $IC_{20}$  ( $p<0,001$ ), tal como à condição de  $IC_{50}$  ( $p=0,044$ ). A população de células em necrose na condição de  $IC_{80}$  foi significativamente superior à população do tratamento com  $IC_{20}$  ( $p<0,001$ ) e com  $IC_{50}$  ( $p<0,001$ ).

Para além da determinação da viabilidade e morte celular observadas após tratamento com cisplatina por citometria de fluxo foi realizada a caracterização morfológica pela coloração com *May-Grünwald Giemsa*. A Figura 13 apresenta as imagens representativas dos resultados obtidos.

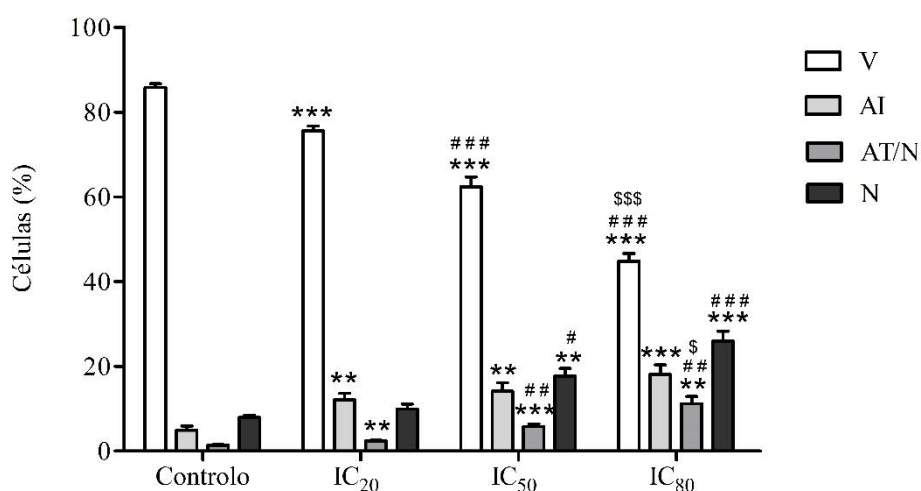
As células controlo apresentaram uma morfologia arredondada. O tratamento com baixas concentrações de cisplatina ( $IC_{20}$ ) induziu pouca morte celular, sendo que esta ocorreu principalmente por apoptose, como se pode verificar através de *blebs* ( $\uparrow$ ). Na condição  $IC_{50}$  e  $IC_{80}$  observou-se morte por necrose, com extravasamento do conteúdo celular, mais pronunciada na maior concentração, como se observa na Figura 13.





**Figura 13** - Características morfológicas das células HeLa, após 48 horas de incubação com o valor de IC<sub>20</sub>, de IC<sub>50</sub> e de IC<sub>80</sub> de cisplatina. As imagens foram conseguidas através de esfregaços corados com *May-Grünwald Giemsa*. A imagem (A) representa células controlo não tratadas, a imagem (B) células tratadas com o valor de IC<sub>20</sub>, a imagem (C) células tratadas com o valor de IC<sub>50</sub> e a imagem (D) células tratadas com o valor de IC<sub>80</sub>. As imagens representadas estão com uma ampliação de 400x.

A viabilidade e tipo de morte celular foram igualmente avaliados após 48 horas de incubação das células com docetaxel, cujos resultados se encontram representados na Figura 14. Foi possível verificar que o tratamento com docetaxel influencia a viabilidade celular, observando-se a redução do número de células viáveis de forma dependente da concentração do fármaco. Consequentemente, esta diminuição é acompanhada por um aumento da morte celular, maioritariamente por apoptose inicial e por necrose. Pode ainda observar-se uma ligeira tendência para o tipo de morte por necrose em concentrações mais elevadas, nomeadamente com o valor de IC<sub>80</sub> de docetaxel, Figura 14. Os valores obtidos na caracterização dos tipos de morte celular no tratamento com docetaxel estão indicados no Anexo na Tabela X.



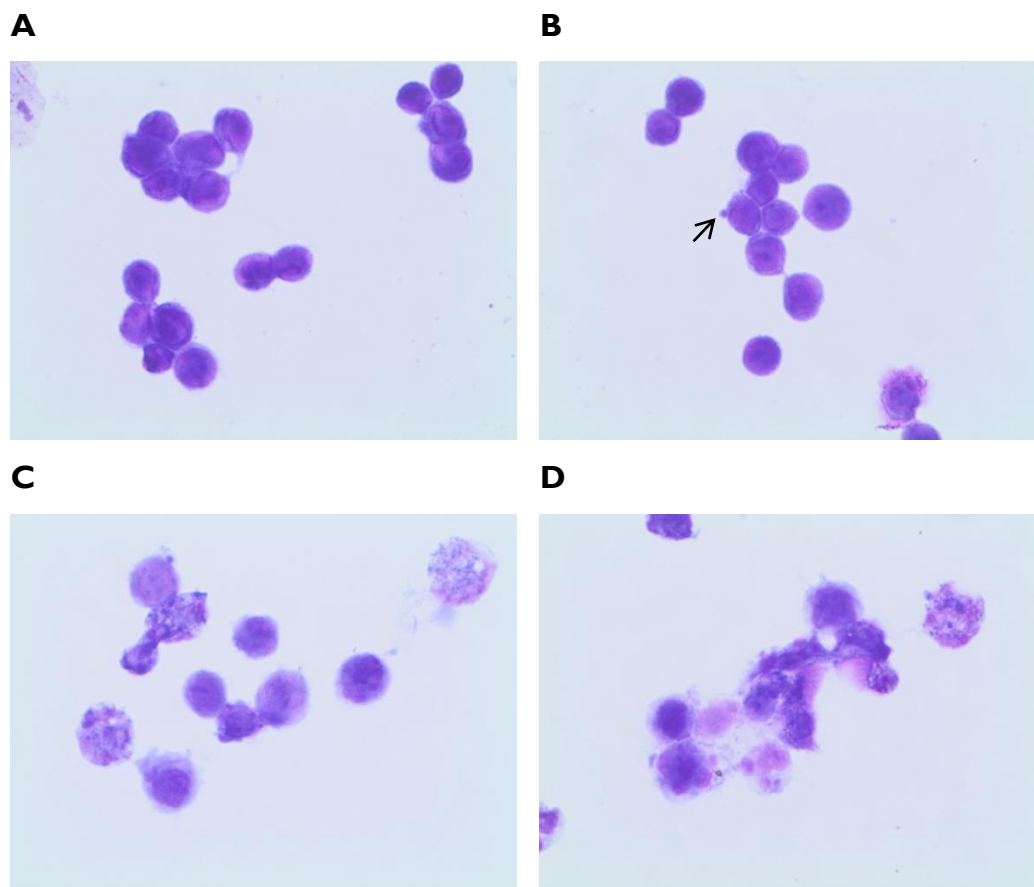
**Figura 14** - Viabilidade e tipos de morte celular induzidos na linha celular HeLa após incubação com docetaxel durante 48 horas. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo por dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Os resultados estão expressos em percentagem (%) de células viáveis (V), de células em

apoptose inicial (AI), de células em apoptose tardia/necrose (AT/N) e de células em necrose (N). Os resultados são representados na forma de média e erro padrão de pelo menos três experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* para  $p < 0,05$ ; com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação ao valor de  $IC_{20}$  estão representadas com # para  $p < 0,05$ ; com ## para  $p < 0,01$  e com ### para  $p < 0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação ao valor  $IC_{50}$  estão assinaladas com \$ para  $p < 0,05$ ; com \$\$ para  $p < 0,01$  e com \$\$\$ para  $p < 0,001$ .

Como representado na Figura 14, observou-se uma diminuição significativa da população de células viáveis quando incubadas com o valor de  $IC_{20}$  de docetaxel,  $75,60\% \pm 1,10\%$  ( $p < 0,001$ ), com o valor de  $IC_{50}$ ,  $62,40\% \pm 1,45\%$  ( $p < 0,001$ ) e com o valor de  $IC_{80}$ ,  $44,80\% \pm 1,87\%$  ( $p < 0,001$ ), comparativamente ao controlo, cuja viabilidade foi de  $85,80\% \pm 0,89\%$ . Verificou-se um aumento significativo de células em morte por apoptose inicial após tratamento com o valor de  $IC_{20}$ ,  $12,10\% \pm 1,52\%$  ( $p = 0,006$ ), de  $IC_{50}$ ,  $14,10\% \pm 2,04\%$  ( $p = 0,007$ ) e de  $IC_{80}$ ,  $18,10\% \pm 2,25\%$  ( $p < 0,001$ ), em relação ao controlo ( $4,90\% \pm 1,05\%$ ). Foi ainda possível observar morte celular por necrose, aumentando de forma significativa comparativamente ao controlo ( $7,90\% \pm 0,59\%$ ), nas condições  $IC_{50}$ ,  $17,70\% \pm 1,79\%$  ( $p = 0,001$ ) e  $IC_{80}$ ,  $25,90\% \pm 2,42\%$  ( $p < 0,001$ ). A morte celular por apoptose tardia/necrose foi a menos predominante de entre as demais, independentemente da condição de tratamento. No entanto, verificou-se um aumento desta população de células com o aumento da concentração de docetaxel testada, com diferenças estatisticamente significativas entre as condições de  $IC_{20}$ ,  $2,40\% \pm 0,16\%$  ( $p = 0,002$ ), de  $IC_{50}$ ,  $5,80\% \pm 0,59\%$  ( $p < 0,001$ ) e de  $IC_{80}$ ,  $11,20\% \pm 1,66\%$  ( $p = 0,001$ ) e o controlo ( $1,40\% \pm 0,16\%$ ).

Ainda no que respeita ao tratamento com docetaxel (Figura 14) observaram-se diferenças significativas entre as condições de tratamento testadas, nomeadamente, a viabilidade celular foi significativamente maior após incubação com o valor de  $IC_{20}$  de docetaxel do que com o de  $IC_{50}$  ( $p < 0,001$ ) e o de  $IC_{80}$  ( $p < 0,001$ ). Da mesma forma, com o tratamento  $IC_{50}$  a percentagem de células viáveis foi superior comparativamente ao  $IC_{80}$  ( $p < 0,001$ ). Relativamente à morte por apoptose tardia/necrose, a população celular foi significativamente inferior na condição de tratamento  $IC_{20}$  comparativamente ao tratamento com  $IC_{50}$  ( $p = 0,001$ ) e com  $IC_{80}$  ( $p = 0,002$ ). De igual forma, verificou-se no tratamento com  $IC_{50}$ , um valor de morte por apoptose tardia/necrose inferior ao obtido na condição  $IC_{80}$  ( $p = 0,045$ ). A morte celular por necrose foi significativamente menor nas células tratadas com  $IC_{20}$  do que nas tratadas com  $IC_{50}$  ( $p = 0,011$ ) e com  $IC_{80}$  ( $p < 0,001$ ). Em adição, não se verificaram diferenças significativas entre as diferentes condições de tratamento no que respeita à morte celular por apoptose inicial.

A análise morfológica para o tratamento com docetaxel encontra-se representada na Figura 15, em que se observa morte celular por apoptose e por necrose após o tratamento.



**Figura 15** - Características morfológicas das células HeLa, após 48 horas de incubação com o valor de  $IC_{20}$ , de  $IC_{50}$  e de  $IC_{80}$  de docetaxel. As imagens foram conseguidas através de esfregaços corados com *May-Grünwald Giemsa*. A imagem (A) representa células controlo não tratadas, a imagem (B) células tratadas com o valor de  $IC_{20}$ , a imagem (C) células tratadas com o valor de  $IC_{50}$  e a imagem (D) células tratadas com o valor de  $IC_{80}$ . As imagens representadas estão com uma ampliação de 400x.

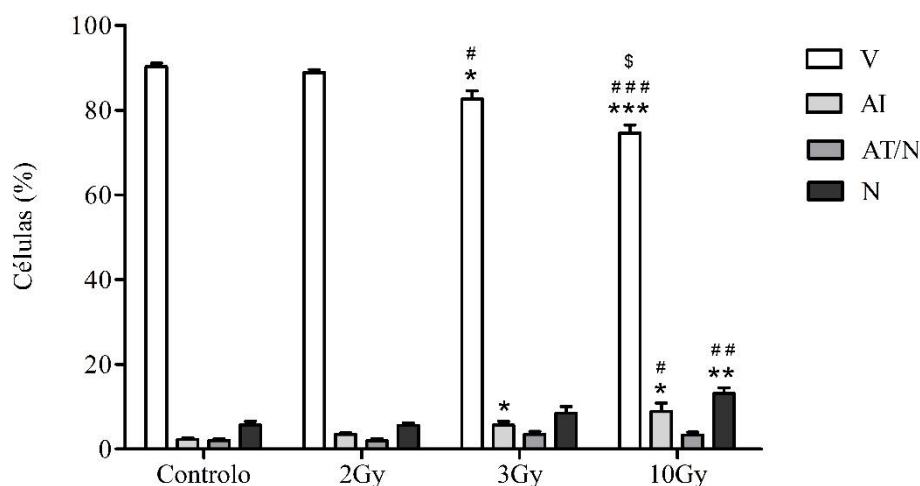
As células controlo, não submetidas a tratamento, apresentam uma morfologia arredondada. O tratamento com baixas concentrações de docetaxel ( $IC_{20}$ ) induziu alguma morte por apoptose, com visualização de *blebs* (↑) e apresentou também características morfológicas indicadoras de necrose, Figura 15B. Em condições em que se aplicaram concentrações mais elevadas de docetaxel ( $IC_{50}$  e  $IC_{80}$ ) observou-se um maior número de células em necrose, com extravasamento dos conteúdos celulares.

Os resultados referentes à viabilidade e tipos de morte celular após exposição das células HeLa à radiação ionizante encontram-se representados na Figura 16. Verificou-se que a radiação ionizante induziu efeitos na viabilidade das células, ocorrendo uma diminuição da percentagem de células viáveis, acompanhada por um aumento do número de células em morte celular por apoptose e por necrose. As alterações observadas são dependentes da



dose de radiação, sendo que apenas as doses mais elevadas, 3Gy e 10Gy, apresentaram um efeito estatisticamente significativo na viabilidade e morte celulares.

Como representado na Figura 16, a dose de 2Gy não demonstrou diferenças significativas na redução da população de células viáveis ( $88,88\% \pm 0,72\%$ ), nem de células em apoptose inicial ( $3,50\% \pm 0,38\%$ ) ou em necrose ( $5,63\% \pm 0,53\%$ ), comparativamente ao controlo. Verificou-se após irradiação com a dose de 3Gy uma diminuição significativa da percentagem de células viáveis, cujo valor foi de  $82,60\% \pm 1,96\%$  ( $p=0,016$ ) e com a dose de 10Gy, que apresentou um valor de  $74,60\% \pm 1,88\%$  ( $p<0,001$ ), comparativamente às células controlo com o valor de  $90,25\% \pm 0,83\%$ . Esta diminuição de viabilidade celular é acompanhada pelo aumento de morte por apoptose inicial e por necrose. Em células irradiadas com a dose de 3Gy, a população de células em apoptose inicial foi de  $5,70\% \pm 0,86\%$  ( $p=0,015$ ) e de  $8,88\% \pm 1,99\%$  ( $p=0,010$ ) para a dose de 10Gy, comparativamente ao controlo, onde se observou uma percentagem de células em apoptose inicial de  $2,31\% \pm 0,37\%$ . A morte por necrose apresentou-se com um valor de  $8,50\% \pm 1,54\%$  para a dose de 3Gy e de  $13,10\% \pm 1,35\%$  ( $p=0,002$ ) para a dose de 10Gy, significativamente superior ao observado no controlo,  $5,69\% \pm 0,85\%$ . A percentagem de células em apoptose tardia/necrose não demonstrou diferenças em qualquer dose de radiação aplicada em relação ao controlo, valores descritos no Anexo na Tabela XI.

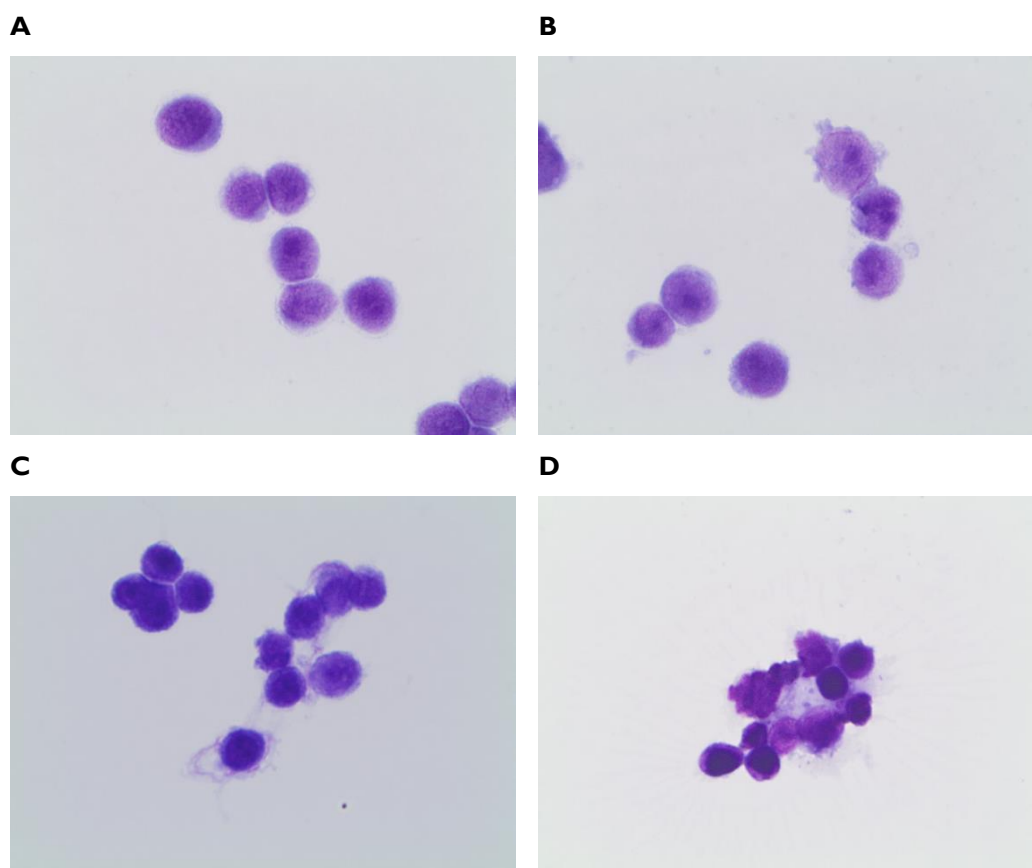


**Figura 16** - Viabilidade e tipos de morte celular induzidos na linha celular HeLa 48 horas após a irradiação. Os resultados foram conseguidos por citometria de fluxo por dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Os resultados estão expressos em percentagem (%) de células viáveis (V), de células em apoptose inicial (AI), de células em apoptose tardia/necrose (AT/N) e de células em necrose (N). Os resultados são representados na forma de média e erro padrão de pelo menos três experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* para  $p<0,05$ ; com \*\* para  $p<0,01$  e com \*\*\* para  $p<0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação à dose de 2Gy estão representadas com # para  $p<0,05$ ; com ## para  $p<0,01$  e com ### para  $p<0,001$ . As diferenças

estatisticamente significativas em relação à dose de 3Gy estão assinaladas com \$ para  $p < 0,05$ ; com \$\$ para  $p < 0,01$  e com \$\$\$ para  $p < 0,001$ .

Ainda no que diz respeito às doses de radiação aplicadas nas células HeLa (Figura 16), verificou-se que a viabilidade de células irradiadas com a dose de 2Gy foi significativamente superior à das células irradiadas com a dose de 3Gy ( $p = 0,049$ ) e com a dose de 10Gy ( $p < 0,001$ ). Da mesma forma, a percentagem de células viáveis irradiadas com a dose de 3Gy foi significativamente superior à das irradiadas com a dose de 10Gy ( $p = 0,039$ ). Adicionalmente, a morte por apoptose inicial de células irradiadas com a dose de 2Gy foi significativamente inferior à observada de células irradiadas com a dose de 10Gy ( $p = 0,031$ ). A percentagem de células em necrose irradiadas com a dose de 2Gy demonstrou ser significativamente inferior à de células irradiadas com a dose de 10Gy ( $p = 0,001$ ).

De igual forma, foram avaliados os efeitos da exposição à radiação ionizante na morfologia das células HeLa, cujas imagens estão representadas na Figura 17. A análise morfológica das células irradiadas demonstra que a radiação ionizante induz um aumento de morte celular com o aumento da dose de radiação, como descrito na Figura 17, onde se observam características associadas aos tipos de morte celular.



**Figura 17** - Características morfológicas das células HeLa, 48 horas após irradiação. Imagens obtidas através de esfregaços corados com *May-Grünwald Giemsa*. A imagem (A) representa células controlo sem irradiação, a imagem (B) células irradiadas com a dose de 2Gy, a imagem (C) células irradiadas com a dose de 3Gy e a

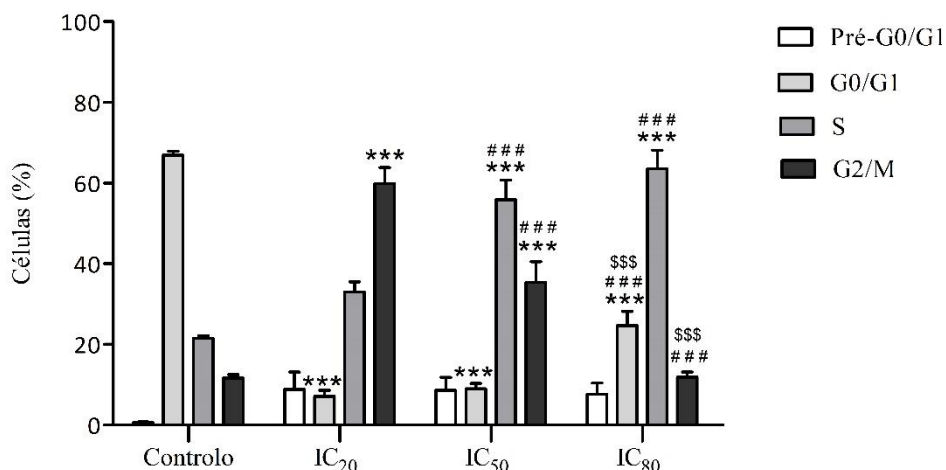
imagem (D) células irradiadas com a dose de 10Gy. As imagens representadas estão com uma ampliação de 400x.

As células controlo, ou seja, na ausência de radiação ionizante, apresentam uma morfologia arredondada, como se observa na Figura 17A. De forma geral, o tratamento por radiação ionizante induz morte por necrose, observando-se algumas características morfológicas deste tipo de morte, nomeadamente a disrupção da membrana plasmática com o extravasamento celular.

### **Ciclo celular**

De forma a avaliar os efeitos do tratamento com cisplatina e com docetaxel no ciclo celular, analisou-se o conteúdo de DNA em cada fase do ciclo celular, através da marcação com iodeto de propídeo por citometria de fluxo, cujos resultados se encontram descritos na Figura 18 e Figura 19, respetivamente.

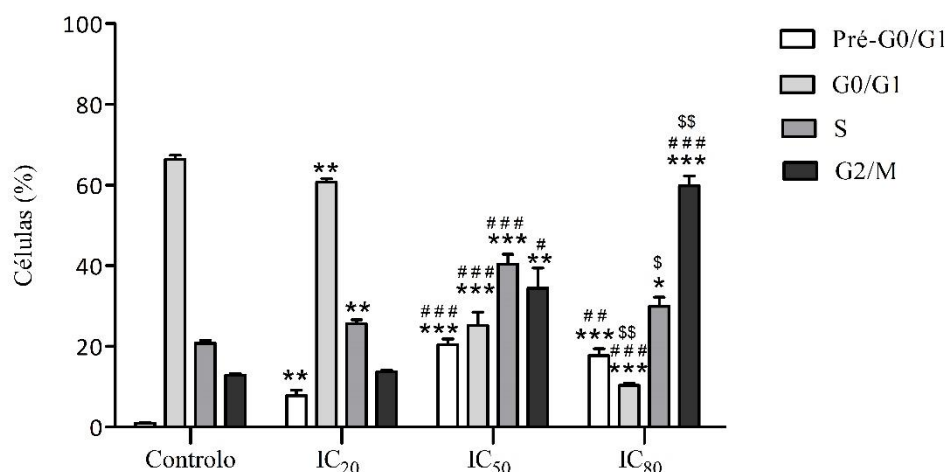
Após exposição à cisplatina durante 48 horas, Figura 18, na condição controlo as células encontravam-se maioritariamente na fase G0/G1,  $66,88\% \pm 1,01\%$ , apresentando ainda  $21,50\% \pm 0,65\%$  das células na fase S e  $11,63\% \pm 0,84\%$  na fase G2/M. Na menor concentração de cisplatina ( $IC_{20}$ ) verificou-se um aumento significativo de células na fase G2/M para  $59,88\% \pm 3,96\%$  ( $p < 0,001$ ), comparativamente ao controlo, e também um aumento de células na fase S para  $33,00\% \pm 2,51\%$ . Com o aumento da concentração de cisplatina aplicada,  $IC_{50}$  e  $IC_{80}$ , houve um aumento significativo de células na fase S para  $55,88\% \pm 4,90\%$  e para  $63,50\% \pm 4,66\%$ , respetivamente, em relação ao controlo ( $p < 0,001$ ) e ao  $IC_{20}$  ( $p < 0,001$ ). Na concentração de  $IC_{50}$  verificou-se ainda o aumento significativo de células na fase G2/M para  $35,38\% \pm 5,14\%$  em relação ao controlo ( $p < 0,001$ ) e à condição  $IC_{20}$  ( $p < 0,001$ ). Relativamente ao pico apoptótico (pico pré-G0/G1) verificou-se uma tendência para o aumento do número de células em todas as condições estudadas comparativamente ao controlo, apesar de não ter significado estatístico.



**Figura 18** – Ciclo celular das células HeLa após exposição à cisplatina durante 48 horas. Os resultados estão expressos na forma de percentagem (%) de células no pico apoptótico (Pré-G0/G1), na fase G0/G1, na fase S e na fase G2/M. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes, em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* para  $p < 0,05$ ; com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação ao IC<sub>20</sub> estão representadas com # para  $p < 0,05$ ; com ## para  $p < 0,01$  e com ### para  $p < 0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação ao IC<sub>50</sub> estão assinaladas com \$ para  $p < 0,05$ ; com \$\$ para  $p < 0,01$  e com \$\$\$ para  $p < 0,001$ .

Os valores obtidos na avaliação do ciclo celular no tratamento com cisplatina encontram-se sintetizados no Anexo I na Tabela XII.

No que diz respeito ao tratamento com docetaxel durante 48 horas (Figura 19), as células controlo sem tratamento encontravam-se maioritariamente na fase G0/G1, com  $66,40\% \pm 0,98\%$  de células, havendo  $20,80\% \pm 0,63\%$  de células na fase S e  $12,80\% \pm 0,44\%$  na fase G2/M. Após incubação com IC<sub>20</sub>, verificou-se um aumento significativo de células na fase S para  $25,60\% \pm 0,97\%$  ( $p = 0,004$ ) e ainda um aumento significativo do pico apoptótico (pico pré-G0/G1) para  $7,80\% \pm 1,33\%$  ( $p = 0,003$ ), comparativamente ao controlo. No tratamento com IC<sub>50</sub> verificou-se um aumento significativo das células na fase S para  $40,40\% \pm 2,44\%$  ( $p < 0,001$ ) e na fase G2/M para  $34,40\% \pm 5,05\%$  ( $p = 0,009$ ), em relação ao controlo. Ainda, nesta condição, a destacar o aumento significativo do pico apoptótico (pico pré-G0/G1) para  $20,40\% \pm 1,44\%$  em relação ao controlo ( $p < 0,001$ ) e à condição IC<sub>20</sub> ( $p < 0,001$ ). Relativamente à maior concentração de docetaxel testada (IC<sub>80</sub>) verificou-se um aumento significativo das células na fase G2/M para  $59,80\% \pm 2,45\%$ , relativamente ao controlo ( $p < 0,001$ ), à condição IC<sub>20</sub> ( $p < 0,001$ ) e à condição IC<sub>50</sub> ( $p = 0,003$ ). Acrescentar, nesta condição um aumento significativo de células na fase S para  $29,90\% \pm 2,29\%$  ( $p = 0,014$ ) em relação ao controlo. Para além disso, também se observou a presença de um pico apoptótico ( $17,70\% \pm 1,67\%$ ) significativamente superior ao controlo ( $p < 0,001$ ) e à condição IC<sub>20</sub> ( $p = 0,001$ ).



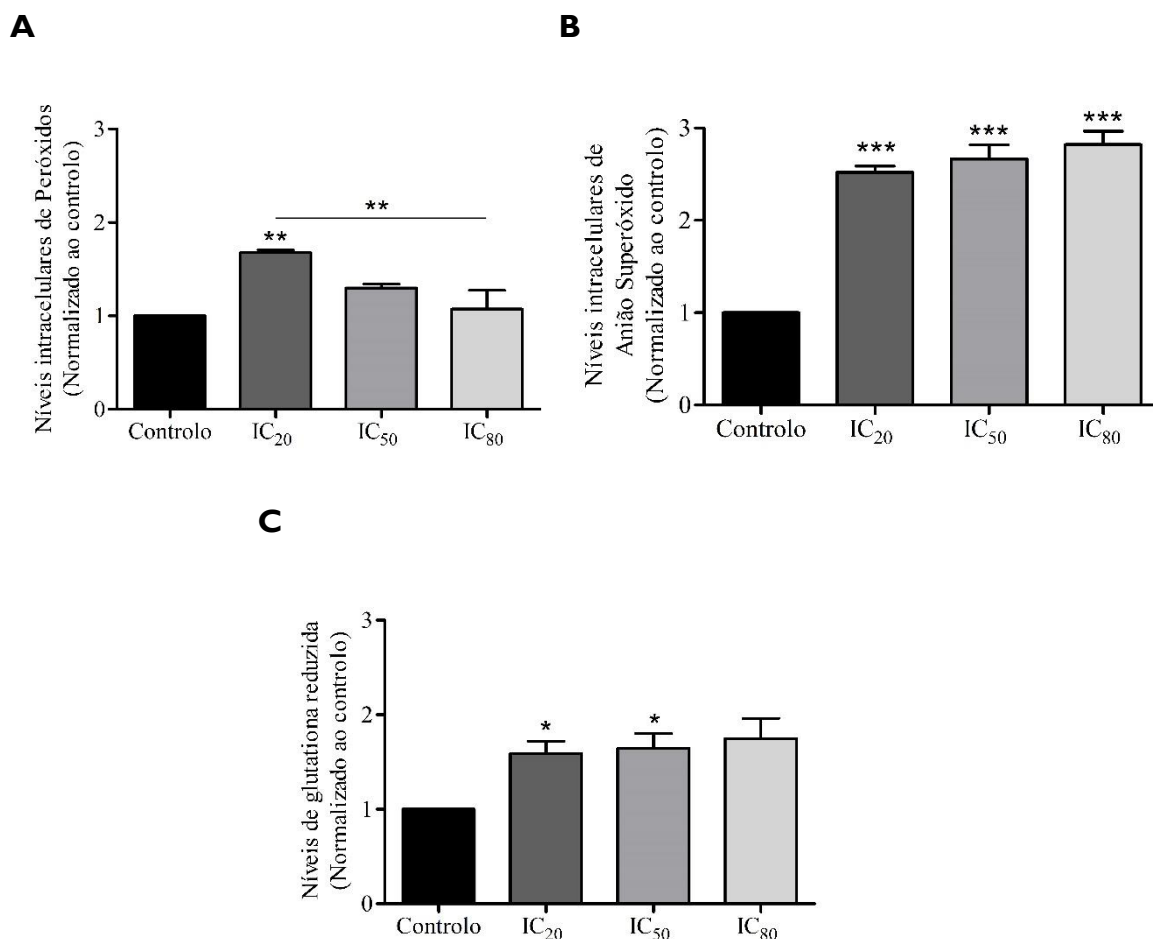
**Figura 19** - Ciclo celular das células HeLa após exposição ao docetaxel durante 48 horas. Os resultados estão expressos na forma de percentagem (%) de células no pico apoptótico (Pré-G0/G1), na fase G0/G1, na fase S e na fase G2/M. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes, em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* para  $p < 0,05$ ; com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação ao IC<sub>20</sub> estão representadas com # para  $p < 0,05$ ; com ## para  $p < 0,01$  e com ### para  $p < 0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação ao IC<sub>50</sub> estão assinaladas com \$ para  $p < 0,05$ ; com \$\$ para  $p < 0,01$  e com \$\$\$ para  $p < 0,001$ .

Os valores obtidos na avaliação do ciclo celular no tratamento com docetaxel encontram-se representados no Anexo I na Tabela XIII.

### Stresse oxidativo

A fim de avaliar se o efeito do tratamento com cisplatina, com docetaxel e com radiação ionizante se repercute a nível do stresse oxidativo analisaram-se as alterações no estado redox da célula. Deste modo, após incubação, durante 48h, com cisplatina e com docetaxel e 48 horas após irradiação das células caracterizaram-se os níveis intracelulares de peróxidos e de anião superóxido e a expressão de GSH, por citometria de fluxo. Ainda, a fim de avaliar a formação de radicais livres mais reativos, formados a partir da conversão de peróxido de hidrogénio ou do anião superóxido, nomeadamente o radical hidroxilo (HO•), recorreu-se ao uso de um inibidor específico desta espécie reativa de oxigénio, o manitol.

A Figura 20 representa os resultados do tratamento com cisplatina na produção intracelular de peróxidos e do anião superóxido assim como da defesa antioxidante GSH.



**Figura 20** – Produção intracelular de peróxidos (A), produção intracelular de anião superóxido (B) e níveis de glutatona reduzida (C) nas células HeLa após exposição à cisplatina durante 48 horas. Esta avaliação foi realizada através da marcação com a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA, DHE e alaranjado de mercúrio, respetivamente, por citometria de fluxo. Os resultados estão representados em MIF e normalizados ao controlo. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \* para  $p < 0,05$ ; com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

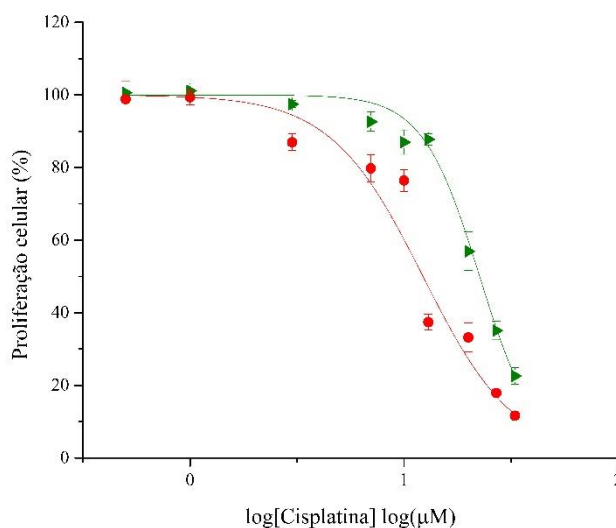
A produção intracelular de peróxidos, Figura 20A, mostrou-se ser dependente da concentração de fármaco. Quando as células foram tratadas com a menor concentração de cisplatina, observou-se um aumento significativo dos níveis intracelulares de peróxidos para  $1,68 \pm 0,03$ , em relação ao controlo ( $p = 0,003$ ) e à condição IC<sub>80</sub> ( $p = 0,009$ ). As concentrações maiores de cisplatina analisadas (IC<sub>50</sub> e IC<sub>80</sub>) não induziram um aumento com significado estatístico da produção de peróxidos.

A análise da produção intracelular do anião superóxido após tratamento com cisplatina (Figura 20B) demonstrou um aumento significativo dos níveis deste radical nas três concentrações testadas relativamente ao controlo ( $p < 0,001$ ). Nas células tratadas com IC<sub>20</sub> os níveis de anião superóxido foram de  $2,52 \pm 0,07$ , após tratamento com IC<sub>50</sub> foram de  $2,67 \pm 0,15$  e com o tratamento de IC<sub>80</sub> foram de  $2,82 \pm 0,14$ .

Relativamente aos níveis de expressão da defesa antioxidante GSH após tratamento com cisplatina durante 48 horas, os resultados estão representados na Figura 20C. De forma

global, o tratamento com cisplatina induziu um aumento da produção da defesa antioxidante GSH. Quando as células foram incubadas com  $IC_{20}$  verificou-se um aumento significativo dos níveis de glutathiona reduzida para  $1,59 \pm 0,13$  ( $p=0,010$ ), comparativamente ao controlo. De forma semelhante verificou-se um aumento no tratamento com a concentração de  $IC_{50}$ , com níveis de GSH de  $1,65 \pm 0,16$  ( $p=0,019$ ), e também no tratamento com  $IC_{80}$ , com níveis da defesa antioxidante de  $1,75 \pm 0,21$ .

Na Figura 21 estão representados os resultados de proliferação celular obtidos após tratamento das células com concentrações crescentes de cisplatina e com a combinação de cisplatina com manitol (inibidor de  $OH^{\bullet}$ ). Os valores correspondentes à concentração inibitória de 20%, de 50% e de 80% da proliferação celular obtidos a partir da curva concentração-resposta estão descritos na Tabela VII.



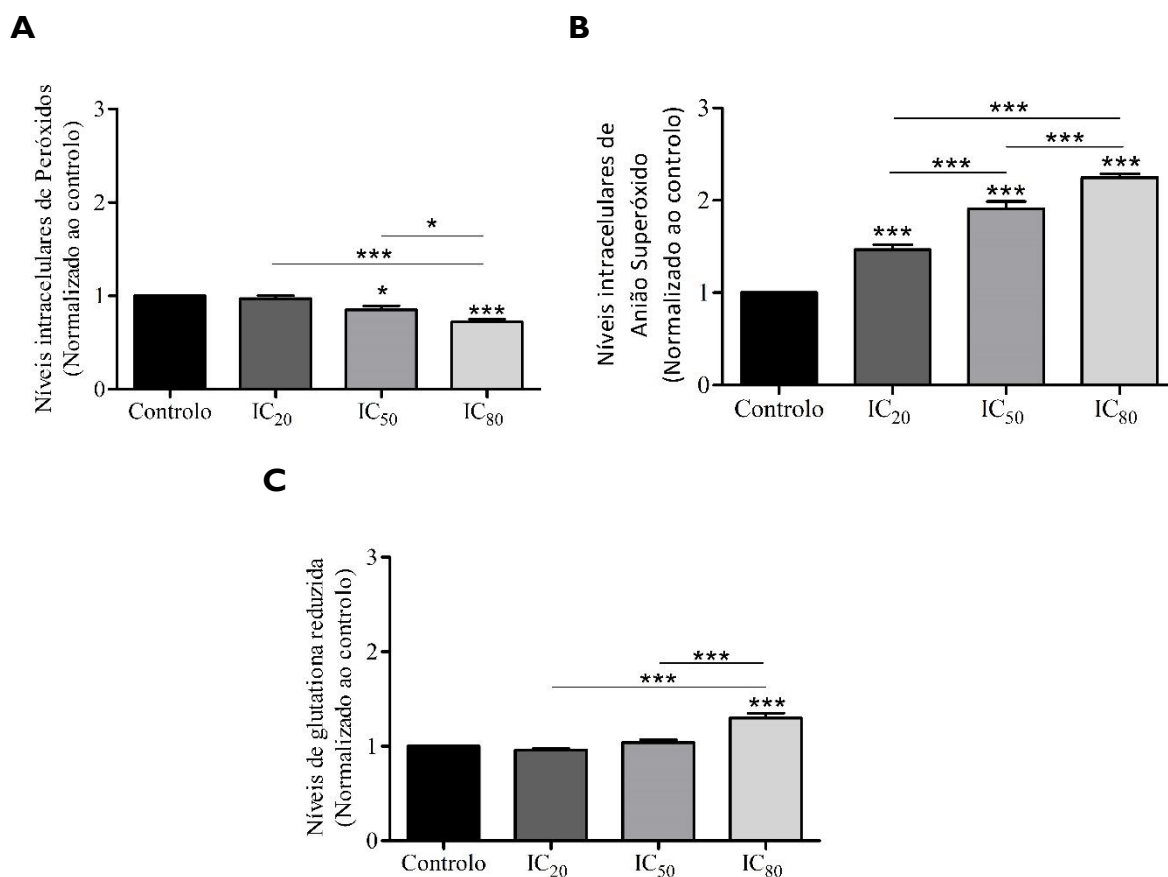
**Figura 21** – Cua de concentração-resposta das células HeLa após tratamento com concentrações crescentes de cisplatina sem inibidor (linha vermelha) e de cisplatina com 40mM de manitol (linha verde) durante 48 horas. Os resultados exprimem a proliferação celular, em percentagem, em função do logaritmo da concentração de fármaco, apresentados na forma de média e erro padrão, obtidos em pelo menos três experiências independentes em triplicado.

Quando as células foram tratadas com cisplatina combinada com manitol observou-se que a proliferação celular foi superior na maioria das concentrações testadas em comparação com o tratamento com cisplatina sem inibidor. Esta diferença evidenciou-se no aumento dos valores de  $IC_{20}$ , de  $IC_{50}$ , de  $IC_{80}$  no tratamento com inibidor em relação aos valores obtidos no tratamento sem inibidor.

**Tabela VII** - Valores de IC<sub>20</sub>, de IC<sub>50</sub> e de IC<sub>80</sub> obtidos após incubação das células HeLa com cisplatina sem inibidor e com inibidor manitol, durante 48 horas.

Cisplatina	0mM Manitol	40mM Manitol
IC <sub>20</sub> (μM)	6,17±0,93	14,77±0,67
IC <sub>50</sub> (μM)	12,27±1,04	22,57±0,71
IC <sub>80</sub> (μM)	24,43±1,21	34,51±1,65
R <sup>2</sup>	0,98	0,99

Na Figura 22 estão representados os resultados da produção intracelular de peróxidos, do anião superóxido e os níveis da defesa antioxidante GSH após tratamento com docetaxel.



**Figura 22** - Produção intracelular de peróxidos (A), produção intracelular de anião superóxido (B) e níveis de glutatona reduzida (C) nas células HeLa após exposição ao docetaxel durante 48 horas. Esta avaliação foi realizada através da marcação com a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA, DHE e alaranjado de mercúrio, respetivamente, por citometria de fluxo. Os resultados estão representados em MIF e normalizados ao controlo. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \* para p<0,05; com \*\* para p<0,01 e com \*\*\* para p<0,001.

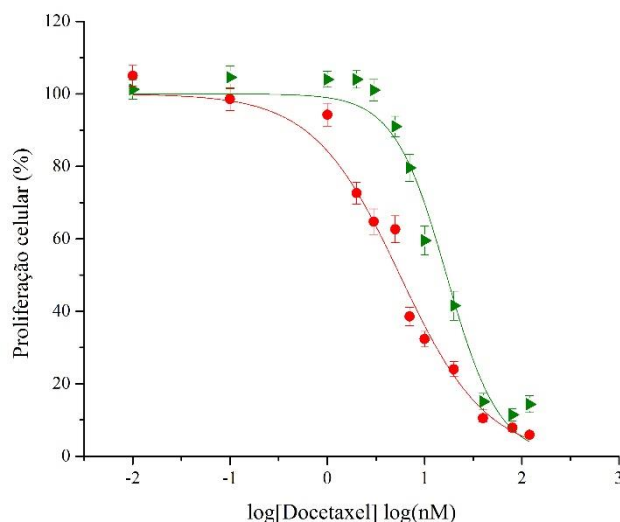


Como representado na Figura 22A, os níveis de peróxidos diminuem com o aumento da concentração de docetaxel, à exceção da menor concentração testada ( $IC_{20}$ ), que mantém valores próximos do controlo. Aquando do tratamento com a concentração de  $IC_{50}$  observou-se uma redução significativa dos níveis de peróxidos para  $0,85 \pm 0,04$  ( $p=0,013$ ) e com tratamento com  $IC_{80}$  uma redução significativa para  $0,72 \pm 0,03$  ( $p<0,001$ ), comparativamente ao controlo. Entre condições verificaram-se diferenças significativas, sendo os níveis de peróxidos na condição  $IC_{80}$  inferiores aos da condição  $IC_{20}$  ( $p<0,001$ ) e da condição  $IC_{50}$  ( $p=0,042$ ).

Relativamente à análise dos níveis intracelulares de anião superóxido, Figura 22B, para concentrações maiores de docetaxel verificou-se um aumento dos níveis intracelulares desta espécie. Assim, após tratamento com  $IC_{20}$  o nível de anião superóxido foi de  $1,47 \pm 0,05$ , após tratamento com  $IC_{50}$  foi de  $1,91 \pm 0,08$  e após tratamento com  $IC_{80}$  o valor foi de  $2,25 \pm 0,04$ . Em todas as condições testadas as diferenças foram significativas em relação ao controlo ( $p<0,001$ ) e entre si ( $p<0,001$ ).

Na Figura 22C encontram-se os resultados obtidos dos níveis de GSH após tratamento com docetaxel durante 48 horas. Nas concentrações mais baixas, nomeadamente no  $IC_{20}$  e no  $IC_{50}$ , não houve alterações dos níveis desta defesa antioxidante em relação ao controlo. Após tratamento com a maior concentração,  $IC_{80}$ , houve um aumento dos níveis da GSH para  $1,30 \pm 0,05$ , sendo significativamente superior aos conseguidos nas condições controlo ( $p<0,001$ ),  $IC_{20}$  ( $p<0,001$ ) e  $IC_{50}$  ( $p<0,001$ ).

Na Figura 23 estão representados os resultados obtidos de proliferação celular após tratamento com docetaxel sem inibidor e com inibidor (manitol) durante 48 horas. Os valores de  $IC_{20}$ , de  $IC_{50}$  e de  $IC_{80}$  estão sintetizados na Tabela VIII.



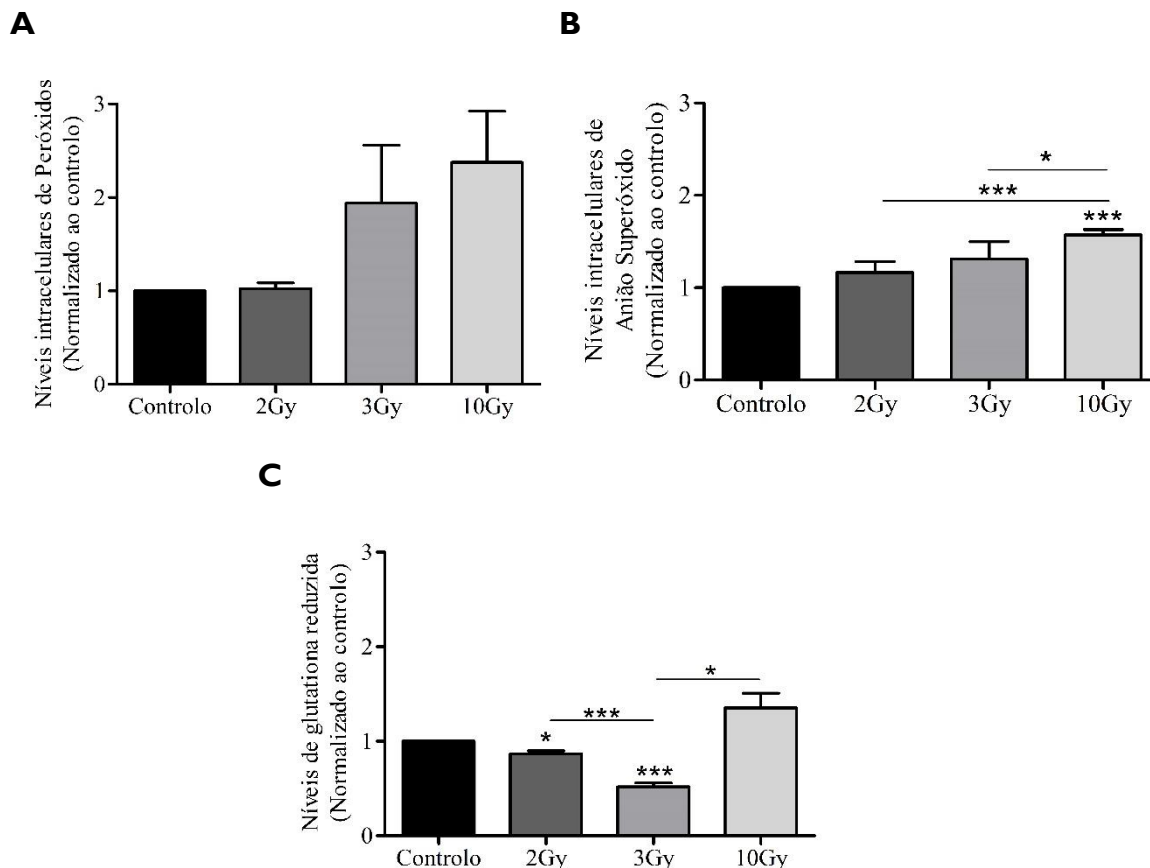
**Figura 23** – Curva de concentração-resposta das células HeLa após tratamento com concentrações crescentes de docetaxel sem inibidor (linha vermelha) e de docetaxel com 40mM de manitol (linha verde) durante 48 horas. Os resultados exprimem a percentagem de proliferação celular em função do logaritmo da concentração de fármaco, apresentados na forma de média e erro padrão, obtidos em pelo menos três experiências independentes em triplicado.

Após tratamento com docetaxel combinado com manitol, verificou-se que a proliferação celular foi superior na maioria das concentrações testadas de fármaco relativamente ao tratamento sem inibidor. Esta diferença reflete-se nos valores de  $IC_{20}$ , de  $IC_{50}$  e de  $IC_{80}$ , que aumentaram no tratamento com inibidor em relação ao tratamento sem inibidor, representados na Tabela VIII.

**Tabela VIII** - Valores de  $IC_{20}$ , de  $IC_{50}$  e de  $IC_{80}$  obtidos após incubação das células HeLa com docetaxel sem inibidor e com inibidor manitol, durante 48 horas.

Docetaxel	0mM Manitol	40mM Manitol
$IC_{20}$ (nM)	1,35±0,23	7,11±1,19
$IC_{50}$ (nM)	5,57±0,56	16,79±1,96
$IC_{80}$ (nM)	23,01±1,94	39,68±5,87
$R^2$	0,99	0,98

Na Figura 24 estão descritos os resultados da produção intracelular de peróxidos, de anião superóxido e os níveis da defesa antioxidante GSH analisados 48 horas após tratamento com radiação ionizante.



**Figura 24** - Produção intracelular de peróxidos (A), produção intracelular de ânion superóxido (B) e níveis de glutatona reduzida (C) nas células HeLa, 48 horas após exposição à radiação ionizante. Esta avaliação foi realizada através da marcação com a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA, DHE e alaranjado de mercúrio, respetivamente, por citometria de fluxo. Os resultados estão representados em MIF e normalizados ao controlo. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \* para  $p < 0,05$ ; com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

Como representado na Figura 24A, doses de radiação de 3Gy e 10Gy induziram uma maior produção de peróxidos, com valores de  $1,94 \pm 0,62$  e de  $2,38 \pm 0,55$ , respetivamente, valores superiores relativamente ao controlo e à condição de 2Gy.

Relativamente aos níveis de ânion superóxido obtidos 48 horas após irradiação das células, Figura 24B, verificou-se um aumento gradual dos níveis deste radical com o aumento da dose de radiação aplicada, sendo o valor de ânion superóxido de  $1,17 \pm 0,12$  com a dose 2Gy, de  $1,31 \pm 0,19$  com a dose de 3Gy e de  $1,57 \pm 0,06$  com a dose de 10Gy. Diferenças com significado estatístico apenas se observaram entre a dose de 10Gy e o controlo ( $p < 0,001$ ), bem como, da dose de 10Gy para com a dose de 2Gy ( $p < 0,001$ ) e a dose de 3Gy ( $p = 0,028$ ).

Por fim, no que respeita aos níveis de glutatona reduzida após tratamento com radiação ionizante, Figura 24C, verificou-se uma diminuição gradual nas duas doses menores de

radiação. Com a dose de 2Gy, os níveis de GSH diminuíram para  $0,87 \pm 0,03$  ( $p=0,014$ ) e com a dose de 3Gy os níveis foram de  $0,52 \pm 0,04$  ( $p<0,001$ ), significativamente inferiores em relação ao controlo. Quando aplicada a dose de 10Gy os níveis desta defesa antioxidante aumentaram para  $1,35 \pm 0,15$ , sendo significativamente superiores aos obtidos na dose de 3Gy ( $p=0,030$ ).



## **Discussão**



A quimioterapia com base em cisplatina é uma das terapias mais comuns e eficazes no cancro do colo do útero (Fu *et al.*, 2017; Leisching *et al.*, 2015), apresentando melhores resultados, sobrevivência global mais prolongada e melhor qualidade de vida (Chen *et al.*, 2017; Prasanna, Bunker e Khan, 2017). Além disso, a quimioterapia com recurso à cisplatina concomitante com radioterapia constitui o tratamento padrão do cancro do colo do útero avançado (Fu *et al.*, 2017; Pu *et al.*, 2013). No entanto, apesar da cisplatina constar como o fármaco quimioterapêutico padrão, as suas limitações clínicas, tais como, os efeitos secundários adversos (Zhang *et al.*, 2015), a resistência desenvolvida (Leisching *et al.*, 2015) e a dificuldade na sua aplicação em doentes com diabetes e hipertensão (Fu *et al.*, 2017), influenciam o tratamento dos doentes de cancro. Assim, surge a necessidade de estudar outras opções terapêuticas, compostas por diferentes fármacos, analisando a sua eficácia e toxicidade para os doentes de cancro do colo do útero (Fu *et al.*, 2017).

A carboplatina, composto de platina, demonstra algumas vantagens sobre a cisplatina relativamente à menor toxicidade e aos efeitos secundários associados (Prasanna, Bunker e Khan, 2017). Deste modo, a eficácia clínica demonstrada pela carboplatina incentiva a sua aplicação clínica no tratamento do cancro, verificando-se inclusivamente o seu uso no tratamento do cancro do ovário, do pulmão e da cabeça e pescoço (Dasari e Tchounwou, 2014). No entanto, a sua aplicação em situações de resistência à cisplatina não demonstra ser vantajosa, uma vez que, sendo a carboplatina um análogo da cisplatina, o tumor também não vai responder a este regime terapêutico (Galluzzi *et al.*, 2012).

Relativamente à aplicação da carboplatina no cancro do colo do útero localmente avançado, estudos de combinação de carboplatina com radioterapia (carbo+RT) comparando com cisplatina seguida de radioterapia (cis+RT) sugerem eficácia semelhante entre os dois modelos de tratamento. No entanto, observa-se uma tendência para uma maior sobrevida livre de progressão da doença e sobrevivência global aquando da aplicação de cisplatina, ainda assim, sem significado estatístico (Sebastião *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2018). No que diz respeito à toxicidade associada a estes dois tratamentos (carbo+RT e cis+RT), quando aplicados em doentes com cancro do colo do útero localmente avançado (estádios IIB a IVA), alguns estudos indicam a carboplatina como sendo mais tolerável, estando associada a menor toxicidade (Xue *et al.*, 2018), enquanto outros apontam toxicidade semelhante à cisplatina (Sebastião *et al.*, 2016). Tal pode, em parte, dever-se ao grupo de doentes sujeito ao tratamento com carboplatina, que apresentam idade avançada e têm mais comorbidades (Sebastião *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2018). Deste modo, a carboplatina concomitante à radioterapia pode representar uma alternativa para as doentes com contra-indicações à



cisplatina, com eficácia similar no tratamento do cancro do colo do útero avançado (Sebastião *et al.*, 2016).

Em alternativa, vários estudos têm analisado a eficácia do docetaxel associado à cisplatina e/ou à radioterapia tanto em ensaios *in vitro* como em doentes com cancro do colo do útero avançado. Gallo *et al.* (2000) demonstraram que o docetaxel apresenta citotoxicidade, através de ensaios *in vitro*, no cancro do colo do útero (Gallo *et al.*, 2000). Além disso, o docetaxel demonstrou aplicabilidade como radiosensibilizador numa linha celular do cancro do colo do útero, em que este fármaco aumentou a citotoxicidade causada pela irradiação na linha celular SiHa (Araki *et al.*, 2002). Deste modo, resultados *in vitro* sugerem a potencial aplicabilidade do docetaxel no tratamento desta doença (Gallo *et al.*, 2000).

Além disso, estudos em doentes com cancro do colo do útero em estádios entre IIB e IVA sugerem a possível inclusão do docetaxel no protocolo de tratamento padrão desta doença. Alvarez *et al.* (2009) demonstraram que a aplicação de uma dose viável de docetaxel funciona como sensibilizador da radiação, sugerindo a realização de mais estudos clínicos com uso de quimiorradioterapia com base em docetaxel em doentes com cancro do colo do útero localmente avançado (Alvarez *et al.*, 2009). Assim, este estudo indica uma concentração de 40mg/m<sup>2</sup> semanal concomitante com radiação (aproximadamente 54Gy por irradiação externa seguida de braquiterapia intracavitária, perfazendo uma dose total de 85Gy) durante um período de 6 semanas, como sendo uma concentração tolerável para uso como radiosensibilizador (Alvarez *et al.*, 2009). Ke *et al.* (2012) sugerem que cisplatina (20mg/m<sup>2</sup>) e docetaxel (35mg/m<sup>2</sup>) em quimiorradioterapia concomitante apresentam eficácia a curto prazo em doentes em estádios entre IIB e IVA, apesar da toxicidade observada relativamente à radioterapia isolada (Ke *et al.*, 2012). Pu *et al.* (2013) reportaram resultados referentes a doentes em estádios IB e IIA submetidos a cirurgia seguidos de uma das seguintes opções terapêuticas, cisplatina (40mg/m<sup>2</sup>/semanal, 5 ciclos) concomitante com radioterapia (46 a 54Gy) e docetaxel (30mg/m<sup>2</sup>/semanal, 5 ciclos) e cisplatina (30mg/m<sup>2</sup>/semanal, 5 ciclos) concomitante com radioterapia (46 a 54Gy) (Pu *et al.*, 2013). Os doentes apresentaram uma maior sobrevivência aos cinco anos quando sujeitos a tratamento com quimiorradioterapia com base em docetaxel e cisplatina, no entanto, a este regime está associado uma maior incidência de efeitos secundários (Pu *et al.*, 2013).

Apesar da toxicidade e da manifestação de efeitos secundários demonstrados em estudos com quimiorradioterapia com base em docetaxel e cisplatina (Ke *et al.*, 2012; Pu *et al.*, 2013), os taxanos apresentam um mecanismo de ação promissor no tratamento do

cancro (Gallo *et al.*, 2000). Deste modo, o presente trabalho pretendeu avaliar o potencial efeito citotóxico do docetaxel e da cisplatina na linha celular HeLa, assim como o efeito da radiação ionizante na sobrevivência celular.

De forma a avaliar de que modo os diferentes mecanismos de ação dos fármacos têm efeito citotóxico na proliferação celular recorreu-se ao ensaio SRB. Este método é considerado adequado e sensível na quantificação da citotoxicidade celular induzida por fármacos, através da medição do conteúdo proteico total, que se correlaciona com a proliferação celular (Voigt, 2005). A obtenção de curvas de concentração-resposta e consequente determinação dos valores de concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ), usada como medida de citotoxicidade *in vitro* (Voigt, 2005), permitem estudar o efeito antiproliferativo de cada fármaco.

Os resultados de citotoxicidade por nós obtidos sugerem que tanto a exposição à cisplatina como ao docetaxel induzem a diminuição da proliferação celular, após 24, 48 e 72 horas de incubação. Este efeito inibitório é dependente da concentração de fármaco bem como do tempo de incubação com o mesmo. Tal como no nosso trabalho, estudos anteriores demonstram a citotoxicidade associada à cisplatina em células HeLa. Através de vários ensaios, nomeadamente do ensaio de MTT (do inglês *3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) e pelo ensaio violeta de cristal, vários estudos evidenciam que este fármaco, em concentrações na ordem dos micromolar, apresenta um efeito inibitório da proliferação e viabilidade celulares, após diferentes tempos de incubação (Filippova *et al.*, 2014; Ji e Zheng, 2010; Kalinec *et al.*, 2016; Kamalipooya *et al.*, 2017; Pariente *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2014). Vários estudos evidenciam o efeito citotóxico do docetaxel (tanto na ordem dos nanomolar como dos micromolar), na linha celular HeLa, recorrendo a vários ensaios, como ensaio de MTT, o ensaio clonogénico e o ensaio SRB. A incubação das células com este fármaco induz a diminuição da proliferação e viabilidade celulares (Guo *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014), bem como da sobrevivência celular de forma dependente da concentração (Balcer-Kubiczek *et al.*, 2006).

Os valores de  $IC_{50}$  obtidos neste estudo, indicados na Tabela V, indicam que a cisplatina apresentou um valor de  $IC_{50}$  de  $12,27 \pm 1,04 \mu M$  às 48 horas e de  $10,20 \pm 0,88 \mu M$  às 72 horas. O docetaxel apresentou o valor de  $IC_{50}$  de  $5,57 \pm 0,56 nM$  às 48 horas e de  $2,65 \pm 0,26 nM$  às 72 horas. Vários estudos analisaram o efeito citotóxico dos dois fármacos referidos nas células HeLa, no entanto poucos determinaram os valores de  $IC_{50}$ . Deste modo, o trabalho de Kamalipooya *et al.* (2017) determinou para 24 horas de incubação com cisplatina o valor de  $IC_{50}$  de  $40 \mu M$  e para as 48 horas um valor de  $IC_{50}$  de  $10 \mu M$  (Kamalipooya *et al.*, 2017).

Balcer-Kubiczek *et al.* (2006) estudaram o efeito de concentrações de 0,1 a 5nM de docetaxel durante 24 horas nas células HeLa, determinando como valor de  $IC_{50}$  0,3nM (Balcer-Kubiczek *et al.*, 2006). Estes estudos de cisplatina vão de encontro com os resultados obtidos no nosso trabalho, no entanto, os que se referem ao docetaxel apresentam valores inferiores aos reportados no nosso trabalho.

As concentrações de cisplatina e de docetaxel utilizadas nos ensaios discutidos abaixo basearam-se nos valores de  $IC_{50}$  obtidos às 48 horas, pelo ensaio SRB. Assim, as condições de tratamento estudadas correspondem a uma concentração inferior ( $IC_{20}$ ), uma igual ao valor de  $IC_{50}$  e outra superior ( $IC_{80}$ ).

De forma a compreender de que modo a radiação ionizante constitui uma agressão celular e quais os mecanismos celulares que despoleta quando é aplicada em dose única, este trabalho debruçou-se na análise da sobrevivência celular, da viabilidade e tipo de morte induzida, bem como da formação de espécies reativas de oxigénio e da presença de defesas antioxidantes.

A radiação ionizante, raios-X, foi aplicada em doses entre 0,5Gy e 10Gy, sob a forma de uma única dose. Com o objetivo de avaliar a sobrevivência celular recorreu-se ao ensaio clonogénico, considerado o *gold standard* nos estudos de agressão celular pela radiação ionizante. Este ensaio permite correlacionar o fator de sobrevivência com a dose aplicada, calculado a partir do número de colónias formadas (Franken *et al.*, 2006; Rafahi *et al.*, 2011). Considerando os vários modelos de agressão celular após exposição à radioterapia, para os resultados obtidos o modelo que melhor os representou e com melhor ajuste foi o modelo de *vários alvos vários toques*, correspondente ao modelo linear quadrático. Este modelo baseia-se no facto de que várias lesões provocadas pela radiação ionizante se acumulam, sem que a célula tenha capacidade de reparar todas estas lesões levando, conseqüentemente, à morte celular (Kelsey *et al.*, 2014).

A curva de sobrevivência obtida descreve uma diminuição da sobrevivência celular a partir dos 2Gy, que se acentua com o aumento da dose de radiação, sendo que o fator de sobrevivência na dose de 2Gy ( $SF_2$ ) foi de  $0,99 \pm 0,25$ . A partir desta curva determinou-se a dose letal média,  $DL_{50}$ , que para esta linha celular foi de 3,15Gy, correspondendo à dose que induz a perda de viabilidade de 50% da população celular. Para além disso, o rácio  $\alpha/\beta$  apresenta um valor de -1,28Gy, apesar de este valor ser negativo devido à componente linear, sugere a linha celular HeLa como radorresistente. Os nossos resultados relativos à ação da radiação na sobrevivência das células HeLa vão de acordo aos indicados no estudo de Jin *et al.* (2018), em que os autores verificaram uma diminuição da sobrevivência celular

com o aumento da dose de radiação (Jin *et al.*, 2018). Segundo Balcer-Kubiczek *et al.* (Balcer-Kubiczek *et al.*, 2006), o fator de sobrevivência obtido para a dose de 2Gy foi de 0,32 nas células HeLa (Balcer-Kubiczek *et al.*, 2006). No entanto, o resultado obtido no nosso trabalho não vai de encontro com o valor obtido por este autor e seus colaboradores, o que poderá estar associado com o protocolo de ensaio clonogénico realizado por estes autores. O trabalho desenvolvido por Kubota e seus colaboradores (2005), estuda o envolvimento da expressão da proteína GRP94 (do inglês *Glucose regulated protein 94*) na resistência de linhas celulares de cancro do colo do útero ao raios-X (Kubota *et al.*, 2005). Através do ensaio clonogénico avaliaram a sensibilidade de várias linhas, incluindo a linha celular HeLa, à radiação e observaram que esta linha apresentava baixa sensibilidade ao raios-X. Para além disso, indicam que a radiorresistência desta linha celular poderá estar associada à elevada expressão de GRP94, que é favorecida em condições de hipoxia (Kubota *et al.*, 2005). A hipoxia é um fator envolvido na resistência à radiação, sendo que é também uma característica apresentada pelo tecido do epitélio estratificado do colo do útero (Fu *et al.*, 2015). Estas características acopladas à baixa expressão de P53 poderão estar associadas à resposta de algumas linhas celulares deste cancro à radioterapia, o que suporta os resultados obtidos no presente trabalho.

Uma célula viável tem a capacidade de se desenvolver e reproduzir, estando estrutural e metabolicamente intacta (Kalinec *et al.*, 2016). Culturas celulares que não estão a proliferar devem apresentar um equilíbrio entre a diminuição de células viáveis e o aumento da morte celular (Kalinec *et al.*, 2016). A fim de perceber de que forma a citotoxicidade causada pelos fármacos e a ação da radiação ionizante afetam a viabilidade e a morte celulares recorreu-se à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo, por citometria de fluxo, e à coloração *May-Grünwald Giemsa* para análise morfológica. A anexina V liga-se à fosfatidilserina, fosfolípido membranar que se encontra no folheto externo durante a apoptose. O iodeto de propídeo intercala no DNA uma vez que a integridade membranar está comprometida no processo de necrose. Assim, a dupla marcação possibilita a distinção de quatro grupos de células, tais como as células viáveis, as células em apoptose inicial, as células em apoptose tardia/necrose e as células em necrose (Elmore, 2007). A coloração *May-Grünwald Giemsa* permite a caracterização morfológica das células, através da coloração do núcleo e do citoplasma (Gonçalves *et al.*, 2013), permitindo corroborar os resultados obtidos pela dupla marcação anexina V/iodeto de propídeo. O processo de apoptose, tipo de morte celular programada, caracteriza-se pela degradação das estruturas intracelulares, em que a matriz do citoesqueleto é degradada e colapsa, causando a perda de volume

celular. Além disso, ocorre a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear. A integridade da membrana fica comprometida, ocorre a formação de protuberâncias membranares que resultam na formação de corpos apoptóticos (Heerde *et al.*, 2000; Telford, Tamul e Bradford, 2016). Em alternativa à morte por apoptose, a necrose é um processo que se caracteriza principalmente pelas seguintes alterações morfológicas, rutura da membrana celular, com perda da sua integridade, e consequente libertação do conteúdo citoplasmático no tecido circundante, desencadeando um processo inflamatório (Elmore, 2007).

Os resultados obtidos evidenciam a diminuição da viabilidade celular acompanhada pelo aumento da morte celular em ambos os fármacos em estudo. A diminuição da população de células viáveis mostrou ser dependente da concentração. No entanto, não se verificou o destaque acentuado de um tipo de morte, independentemente da concentração em estudo ou do fármaco. A cisplatina, quando em concentrações baixas ( $IC_{20}$  e  $IC_{50}$ ), induziu um maior número de células em morte por apoptose inicial, e por necrose quando em concentrações elevadas ( $IC_{80}$ ). O docetaxel, na menor concentração estudada ( $IC_{20}$ ), tendeu a induzir um maior número de células em apoptose inicial, enquanto que, em concentrações maiores ( $IC_{50}$  e  $IC_{80}$ ) se verificou um maior número de células em necrose. De igual forma, verificou-se um aumento de células em apoptose tardia/necrose com o aumento da concentração de docetaxel. No que diz respeito aos resultados obtidos no tratamento com radiação ionizante, de forma geral, indicam uma diminuição da viabilidade celular e o aumento da morte, maioritariamente por necrose. A aplicação única da dose de 2Gy não apresentou efeito significativo quer na diminuição da viabilidade quer no aumento da morte celular. Quando aplicadas doses maiores de radiação (3Gy e 10Gy) já se verificou uma agressão mais significativa da radiação na viabilidade e morte celulares. Deste modo, a radiação ionizante tem efeito na viabilidade celular de forma dependente da dose aplicada. O tipo de morte celular associado aos diferentes tratamentos está de acordo com a análise das características morfológicas das células, com observação principalmente da necrose, pela perda de integridade membranares e libertação do conteúdo intracelular. Em vários estudos que abordam a cisplatina em linhas celulares de cancro do colo do útero, o tipo de morte predominantemente referido é a apoptose. No estudo de Zhang *et al.* (2014) a incubação com a concentração de cisplatina de  $16,67\mu\text{M}$  ( $5\mu\text{g/mL}$ ), durante 48 horas, induziu uma população de células HeLa em apoptose de  $18,87\pm 3,79\%$  (Zhang *et al.*, 2014). Em comparação com o valor de  $IC_{50}$  da cisplatina ( $12,27\mu\text{M}$ ) avaliado no nosso trabalho, em que a percentagem de células em apoptose foi de  $19,50\pm 0,68\%$ , verifica-se que existe

concordância com os nossos resultados de acordo com o estudo anteriormente referido. Para além disso, Zhang *et al.* (2014) indicam que o uso da concentração de 24,76 $\mu$ M de docetaxel em células HeLa, durante 48 horas, induziu uma percentagem de apoptose de 15,87% $\pm$ 3,81% (Zhang *et al.*, 2014). Este resultado não está de acordo com o intervalo de concentrações estudadas no nosso trabalho para este fármaco. No nosso estudo foi possível observar morte celular significativa com concentrações de docetaxel de ordem de grandeza inferior, nomeadamente nanomolar. No trabalho desenvolvido por Balcer-Kubiczek *et al.* (Balcer-Kubiczek *et al.*, 2006), estudaram o efeito da concentração de 1nM de docetaxel por um período de incubação de 24 horas na linha celular HeLa. Os resultados demonstram que ocorre morte celular por apoptose, mas também verificam alguma morte por necrose (Balcer-Kubiczek *et al.*, 2006). Com base nos resultados deste estudo e do nosso podemos sugerir que o docetaxel em baixas concentrações induz morte por apoptose, não sendo o tempo de exposição um fator determinante. No que se refere aos resultados com radiação ionizante, de acordo com o estudo de Jin *et al.* (2018), baixas doses de raios-X não têm influência na apoptose ou na sobrevivência celular. Esta evidência foi também observada nos resultados obtidos neste trabalho. O estudo de Zhao *et al.* (2018) demonstrou o aumento do número de células em apoptose, 48 e 72 horas após a irradiação, sendo a morte celular mais acentuada no maior tempo estudado. No entanto, a ocorrência de apoptose verificou-se ser dependente da dose de raio-X aplicada (Zhao *et al.*, 2018). A morte por apoptose e por necrose pode ocorrer de forma independente, em sequência ou em simultâneo, sendo que o tipo de morte induzido depende do tipo e do grau de agressão, como a radiação, a hipoxia e fármacos citotóxicos. Estes, quando aplicados em doses baixas podem provocar apoptose, no entanto, quando em doses mais altas podem conduzir à morte por necrose (Elmore, 2007; Telford, Tamul e Bradford, 2016). Tal pode explicar os resultados obtidos, que reportam uma maior percentagem de células em necrose, em detrimento da morte por apoptose, quando aplicadas concentrações elevadas, como o valor de IC<sub>80</sub>, de cisplatina e de docetaxel, bem como elevadas doses de radiação, como a dose de 10Gy.

Além da viabilidade e morte celulares, também foi estudado de que modo a cisplatina e o docetaxel afetam a progressão do ciclo celular. Para tal, recorreu-se à técnica de citometria de fluxo, com marcação do DNA com iodeto de propídeo, cujo resultado de fluorescência obtido vai ser proporcional ao conteúdo de DNA presente nas diferentes condições. O ciclo celular consiste na duplicação do material genético celular seguido da divisão em duas células filhas idênticas, que ocorre ao longo de quatro fases distintas. A fase G1 precede a fase S (fase de síntese), seguida da fase G2 e por fim da M (fase mitótica). A

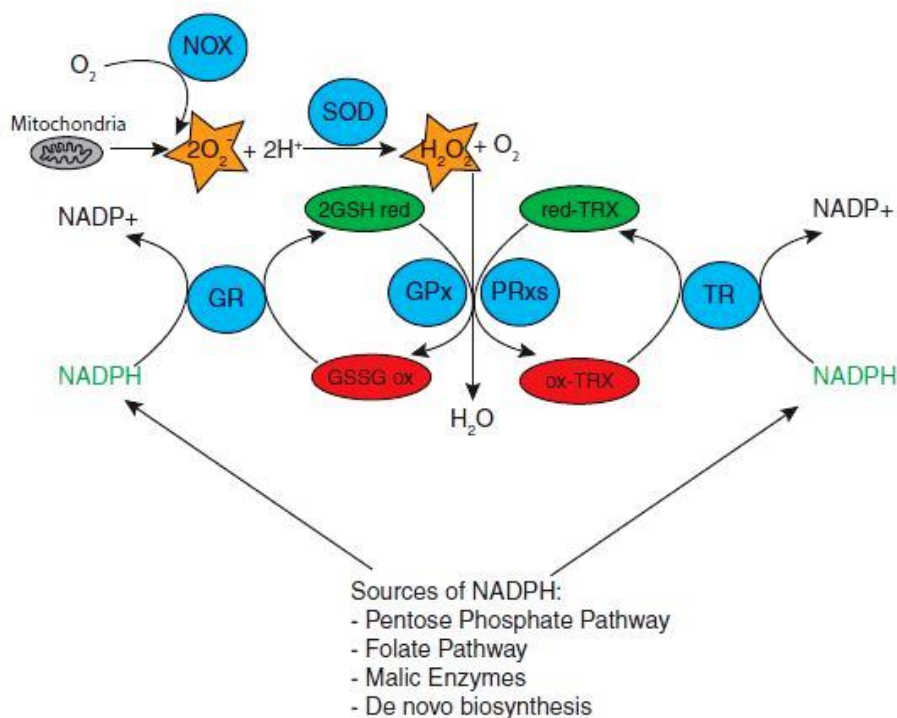
regulação do ciclo celular através da existência de pontos de controlo garante a correta progressão do ciclo, permitindo que eventos críticos, como a replicação do DNA e a segregação dos cromossomas, ocorram corretamente havendo a reparação de eventuais danos nos pontos de controlo. Deste modo, os pontos de controlo do ciclo celular encontram-se no final da fase G1, no final da fase G2 e na fase M, na transição da metáfase para a anáfase. A existência de defeitos nas vias de controlo do ciclo celular conduzem à instabilidade genómica, com progressão do ciclo sem reparação de eventuais danos (Tessema, Lehmann e Kreipe, 2004).

As alterações observadas nas diferentes fases do ciclo celular variam de acordo com o mecanismo de ação de cada fármaco, bem como com a concentração aplicada. Como se pode observar nos nossos resultados, baixas concentrações de cisplatina ( $IC_{20}$ ) induzem um maior número de células a permanecerem na fase G2/M. Para além disso, em concentrações de cisplatina mais elevadas ( $IC_{50}$  e  $IC_{80}$ ) há um maior número de células na fase S do ciclo. Este bloqueio está de acordo com a diminuição da proliferação celular observada às 48 horas. Assim como, o aumento do pico apoptótico, comparativamente ao controlo, é concordante com a morte observada após incubação com diferentes concentrações de cisplatina. No que diz respeito à ação do docetaxel sobre o ciclo celular, verificou-se o predomínio de células na fase G2/M do ciclo na maior concentração estudada ( $IC_{80}$ ). No entanto, na menor concentração há um aumento das células na fase S, em relação ao controlo, bem como das células no pico apoptótico. Na aplicação do valor de  $IC_{50}$  é notório o aumento da população de células na fase S e G2/M, assim como no pico apoptótico. Estes resultados são concordantes com a diminuição da proliferação e com o aumento da morte celular observada. De acordo com o mecanismo de ação da cisplatina, que interage e forma ligações cruzadas com o DNA (Brozovic, Ambriović-Ristov e Osmak, 2010), é expectável que ocorra a inibição da síntese desta molécula nas fases S e G2 do ciclo (Galluzzi *et al.*, 2012). Deste modo, os resultados conseguidos para o tratamento com cisplatina estão de acordo com o seu mecanismo de ação. No que se refere ao mecanismo de ação do docetaxel, que ao funcionar como estabilizador de microtúbulos, induz o bloqueio na fase G2/M (Choy, 2000; Rowinsky e Eric, 1997), tal como se observa nos resultados do presente trabalho nas maiores concentrações testadas. No estudo de Balcer-Kubiczek *et al.* (2006), o tratamento com InM de docetaxel durante 24 horas não induziu bloqueio mitótico, mas permitiu observar morte por apoptose (Balcer-Kubiczek *et al.*, 2006). Assim, estes dados são indicativos que mesmo em baixas concentrações e em tempos reduzidos de exposição, o docetaxel apresenta citotoxicidade mesmo na ausência de bloqueio mitótico.

Posteriormente, estudou-se o efeito dos diferentes tratamentos na produção de espécies reativas de oxigénio e nas defesas antioxidantes presentes nas células. Assim, para a avaliação da produção intracelular de peróxidos e do radical superóxido, recorreu-se às sondas DCFH<sub>2</sub>-DA e DHE, respetivamente, procedendo-se à técnica de citometria de fluxo. Na análise da defesa antioxidante GSH utilizou-se o composto alaranjado de mercúrio para análise por citometria de fluxo. O stresse oxidativo caracteriza-se pelo desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e os níveis de defesas antioxidantes. A exposição das células ao stresse oxidativo pode comprometer as suas funções biológicas (Brozovic, Ambriović-Ristov e Osmak, 2010; Yang *et al.*, 2013). As espécies reativas de oxigénio, sendo as principais o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), o radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>) e o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), são moléculas reativas com capacidade de causar danos nas células pela oxidação de proteínas, de lípidos e de DNA (Gill, Piskounova e Morrison, 2016; Wang e Yi, 2008; Yang *et al.*, 2013). A acumulação de ROS e os danos por estes causados contribuem para o envelhecimento celular e iniciação, desenvolvimento, progressão, invasão e metástases do cancro (Gill, Piskounova e Morrison, 2016; Wang e Yi, 2008). Assim, a célula para manter a homeostase recorre a mecanismos antioxidantes para a remoção de espécies reativas de oxigénio, Figura 25 (Gill, Piskounova e Morrison, 2016). Desta forma, as enzimas antioxidantes tais como a superóxido dismutase (SOD), catálase, peroxirredoxinas (PRx), tiorredoxinas (Trx) e glutaciona peroxidase (GPx) atuam sobre as ROS. Em resposta ao aumento da produção de espécies reativas é expectável o aumento dos níveis de catálase e GPx (Jelić *et al.*, 2018). Por sua vez, antioxidantes não enzimáticos incluem a glutaciona (GSH), o NADPH (do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen*), as vitaminas A, C e E e o beta-caroteno (Gill, Piskounova e Morrison, 2016). O radical superóxido, formado devido à redução de O<sub>2</sub>, é convertido a O<sub>2</sub> ou a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela ação da SOD (Gill, Piskounova e Morrison, 2016; Jelić *et al.*, 2018). Por sua vez, o peróxido de hidrogénio é destoxificado a H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> pela catálase e glutaciona peroxidase (Gill, Piskounova e Morrison, 2016; Jelić *et al.*, 2018), sendo que a redução de uma molécula de peróxido de hidrogénio envolve o consumo de duas moléculas de GSH (Gill, Piskounova e Morrison, 2016). Além disso, as peroxirredoxinas também podem estar envolvidas na regulação dos níveis de peróxido (Gill, Piskounova e Morrison, 2016; Perkins *et al.*, 2015). A glutaciona reduzida funciona como doadora de eletrões à glutaciona peroxidase. Após este processo a glutaciona oxidada (GSSG) volta à sua forma reduzida através da glutaciona redutase (GR) utilizando NADPH como doador de eletrões (Gill, Piskounova e Morrison, 2016; Jelić *et al.*, 2018). De igual forma, a tiorredoxina doa eletrões à peroxirredoxina, sendo posteriormente



reduzida usando NADPH como doador de eletrões (Gill, Piskounova e Morrison, 2016). No entanto, a partir de peróxido de hidrogénio pode formar-se um radical altamente reativo. Na presença de metais de transição, como o ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), pela reação de *Fenton*, ocorre a conversão de peróxido de hidrogénio e a formação do radical hidroxilo (Yang *et al.*, 2013). Para além disso, o radical hidroxilo também se pode formar pela reação *Haber-Weiss*, por interação do radical superóxido e do peróxido de hidrogénio (Kehrer, 2000).



**Figura 25** – Ação dos mecanismos antioxidantes face à formação de espécies reativas de oxigénio. (Retirado de (Gill, Piskounova e Morrison, 2016)).

Os resultados obtidos neste trabalho, no que diz respeito ao tratamento com cisplatina, demonstram que os níveis intracelulares de peróxidos, que são na sua maioria peróxido de hidrogénio, estão aumentados em relação ao controlo, sendo que na menor concentração testada é onde se verifica o aumento mais considerável desta ROS. Apesar de o nosso estudo se ter realizado após 48 horas de incubação com cisplatina, verificam-se alterações a nível do stresse oxidativo, apesar da elevada reatividade e reduzido tempo de vida útil das ROS, que dificultam a sua deteção (Tain *et al.*, 2018). Neste sentido, o estudo de Pariente e seus colaboradores (2016) analisou a formação de ROS após incubação de células HeLa com 20 $\mu\text{M}$  de cisplatina durante 24 horas, sendo que observaram que este fármaco induziu a formação de peróxidos, que se demonstrou associada com a presença de morte celular por apoptose (Pariente *et al.*, 2016). No nosso trabalho, os níveis de glutathiona reduzida estão aumentados, sendo esse aumento semelhante em todas as condições. Este antioxidante funciona como doador de eletrões para a destoxificação do peróxido de hidrogénio, pelo

que para a conversão de uma molécula de  $H_2O_2$  são necessárias duas de GSH. Para além disso, os níveis intracelulares de GSH refletem o balanço entre a sua síntese e o seu consumo (Brozovic, Ambriović-Ristov e Osmak, 2010). Assim, os níveis aumentados deste antioxidante, em relação ao controlo, podem indicar uma ação da célula na tentativa de aumentar as suas defesas a fim de combater o aumento de peróxidos, levando à sua acumulação. No entanto, a GSH formada não está a ser usada na reação de destoxificação do peróxido de hidrogénio. Assim, os nossos resultados indicam que este antioxidante poderá não estar a ser utilizado na destoxificação do peróxido de hidrogénio, pelo que não é à sua ação que se deve o reduzido aumento desta ROS nas concentrações maiores de cisplatina. Outra hipótese para os níveis de peróxidos serem inferiores nas maiores concentrações, em relação à menor concentração de cisplatina, consiste em parte dos peróxidos que se estão a formar serem rapidamente convertidos a radical hidroxilo, pela reação de *Fenton*. Quanto aos níveis de radical superóxido, este fármaco induziu o aumento significativo desta ROS de forma semelhante em todas as condições, o que sugere stresse oxidativo causado por esta espécie. No entanto, a sua formação evidencia a necessidade de avaliar os níveis de SOD, após as diferentes condições de tratamento, a fim de melhor compreender o estado de stresse oxidativo da célula, uma vez que esta enzima antioxidante é responsável pela conversão de radical superóxido em peróxido de hidrogénio. Diferentes linhas celulares do cancro do colo do útero respondem de forma diferente à quimioterapia, como acontece no caso da linha SiHa e da linha CaSki (Filippova *et al.*, 2014). A quimiorresistência aparenta relacionar-se com elevados níveis de defesas antioxidantes presentes nas células, sendo que no estudo de Filippova *et al.* (2014) demonstram uma maior resistência das células SiHa à cisplatina comparativamente com as CaSki, bem como uma maior expressão de enzimas antioxidantes (Filippova *et al.*, 2014). Para além disso, sobre o efeito da cisplatina durante 48 horas nas células HeLa, estas demonstram uma resistência a este fármaco semelhante à observada na linha SiHa. O tratamento com cisplatina, na concentração de  $60\mu M$  e  $100\mu M$ , durante 4 horas, induziu o aumento dos níveis de peróxidos nas células CaSki e SiHa, no entanto não observaram a formação de radical superóxido. Assim, a formação de ROS induzida pelo fármaco a fim de criar stresse oxidativo constituiu uma forma de sensibilizar as células ao tratamento. (Filippova *et al.*, 2014). Relativamente ao tratamento com docetaxel, os níveis de peróxidos diminuíram com o tratamento, sendo essa redução significativa nas maiores concentrações ( $IC_{50}$  e  $IC_{80}$ ). Nas várias condições, os níveis de glutatona reduzida mantiveram-se aproximadamente constantes com o controlo, à exceção da maior concentração de docetaxel em que os níveis

de GSH estão significativamente aumentados. Os níveis de GSH nas condições IC<sub>20</sub> e IC<sub>50</sub> não justificam a diminuição observada dos níveis de peróxidos, o que sugere que esta defesa antioxidante não está a destoxificar esta ROS (Gill, Piskounova e Morrison, 2016). Desta forma, sugerimos que a diminuição dos peróxidos não se deve à ação desta defesa antioxidante, pelo que a sua diminuição poderá dever-se à sua conversão numa espécie mais reativa, o radical hidroxilo, ou então à ação de peroxirredoxinas, que também podem estar envolvidas no processo de destoxificação de níveis elevados de peróxidos (Gill, Piskounova e Morrison, 2016). Relativamente ao radical superóxido, quanto maior a concentração de docetaxel maior a quantidade desta ROS é formada. Assim, os resultados sugerem a presença de stresse oxidativo devido à elevada formação desta ROS, sendo que a citotoxicidade deste fármaco pode estar associado ao stresse oxidativo causado pelo radical superóxido. No entanto, a análise da SOD, tal como referido anteriormente, como enzima antioxidante responsável pela sua conversão em peróxido de hidrogénio, é importante de modo a perceber se está a ser utilizada. Após a exposição à radiação ionizante verificam-se níveis aumentados de peróxidos e de radical superóxido, em comparação com o controlo. Estes resultados vão de acordo com o esperado, uma vez que a radioterapia pode induzir danos indiretos pela radiólise da água, provocando a produção de espécies reativas de oxigénio (Andreo *et al.*, 2005; Kinsella, Sohn e Wessels, 2006). Para além disso, o estudo de Zhao *et al.*, (2018) demonstrou a produção de ROS, a partir da análise da oxidação da sonda DHE, após irradiação comparativamente ao controlo, sendo o seu aumento mais acentuado com elevadas doses (Zhao *et al.*, 2018). Relativamente aos níveis da defesa antioxidante GSH, esta diminui significativamente nas doses de 2 Gy e de 3Gy e aumenta na dose de 10Gy. Tal como demonstram os nossos resultados, quanto maior a dose de radiação maior a formação de ROS, constituindo uma das principais formas de lesão nas células. A formação de espécies reativas de oxigénio pode induzir o processo de oxidação da GSH (Circu e Aw, 2012), o que pode explicar a diminuição da glutathiona reduzida após radiação ionizante. Assim, esta defesa antioxidante pode estar a destoxificar parte dos peróxidos de hidrogénio produzidos após a radiação, com formação de água e de oxigénio. No entanto, na maior dose de radiação, o aumento dos níveis de GSH indicam que não está a atuar sobre os peróxidos. Uma possível explicação poderá basear-se no facto de a exposição prolongada ao stresse oxidativo poder resultar na incapacidade da célula em neutralizar a formação de ROS (Brozovic, Ambriović-Ristov e Osmak, 2010), o que poderá justificar os níveis de GSH na dose de 10Gy.

Por fim, avaliámos a ação do manitol como inibidor do radical hidroxilo, de modo a perceber a influência desta ROS no potencial antiproliferativo da cisplatina e do docetaxel. A

formação do radical hidroxilo, uma ROS altamente reativa, pode ocorrer a partir do peróxido de hidrogénio (reação de *Fenton*) e também deste combinado com o radical superóxido (reação *Haber–Weiss*). Deste modo, a avaliação da proliferação celular após 48 horas de exposição com o fármaco e com manitol, um neutralizador do radical hidroxilo (Ding *et al.*, 2004), permite aferir se esta ROS influencia a citotoxicidade associada aos fármacos. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o manitol inibiu o efeito citotóxico tanto da cisplatina como do docetaxel, apresentando um menor efeito antiproliferativo, que se traduz no aumento dos valores de  $IC_{20}$ , de  $IC_{50}$  e de  $IC_{80}$ . Deste modo, podemos sugerir que o radical hidroxilo está envolvido no mecanismo de ação da cisplatina e do docetaxel e na citotoxicidade causada por estes fármacos nas células HeLa, sendo que durante o tratamento há stresse oxidativo causado por esta ROS.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos sugerir que a produção de espécies reativas de oxigénio é um mecanismo comum às várias terapias abordadas, incluído a quimioterapia com base em cisplatina e em docetaxel e a radioterapia, tal como era indicado por estudos anteriores (Gill, Piskounova e Morrison, 2016; Wang e Yi, 2008). De entre as ROS verificou-se que o radical hidroxilo era produzido durante os tratamentos com cisplatina e docetaxel, estando envolvido na ação citotóxica dos fármacos, como foi comprovado nos resultados de proliferação celular com manitol. A inibição da formação do radical hidroxilo pela ação do manitol refletiu-se não só na diminuição do efeito antiproliferativo dos fármacos, como também se traduziu no aumento dos valores de  $IC_{20}$ , de  $IC_{50}$  e de  $IC_{80}$ . A indução de elevado stresse oxidativo, possivelmente devido ao radical hidroxilo, que é uma ROS altamente reativa e muito citotóxica, poderá sustentar a morte celular por necrose (Yang *et al.*, 2013), principalmente observada nas concentrações e doses mais elevadas, onde se observa o maior stresse oxidativo. No que respeita aos resultados do tratamento com radioterapia, a formação de espécies reativas de oxigénio, pela radiólise da água, constitui o principal mecanismo indireto de ação da radiação ionizante. Contudo, na aplicação da dose de 2Gy, os níveis de peróxidos, de radical superóxido e de glutathiona reduzida são semelhantes ao controlo, o que sugere que esta dose, de aplicação única, não induziu stresse oxidativo. De acordo, a morte celular induzida 48 horas após exposição à dose de radiação de 2Gy é relativamente baixa. Estes factos sustentam o comportamento da sobrevivência celular com o aumento da dose de radiação, assim como, o valor da  $DL_{50}$  que é superior a 2Gy.



# **Conclusões e Perspetivas Futuras**



A terapêutica do cancro do colo do útero consiste em cirurgia, nos estádios iniciais da doença, podendo recorrer-se à radioterapia externa e à braquiterapia, assim como à quimioterapia, com base em cisplatina, concomitante com radioterapia em situação de cancro avançado. No entanto, tendo em conta a resistência revelada por algumas doentes em relação à cisplatina, para além da toxicidade associada, outros compostos quimioterapêuticos têm sido alvo de estudo avaliando a sua potencial aplicabilidade neste cancro. Como tal, este trabalho debruçou-se no estudo do docetaxel com aplicação isolada, para além de analisar a cisplatina e a radioterapia, em células de adenocarcinoma do colo do útero. Desta forma, tentou compreender-se melhor a citotoxicidade causada e quais os possíveis mecanismos envolvidos na ação do docetaxel nas células HeLa.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem a potencial aplicabilidade do docetaxel no tratamento do cancro do colo do útero. Tendo por base a citotoxicidade demonstrada por este fármaco tanto na diminuição da proliferação como na morte celular, comparativamente à cisplatina, os resultados sugerem que a sua aplicação seria eficaz para o tratamento deste tipo de cancro. Os ensaios de citotoxicidade indicam que o docetaxel diminuiu a proliferação das células HeLa de forma dependente da concentração. Para além disso, quanto maior o tempo de exposição menor é a concentração necessária para obter efeito inibitório equivalente. De igual forma, a viabilidade celular causada por este fármaco é dependente da concentração aplicada, assim como o stresse oxidativo. Para além do principal mecanismo de ação do docetaxel consistir na estabilização dos microtúbulos, a indução de stresse oxidativo aparenta participar no mecanismo deste fármaco, contribuindo para a citotoxicidade causada pelo docetaxel.

A cisplatina e a radioterapia demonstraram igualmente causar citotoxicidade na linha celular em estudo, o que é congruente com a sua aplicabilidade e eficácia clínica. Através da determinação dos valores de concentração inibitória média dos fármacos, os nossos resultados enfatizam efeito inibitório do docetaxel, demonstrando o seu potencial para o tratamento desta patologia. A gama de concentrações do  $IC_{50}$  e o mecanismo de ação do docetaxel sugerem que a combinação deste com a radioterapia constituiria uma abordagem terapêutica benéfica no cancro do colo do útero. O facto de o docetaxel atuar como estabilizador de microtúbulos e induzir o bloqueio do ciclo celular numa fase mais sensível à radiação, sugere a sua aplicação como radiosensibilizador.

Neste contexto, vários parâmetros devem ser analisados em continuidade deste trabalho, incluindo a análise do ciclo celular e da expressão da proteína P53, após exposição à radiação e da sobrevivência celular após tratamento com cisplatina e docetaxel. Estudos



que permitam uma melhor compreensão do stresse oxidativo induzido pelos diferentes tratamentos, mais necessariamente, a atividade da enzima SOD, o efeito da catalase na inibição do stresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogénio e o efeito do manitol no tratamento com radiação. De forma a melhor entender qual a via envolvida na morte por apoptose (intrínseca ou extrínseca), poderia analisar-se o potencial de membrana mitocondrial, a expressão da BAX (do inglês *BCL-2 associated X protein*) e de BCL2 (do inglês *B-cell lymphoma 2 protein*), a expressão das caspases 8 e 9 e ainda a extensão das lesões a nível do DNA. Posteriormente, de modo a avaliar a capacidade de radiosensibilização do docetaxel e de forma a comparar com o efeito da cisplatina concomitante com radioterapia, sugerem-se estudos de concomitância, com incubação das células com baixas concentrações de fármaco, seguidas de radiação ionizante.

## **Referências Bibliográficas**



ALVAREZ, E. A. *et al.* - A phase I study of docetaxel as a radio-sensitizer for locally advanced squamous cell cervical cancer. **Gynecologic Oncology**. . ISSN 00908258. 113:2 (2009) 195–199. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.12.033.

ANDREO, P. *et al.* - **Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students**. Vienna : IAEA, 2005. ISBN 9201073046.

ARAKI, S. *et al.* - Neoadjuvant treatment with docetaxel and the effects of irradiation for human ovarian adenocarcinoma and cervical squamous cell carcinoma in vitro. **Acta medica Okayama**. . ISSN 0386-300X. 56:1 (2002) 13–8. doi: 10.18926/AMO/31723.

ARBYN, M. *et al.* - European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second Edition--Summary Document. **Annals of Oncology**. . ISSN 0923-7534. 21:3 (2010) 448–458. doi: 10.1093/annonc/mdp471.

BAGGARLEY, Shaun *et al.* - **Radiation Oncology in Palliative Cancer Care**. UK : John Wiley & Sons, Ltd, 2013. ISBN 9781118484159.

BALCER-KUBICZEK, E. K. *et al.* - Cytotoxicity of Docetaxel (Taxotere®) Used as a Single Agent and in Combination with Radiation in Human Gastric, Cervical and Pancreatic Cancer Cells. **Chemotherapy**. . ISSN 0009-3157. 52:5 (2006) 231–240. doi: 10.1159/000094869.

BERNIER, J.; HALL, E. J.; GIACCIA, A. - Radiation oncology: a century of achievements. **Nature Reviews Cancer**. . ISSN 1474-175X. 4:9 (2004) 737–747. doi: 10.1038/nrc1451.

BHATLA, N. *et al.* - Global Guidance For Cervical Cancer Prevention and Control. **International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO)**. (2009).

BLUMENTHAL, P. D.; MCINTOSH, N. - **Cervical Cancer Prevention Guidelines for Low-Resource Settings**. Baltimore, USA : Jhpiego, 2005. ISBN 0-929817-85-0.

BOSCH, F. X.; SANJOSÉ, S. - The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Disease markers**. 23:4 (2007) 213–27.

BRÖMME, H. J. *et al.* - DCFH2 interactions with hydroxyl radicals and other oxidants - Influence of organic solvents. **Experimental Gerontology**. . ISSN 05315565. 43:7 (2008) 638–644. doi: 10.1016/j.exger.2008.01.010.

BROZOVIC, A.; AMBRIOVIĆ-RISTOV, A.; OSMAK, M. - The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. **Critical Reviews in Toxicology**. 40:4 (2010) 347–359. doi: 10.3109/10408441003601836.

CEVIK, U.; DALKARA, T. - Intravenously administered propidium iodide labels necrotic cells in the intact mouse brain after injury. **Cell Death and Differentiation**. . ISSN 13509047. 10:8 (2003) 928–929. doi: 10.1038/sj.cdd.4401250.

CHANG, L.; GUO, R. - Comparison of the efficacy among multiple chemotherapeutic interventions combined with radiation therapy for patients with cervix cancer after surgery: A network meta-analysis. **Oncotarget**. 8:30 (2017). doi: 10.18632/oncotarget.17259.

CHEN, X. *et al.* - Weekly Versus Triweekly Cisplatin-Based Chemotherapy Concurrent With Radiotherapy in the Treatment of Cervical Cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**. 27:2 (2017) 344–349. doi: 10.1097/IGC.0000000000000883.

CHOY, H. - Combining taxanes with radiation for solid tumors. **International journal of cancer**. 90:3 (2000) 113–27.

CHOY, H. - Taxanes in combined modality therapy for solid tumors. **Critical reviews in oncology/hematology**. 37:3 (2001) 237–47.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. - Glutathione and modulation of cell apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**. 1823:10 (2012) 1767–1777. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.06.019.

CLARKE, S. J.; RIVORY, L. P. - Clinical pharmacokinetics of docetaxel. **Clin Pharmacokinet**. 36:2 (1999) 99–114.

COGLIANO, V. J. *et al.* - Preventable Exposures Associated With Human Cancers. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**. 103:24 (2011) 1827–1839. doi: 10.1093/jnci/djr483.

CROSBIE, E. J. *et al.* - Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**. 382:9895 (2013) 889–899. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60022-7.

CROWLEY, L. C. *et al.* - Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**. . ISSN 15596095. 2016:7 (2016) 647–651.

doi: 10.1101/pdb.prot087163.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. - Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**. . ISSN 00142999. 740 (2014) 364–378. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.

DENG, H. *et al.* - Establishment and optimization of epithelial cell cultures from human ectocervix, transformation zone, and endocervix optimization of epithelial cell cultures. **Journal of Cellular Physiology**. . ISSN 00219541. (2019). doi: 10.1002/jcp.28049.

DING, X. *et al.* - Hematoporphyrin monomethyl ether photodynamic damage on HeLa cells by means of reactive oxygen species production and cytosolic free calcium concentration elevation. **Cancer Letters**. 216:1 (2004) 43–54. doi: 10.1016/j.canlet.2004.07.005.

DÜRST, M. *et al.* - A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 80:12 (1983) 3812–5.

ELMORE, S. - Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**. . ISSN 01926233. 35:4 (2007) 495–516. doi: 10.1080/01926230701320337.

ESKANDER, R. N.; TEWARI, K. S. - Chemotherapy in the treatment of metastatic, persistent, and recurrent cervical cancer. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**. 26:4 (2014) 314–321. doi: 10.1097/GCO.0000000000000042.

FERLAY, J. *et al.* - Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. **European journal of cancer (Oxford, England:1990)**. 49:6 (2013) 1374–403. doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.

FERLAY, J. *et al.* - Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**. . ISSN 10970215. 136:5 (2015) E359–E386. doi: 10.1002/ijc.29210.

FERLAY, J. *et al.* - Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**. (2018). doi: 10.1002/ijc.31937.

FILIPPOVA, M. *et al.* - Cellular Levels of Oxidative Stress Affect the Response of Cervical Cancer Cells to Chemotherapeutic Agents. **BioMed Research International**. . ISSN 2314-6133. 2014 (2014) 1–14. doi: 10.1155/2014/574659.

FORMENTI, S. C.; DEMARIA, S. - Systemic effects of local radiotherapy. **The Lancet Oncology**. . ISSN 14702045. 10:7 (2009) 718–726. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70082-8.

FOROUZANFAR, M. H. *et al.* - Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. **The Lancet**. 378:9801 (2011) 1461–1484. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61351-2.

FRANKEN, N. A. P. *et al.* - Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**. . ISSN 17542189. 1:5 (2006) 2315–2319. doi: 10.1038/nprot.2006.339.

FREEMAN, S. J. *et al.* - The Revised FIGO Staging System for Uterine Malignancies: Implications for MR Imaging. **RadioGraphics**. 32:6 (2012) 1805–1827. doi: 10.1148/rg.326125519.

FU, Z. *et al.* - Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Protects Cervical Carcinoma Cells from Apoptosis Induced by Radiation via Modulation of Vascular Endothelial Growth Factor and p53 under Hypoxia. **Medical Science Monitor**. 21 (2015) 318–325. doi: 10.12659/MSM.893265.

FU, Z. Z. *et al.* - Efficacy and toxicity of different concurrent chemoradiotherapy regimens in the treatment of advanced cervical cancer. **Medicine**. . ISSN 0025-7974. 96:2 (2017) e5853. doi: 10.1097/MD.0000000000005853.

GALLETTI, E. *et al.* - Paclitaxel And Docetaxel Resistance: Molecular Mechanisms and Development of New Generation Taxanes. **ChemMedChem**. 2:7 (2007) 920–942. doi: 10.1002/cmdc.200600308.

GALLO, D. *et al.* - Anti-tumour activity of a panel of taxanes toward a cellular model of human cervical cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. 45:2 (2000) 127–132. doi: 10.1007/s002800050020.

GALLUZZI, L. *et al.* - Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncogene**. 31:15 (2012) 1869–1883. doi: 10.1038/onc.2011.384.

GILL, J. G.; PISKOUNOVA, E.; MORRISON, S. J. - Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**. . ISSN 0091-7451. 81 (2016) 163–175. doi: 10.1101/sqb.2016.81.030791.

GONÇALVES, A. C. *et al.* - Oxidative stress mediates apoptotic effects of ascorbate and dehydroascorbate in human Myelodysplasia cells in vitro. **Toxicology in Vitro**. 27:5 (2013) 1542–1549. doi: 10.1016/j.tiv.2013.03.009.

GUO, X. *et al.* - Dual Role of Photosensitizer and Carrier Material of Fullerene in Micelles for Chemo–Photodynamic Therapy of Cancer. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 103:10 (2014) 3225–3234. doi: 10.1002/jps.24124.

HEERDE, W. L. V *et al.* - Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: Focus on Annexin V. **Cardiovascular Research**. . ISSN 00086363. 45:3 (2000) 549–559. doi: 10.1016/S0008-6363(99)00396-X.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER *et al.* - Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. **International Journal of Cancer**. . ISSN 00207136. 118:6 (2006a) 1481–1495. doi: 10.1002/ijc.21493.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER *et al.* - Cervical carcinoma and reproductive factors: Collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. **International Journal of Cancer**. . ISSN 0020-7136. 119:5 (2006b) 1108–1124. doi: 10.1002/ijc.21953.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER *et al.* - Cervical Carcinoma and Sexual Behavior: Collaborative Reanalysis of Individual Data on 15,461 Women with Cervical Carcinoma and 29,164 Women without Cervical Carcinoma from 21 Epidemiological Studies. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**. . ISSN 1055-9965. 18:4 (2009) 1060–1069. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-1186.

JELIĆ, M. *et al.* - Lipid Peroxidation, Antioxidative Defense and Level of 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine in Cervical Cancer Patients. **Journal of Medical Biochemistry**. 37:3 (2018) 336–345. doi: 10.1515/jomb-2017-0053.

Jl, J.; ZHENG, P. S. - Activation of mTOR signaling pathway contributes to survival of cervical cancer cells. **Gynecologic Oncology**. 117:1 (2010) 103–108. doi:



10.1016/j.ygyno.2009.12.020.

JIN, X. *et al.* - Different mitochondrial fragmentation after irradiation with X-rays and carbon ions in HeLa cells and its influence on cellular apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 500:4 (2018) 958–965. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.214.

KALINEC, G. *et al.* - HEI-OCI cells as a model for investigating drug cytotoxicity. **Hearing Research**. 335 (2016) 105–117. doi: 10.1016/j.heares.2016.02.019.

KAMALIPOOYA, S. *et al.* - Simultaneous application of cisplatin and static magnetic field enhances oxidative stress in HeLa cell line. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**. 53:9 (2017) 783–790. doi: 10.1007/s11626-017-0148-z.

KE, Q. H. *et al.* - Early efficacy of taxotere and cisplatin chemo-radiotherapy for advanced cervical cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**. . ISSN 2476-762X. 13:2 (2012) 617–9.

KEHRER, J. P. - The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**. 149:1 (2000) 43–50.

KELSEY, C. A. *et al.* - **Radiation Biology of Medical Imaging**. Hoboken, New Jersey : John Wiley & Sons, Inc., 2014. ISBN 9781118517154.

KINSELLA, T. J.; SOHN, J.; WESSELS, B. - Principles of Radiation Oncology. Em . New York, NY : Springer, 2006. p. 41–42.

KOSHIOL, J. E. *et al.* - Time to clearance of human papillomavirus infection by type and human immunodeficiency virus serostatus. **International Journal of Cancer**. 119:7 (2006) 1623–1629. doi: 10.1002/ijc.22015.

KOVÁCS, K. *et al.* - A 7.5-year prospective study of longer than 18 months type-specific human papillomavirus persistence in a routine cytology-based cervical screening population of about 31 000 women in West Germany. **European Journal of Cancer Prevention**. 18:4 (2009) 307–315. doi: 10.1097/CEJ.0b013e328324061a.

KUBOTA, H. *et al.* - Increased expression of GRP94 protein is associated with decreased sensitivity to X-rays in cervical cancer cell lines. **International Journal of Radiation Biology**. 81:9 (2005) 701–709. doi: 10.1080/09553000500434727.

LEAL, C.; CUNHA, T. M.; JORGE, A. F. - Traquelectomia como Método de Preservação da Fertilidade no Carcinoma do Colo do Útero. **Acta Radiológica Portuguesa**. 22:88 (2010) 33–37.

LEISCHING, G. *et al.* - A Nontoxic Concentration of Cisplatin Induces Autophagy in Cervical Cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**. 25:3 (2015) 380–388. doi: 10.1097/IGC.0000000000000365.

MARTH, C. *et al.* - Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**. 28:suppl\_4 (2017) iv72-iv83. doi: 10.1093/annonc/mdx220.

MATSUMOTO, K. *et al.* - Predicting the progression of cervical precursor lesions by human papillomavirus genotyping: A prospective cohort study. **International Journal of Cancer**. 128:12 (2011) 2898–2910. doi: 10.1002/ijc.25630.

MCCARTY, M. F.; O'KEEFE, J. H.; DINICOLANTONIO, J. J. - Dietary Glycine Is Rate-Limiting for Glutathione Synthesis and May Have Broad Potential for Health Protection. . ISSN 1524-5012. 18:1 (2018) 81–87.

MENDES, Fernando - **CARATERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO EM NEOPLASIAS** Estudo experimental em linfoma e carcinoma do pulmão de pequenas células. Universidade de Coimbra, 2016

MOSCICKI, A. B. *et al.* - Updating the Natural History of Human Papillomavirus and Anogenital Cancers. **Vaccine**. 30 (2012) F24–F33. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.05.089.

MUÑOZ, N. *et al.* - Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**. 24 Suppl 3 (2006) S3/I-10. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.05.115.

O'MALLEY, Y. Q.; RESZKA, K. J.; BRITIGAN, B. E. - Direct oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein by pyocyanin and other redox-active compounds independent of reactive oxygen species production. **Free Radical Biology and Medicine**. . ISSN 08915849. 36:1 (2004) 90–100. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.021.

PADILHA, C. M. L.; ARAÚJO, M. L. C. J.; SOUZA, S. A. L. - Cytopathologic evaluation of patients submitted to radiotherapy for uterine cervix cancer. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 63:4 (2017) 379–385. doi: 10.1590/1806-9282.63.04.379.

PARIENTE, R. *et al.* - Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: effects on oxidative stress and DNA fragmentation. **Journal of Pineal Research**. 60:1 (2016) 55–64. doi: 10.1111/jpi.12288.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. - Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. **Vaccine**. 24 (2006) S11–S25. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.05.111.

PERKINS, A. *et al.* - Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. **Trends in Biochemical Sciences**. 40:8 (2015) 435–445. doi: 10.1016/j.tibs.2015.05.001.

PINHEIRO, P. S. *et al.* - Cancer incidence and mortality in Portugal. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**. 39:17 (2003) 2507–20.

PRASANNA, R.; BUNGER, D.; KHAN, M. - Efficacy and safety of DoceAqualip in a patient with locally advanced cervical cancer: A case report. **Molecular and Clinical Oncology**. (2017). doi: 10.3892/mco.2017.1519.

PU, J. *et al.* - A randomized controlled study of single-agent cisplatin and radiotherapy versus docetaxel/cisplatin and radiotherapy in high-risk early-stage cervical cancer after radical surgery. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. 139:4 (2013) 703–708. doi: 10.1007/s00432-013-1373-9.

QUINTANILHA, J. C. F. *et al.* - Involvement of cytochrome P450 in cisplatin treatment: implications for toxicity. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. 80:2 (2017) 223–233. doi: 10.1007/s00280-017-3358-x.

RAFEHI, H. *et al.* - Clonogenic Assay: Adherent Cells. **Journal of Visualized Experiments**. . ISSN 1940-087X. 49 (2011) 15–17. doi: 10.3791/2573.

RICE, GI C. *et al.* - Quantitative Analysis of Cellular Glutathione by Flow Cytometry Utilizing Monochlorobimane: Some Applications to Radiation and Drug Resistance in Vitro and in Vivo Quantitative Analysis of Cellular Glutathione by Flow Cytometry Utilizing Monochlorobimane. (1986) 6105–6110.

RODRIGUEZ, A. C. *et al.* - Rapid Clearance of Human Papillomavirus and Implications for Clinical Focus on Persistent Infections. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**. 100:7 (2008) 513–517. doi: 10.1093/jnci/djn044.

ROWINSKY, MD; ERIC, K. - THE DEVELOPMENT AND CLINICAL UTILITY OF THE TAXANE CLASS OF ANTIMICROTUBULE CHEMOTHERAPY AGENTS. **Annual Review of Medicine**. 48:1 (1997) 353–374. doi: 10.1146/annurev.med.48.1.353.

SANT, M. *et al.* - Survival of women with cancers of breast and genital organs in Europe 1999–2007: Results of the EURO CARE-5 study. **European Journal of Cancer**. 51:15 (2015) 2191–2205. doi: 10.1016/j.ejca.2015.07.022.

SCHIFFMAN, M. *et al.* - The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. **Virology**. . ISSN 00426822. 337:1 (2005) 76–84. doi: 10.1016/j.virol.2005.04.002.

SCHIFFMAN, M. *et al.* - Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet (London, England)**. . ISSN 1474-547X. 370:9590 (2007) 890–907. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61416-0.

SEBASTIÃO, A. M. *et al.* - Carboplatin-based chemoradiotherapy in advanced cervical cancer: an alternative to cisplatin-based regimen? **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. . ISSN 03012115. 201 (2016) 161–165. doi: 10.1016/j.ejogrb.2016.03.016.

SERRANO, B. *et al.* - Human papillomavirus genotype attribution for HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58 in female anogenital lesions. **European Journal of Cancer**. . ISSN 09598049. 51:13 (2015) 1732–1741. doi: 10.1016/j.ejca.2015.06.001.

SMALL, W. *et al.* - Cervical cancer: A global health crisis. **Cancer**. . ISSN 0008543X. 123:13 (2017) 2404–2412. doi: 10.1002/cncr.30667.

SMITH, J. S. *et al.* - Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. . ISSN 0027-8874. 94:21 (2002) 1604–13.

SMITH, J. S. *et al.* - Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. **Lancet (London, England)**. . ISSN 0140-6736. 361:9364 (2003) 1159–67.

SOCIEDADE PORTUGUESA DE GINECOLOGIA - Cancro Ginecológico, Consensos Nacionais 2016. Em **SPG**. Disponível em WWW:<URL:[http://www.spGINECOLOGIA.pt/uploads/cancro\\_ginecologico\\_9JAN2017.pdf](http://www.spGINECOLOGIA.pt/uploads/cancro_ginecologico_9JAN2017.pdf)>.

TAIN, R. W. *et al.* - Imaging short-lived reactive oxygen species (ROS) with endogenous

contrast MRI. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**. . ISSN 10531807. 47:1 (2018) 222–229. doi: 10.1002/jmri.25763.

TARPEY, M. M. - Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. . ISSN 0363-6119. 286:3 (2004) 431R–444. doi: 10.1152/ajpregu.00361.2003.

TELFORD, W.; TAMUL, Karen; BRADFORD, Jolene - Measurement and characterization of apoptosis by flow cytometry. **Current Protocols in Cytometry**. . ISSN 19349300. 2016:July (2016) 9.49.1-9.49.28. doi: 10.1002/cpcy.1.

TESSEMA, Ma; LEHMANN, U.; KREIPE, H. - Cell cycle and no end. **Virchows Archiv**. . ISSN 09456317. 444:4 (2004) 313–323. doi: 10.1007/s00428-003-0971-3.

THAKUR, J. S. *et al.* - Cisplatin-based chemotherapy: Add high-frequency audiometry in the regimen. **Indian Journal of Cancer**. . ISSN 0019-509X. 46:4 (2009) 311. doi: 10.4103/0019-509X.55551.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. - Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**. . ISSN 17542189. 1:3 (2006) 1112–1116. doi: 10.1038/nprot.2006.179.

VOGIN, G.; FORAY, N. - The law of Bergonié and Tribondeau: A nice formula for a first approximation. **International Journal of Radiation Biology**. . ISSN 0955-3002. 89:1 (2013) 2–8. doi: 10.3109/09553002.2012.717732.

VOIGT, W. - Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity. **Methods Mol Med**. 110 (2005) 39–48. doi: 10.1385/1-59259-869-2:039.

VU, M. *et al.* - Cervical cancer worldwide. **Current problems in cancer**. . ISSN 1535-6345. (2018). doi: 10.1016/j.currprobcancer.2018.06.003.

WANG, J.; YI, J. - Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. **Cancer biology & therapy**. . ISSN 1555-8576. 7:12 (2008) 1875–84.

WEIDERPASS, E.; LABRÈCHE, F. - Malignant tumors of the female reproductive system. **Safety and health at work**. . ISSN 2093-7997. 3:3 (2012) 166–80. doi: 10.5491/SHAW.2012.3.3.166.

XUE, R. *et al.* - The efficacy of concurrent weekly carboplatin with radiotherapy in the treatment of cervical cancer: A meta-analysis. **Gynecologic Oncology**. . ISSN 00908258. 150:3 (2018) 412–419. doi: 10.1016/j.ygyno.2018.07.005.

YAACOB, N. S. *et al.* - Anticancer activity of a sub-fraction of dichloromethane extract of *Strobilanthes crispus* on human breast and prostate cancer cells in vitro. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. . ISSN 1472-6882. 10:1 (2010) 42. doi: 10.1186/1472-6882-10-42.

YANG, Y. *et al.* - Reactive oxygen species in cancer biology and anticancer therapy. **Current medicinal chemistry**. . ISSN 1875-533X. 20:30 (2013) 3677–92.

ZHANG, Y. *et al.* - Efficacy of concurrent single-agent chemotherapy using radiotherapy in patients with cervical cancer: a meta-analysis. **International journal of clinical and experimental medicine**. . ISSN 1940-5901. 8:6 (2015) 8661–73.

ZHANG, Y. X. *et al.* - Mechanisms of hela cell apoptosis induced by abnormal Savda Munziq total phenolics combined with chemotherapeutic agents. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**. . ISSN 2476-762X. 15:2 (2014) 743–7.

ZHAO, H. *et al.* - Effects of different doses of X-ray irradiation on cell apoptosis, cell cycle, DNA damage repair and glycolysis in HeLa cells. **ONCOLOGY LETTERS**. 17 (2018) 42–54.

ZHU, X. *et al.* - Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. **Drug Design, Development and Therapy**. . ISSN 1177-8881. (2016) 1885. doi: 10.2147/DDDT.S106412.



## **Lista de Abreviaturas e Símbolos**





ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AV	Anexina V
BAX	<i>BCL-2 associated X protein</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2 protein</i>
CCU	Cancro do colo do útero
CIN	<i>Cervical intraepithelial neoplasia</i>
Cl <sup>-</sup>	Iões cloreto
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CTR I	<i>Copper transporter I</i>
DCF	<i>2',7'- dichlorofluorescein</i>
DCFH	<i>2',7'- dichlorodihydrofluorescein</i>
DCFH <sub>2</sub> -DA	<i>2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>
DHE	<i>dihydroethidium</i>
DL <sub>50</sub>	Dose letal média
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
Fe <sup>2+</sup>	lão ferroso
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GRP94	<i>Glucose regulated protein 94</i>

GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
Gy	Gray
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HPV	<i>Human Papillomavirus</i>
HSV-2	<i>Herpes simplex virus type 2</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC <sub>50</sub>	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
IP	Iodeto de Propídeo
LET	<i>Linear energy transfer</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MeV	Mega electrão-Volt
MIF	Media de intensidade de fluorescência
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
MU	<i>Monitor Units</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NH <sub>3</sub>	Amónia
O <sub>2</sub>	Oxigénio
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical Superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxilo
P53	Proteína supressora tumoral P53
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

PE	<i>Plate efficieny</i>
PET	<i>Positron emission tomography</i>
PRx	Peroxirredoxinas
PS	<i>Performance Status</i>
RB	Proteína do Retinoblastoma
RM	Ressonância Magnética
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SF	<i>Surviving factor</i>
SOD	Superóxido dismutase
SRB	<i>Sulforhodamine B</i>
TC	Tomografia Computorizada
Trx	Tiorredoxinas
UV	Ultravioleta
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>



## **Índice de Figuras e Tabelas**



## Índice de Figuras

- Figura 1** – Estimativa da incidência e da mortalidade do cancro em ambos os sexos, em todo o mundo em 2018. Retirado de International Agency for Research on Cancer, 2018. .... - 18 -
- Figura 2** - Estimativa da incidência e da mortalidade dos cancros mais comuns nas mulheres, em todo o mundo em 2018. Retirado de International Agency for Research on Cancer, 2018. .... - 19 -
- Figura 3** – Revestimento do colo do útero, constituído por epitélio escamoso e pelo epitélio colunar. Retirado de (Blumenthal e McIntosh, 2005). .... - 24 -
- Figura 4** – Curvas de sobrevivência celular de cada fase do ciclo celular (Retirado de (Kelsey et al., 2014)). .... - 34 -
- Figura 5** – Estrutura química da cisplatina (Retirado de (Quintanilha et al., 2017))..... - 35 -
- Figura 6** – Mecanismo de ação da cisplatina. Ligações cruzadas formadas pela interação da cisplatina com o DNA: (a) ligação intra-cadeia I,2-GpG; (b) ligação intra-cadeia I,2-ApG; (c) ligação com DNA e proteína; (d) ligação inter-cadeia com guaninas; (e) ligação intra-cadeia I,3-GpXpG. As ligações representadas em (a) são as mais frequentes. Esquema elaborado com recurso a smart.servier.com. .... - 36 -
- Figura 7** - Estrutura química da cisplatina (Retirado de (Galletti et al., 2007))..... - 38 -
- Figura 8** – Mecanismo de ação do docetaxel. Interação do docetaxel com a tubulina na formação dos microtúbulos, promovendo a sua polimerização e atuando como estabilizador. Esquema elaborado com recurso a smart.servier.com. .... - 39 -
- Figura 9** – Fotografia da caixa de irradiação utilizada para irradiação das células, juntamente com o acelerador Varian Clinac 600C..... - 50 -
- Figura 10** - Curva de concentração-resposta da linha celular HeLa após exposição a concentrações crescentes de cisplatina (A) e de docetaxel (B) durante 24, 48 e 72 horas. Os resultados exprimem a percentagem de proliferação celular em função do logaritmo da concentração de fármaco, apresentados na forma de média e erro padrão, obtidos em pelo menos quatro experiências independentes em triplicado. .... - 63 -



**Figura 11** – Curva de sobrevivência celular obtida após agressão celular por irradiação das células HeLa. Os resultados foram obtidos através do ensaio clonogénico e estão expressos na forma de média e erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. A curva foi ajustada ao modelo linear-quadrático. .... - 66 -

**Figura 12** - Viabilidade e tipos de morte celular induzidos na linha celular HeLa após incubação com cisplatina durante 48 horas. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo por dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Os resultados estão expressos em percentagem (%) de células viáveis (V), de células em apoptose inicial (AI), de células em apoptose tardia/necrose (AT/N) e de células em necrose (N). Os resultados são representados na forma de média e erro padrão de pelo menos três experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* para  $p < 0,05$ ; com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação ao valor de  $IC_{20}$  estão representadas com # para  $p < 0,05$ ; com ## para  $p < 0,01$  e com ### para  $p < 0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação ao valor  $IC_{50}$  estão assinaladas com \$ para  $p < 0,05$ ; com \$\$ para  $p < 0,01$  e com \$\$\$ para  $p < 0,001$ . .... - 67 -

**Figura 13** - Características morfológicas das células HeLa, após 48 horas de incubação com o valor de  $IC_{20}$ , de  $IC_{50}$  e de  $IC_{80}$  de cisplatina. As imagens foram conseguidas através de esfregaços corados com May-Grünwald Giemsa. A imagem (A) representa células controlo não tratadas, a imagem (B) células tratadas com o valor de  $IC_{20}$ , a imagem (C) células tratadas com o valor de  $IC_{50}$  e a imagem (D) células tratadas com o valor de  $IC_{80}$ . As imagens representadas estão com uma ampliação de 400x. .... - 69 -

**Figura 14** - Viabilidade e tipos de morte celular induzidos na linha celular HeLa após incubação com docetaxel durante 48 horas. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo por dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Os resultados estão expressos em percentagem (%) de células viáveis (V), de células em apoptose inicial (AI), de células em apoptose tardia/necrose (AT/N) e de células em necrose (N). Os resultados são representados na forma de média e erro padrão de pelo menos três experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* para  $p < 0,05$ ; com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação ao valor de  $IC_{20}$  estão representadas com # para  $p < 0,05$ ; com ## para  $p < 0,01$  e com ### para  $p < 0,001$ . As diferenças

estatisticamente significativas em relação ao valor  $IC_{50}$  estão assinaladas com  $^{\$}$  para  $p < 0,05$ ; com  $^{\$\$}$  para  $p < 0,01$  e com  $^{\$\$\$}$  para  $p < 0,001$ . ..... - 69 -

**Figura 15** - Características morfológicas das células HeLa, após 48 horas de incubação com o valor de  $IC_{20}$ , de  $IC_{50}$  e de  $IC_{80}$  de docetaxel. As imagens foram conseguidas através de esfregaços corados com May-Grünwald Giemsa. A imagem (A) representa células controlo não tratadas, a imagem (B) células tratadas com o valor de  $IC_{20}$ , a imagem (C) células tratadas com o valor de  $IC_{50}$  e a imagem (D) células tratadas com o valor de  $IC_{80}$ . As imagens representadas estão com uma ampliação de 400x..... - 71 -

**Figura 16** - Viabilidade e tipos de morte celular induzidos na linha celular HeLa 48 horas após a irradiação. Os resultados foram conseguidos por citometria de fluxo por dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Os resultados estão expressos em percentagem (%) de células viáveis (V), de células em apoptose inicial (AI), de células em apoptose tardia/necrose (AT/N) e de células em necrose (N). Os resultados são representados na forma de média e erro padrão de pelo menos três experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* para  $p < 0,05$ ; com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação à dose de 2Gy estão representadas com # para  $p < 0,05$ ; com ## para  $p < 0,01$  e com ### para  $p < 0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação à dose de 3Gy estão assinaladas com  $^{\$}$  para  $p < 0,05$ ; com  $^{\$\$}$  para  $p < 0,01$  e com  $^{\$\$\$}$  para  $p < 0,001$ . ..... - 72 -

**Figura 17** - Características morfológicas das células HeLa, 48 horas após irradiação. Imagens obtidas através de esfregaços corados com May-Grünwald Giemsa. A imagem (A) representa células controlo sem irradiação, a imagem (B) células irradiadas com a dose de 2Gy, a imagem (C) células irradiadas com a dose de 3Gy e a imagem (D) células irradiadas com a dose de 10Gy. As imagens representadas estão com uma ampliação de 400x. .... - 73 -

**Figura 18** - Ciclo celular das células HeLa após exposição à cisplatina durante 48 horas. Os resultados estão expressos na forma de percentagem (%) de células no pico apoptótico (Pré-G0/G1), na fase G0/G1, na fase S e na fase G2/M. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes, em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* para  $p < 0,05$ ; com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação ao  $IC_{20}$  estão representadas com # para  $p < 0,05$ ; com ## para  $p < 0,01$  e com ### para

$p < 0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação ao  $IC_{50}$  estão assinaladas com  $^{\$}$  para  $p < 0,05$ ; com  $^{\$\$}$  para  $p < 0,01$  e com  $^{\$\$\$}$  para  $p < 0,001$ ..... - 75 -

**Figura 19** - Ciclo celular das células HeLa após exposição ao docetaxel durante 48 horas. Os resultados estão expressos na forma de percentagem (%) de células no pico apoptótico (Pré-G0/G1), na fase G0/G1, na fase S e na fase G2/M. Os resultados representam a média e o erro adião de pelo menos três experiências independentes, em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com  $*$  para  $p < 0,05$ ; com  $**$  para  $p < 0,01$  e com  $***$  para  $p < 0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação ao  $IC_{20}$  estão representadas com  $^{\#}$  para  $p < 0,05$ ; com  $^{\#\#}$  para  $p < 0,01$  e com  $^{\#\#\#}$  para  $p < 0,001$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação ao  $IC_{50}$  estão assinaladas com  $^{\$}$  para  $p < 0,05$ ; com  $^{\$\$}$  para  $p < 0,01$  e com  $^{\$\$\$}$  para  $p < 0,001$ ..... - 76 -

**Figura 20** – Produção intracelular de peróxidos (A), produção intracelular de anião superóxido (B) e níveis de glutatona reduzida (C) nas células HeLa após exposição à cisplatina durante 48 horas. Esta avaliação foi realizada através da marcação com a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA, DHE e alaranjado de mercúrio, respetivamente, por citometria de fluxo. Os resultados estão representados em MIF e normalizados ao controlo. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com  $*$  para  $p < 0,05$ ; com  $**$  para  $p < 0,01$  e com  $***$  para  $p < 0,001$ ..... - 77 -

**Figura 21** – Cua de concentração-resposta das células HeLa após tratamento com concentrações crescentes de cisplatina sem inibidor (linha vermelha) e de cisplatina com 40mM de manitol (linha verde) durante 48 horas. Os resultados exprimem a proliferação celular, em percentagem, em função do logaritmo da concentração de fármaco, apresentados na forma de média e erro padrão, obtidos em pelo menos três experiências independentes em triplicado..... - 78 -

**Figura 22** - Produção intracelular de peróxidos (A), produção intracelular de anião superóxido (B) e níveis de glutatona reduzida (C) nas células HeLa após exposição ao docetaxel durante 48 horas. Esta avaliação foi realizada através da marcação com a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA, DHE e alaranjado de mercúrio, respetivamente, por citometria de fluxo. Os resultados estão representados em MIF e normalizados ao controlo. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios independentes em

duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \* para  $p < 0,05$ ; com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ . ..... - 79 -

**Figura 23** – Cova de concentração-resposta das células HeLa após tratamento com concentrações crescentes de docetaxel sem inibidor (linha vermelha) e de docetaxel com 40mM de manitol (linha verde) durante 48 horas. Os resultados exprimem a percentagem de proliferação celular em função do logaritmo da concentração de fármaco, apresentados na forma de média e erro padrão, obtidos em pelo menos três experiências independentes em triplicado. .... - 81 -

**Figura 24** - Produção intracelular de peróxidos (A), produção intracelular de anião superóxido (B) e níveis de glutatona reduzida (C) nas células HeLa, 48 horas após exposição à radiação ionizante. Esta avaliação foi realizada através da marcação com a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA, DHE e alaranjado de mercúrio, respetivamente, por citometria de fluxo. Os resultados estão representados em MIF e normalizados ao controlo. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \* para  $p < 0,05$ ; com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ . ..... - 82 -

**Figura 25** – Ação dos mecanismos antioxidantes face à formação de espécies reativas de oxigénio. (Retirado de (Gill, Piskounova e Morrison, 2016)). ..... - 96 -

## Índice de Tabelas

<b>Tabela I</b> – Estadiamento do cancro do colo do útero segundo as normas FIGO de 2009. ... -	28 -
<b>Tabela II</b> - Doses administradas nas amostras na caixa de irradiação, sendo que a dose é completa por acumulação e deposição faseada (MU – Monitor units). .... -	51 -
<b>Tabela III</b> - Número de células semeadas após irradiação de acordo com a dose. .... -	52 -
<b>Tabela IV</b> - Representação da marcação por Anexina V e iodeto de propídeo de acordo com a viabilidade celular. .... -	54 -
<b>Tabela V</b> - Valores de $IC_{20}$ , de $IC_{50}$ e de $IC_{80}$ obtidos após incubação das células HeLa com cisplatina e docetaxel durante 24, 48 e 72 horas. .... -	64 -
<b>Tabela VI</b> – Valores dos parâmetros do modelo linear-quadrático e da dose letal média obtidos. .... -	66 -
<b>Tabela VII</b> - Valores de $IC_{20}$ , de $IC_{50}$ e de $IC_{80}$ obtidos após incubação das células HeLa com cisplatina sem inibidor e com inibidor manitol, durante 48 horas. .... -	79 -
<b>Tabela VIII</b> - Valores de $IC_{20}$ , de $IC_{50}$ e de $IC_{80}$ obtidos após incubação das células HeLa com docetaxel sem inibidor e com inibidor manitol, durante 48 horas. .... -	81 -
<b>Tabela IX</b> - Viabilidade e tipos de morte celular após 48 horas de incubação com o valor de $IC_{20}$ , $IC_{50}$ e $IC_{80}$ de cisplatina. .... -	135 -
<b>Tabela X</b> – Viabilidade e tipos de morte celular após 48 horas de incubação com o valor de $IC_{20}$ , $IC_{50}$ e $IC_{80}$ de docetaxel. .... -	135 -
<b>Tabela XI</b> - Viabilidade e tipos de morte celular, 48 horas após irradiação. .... -	135 -
<b>Tabela XII</b> – Caracterização do ciclo celular das células HeLa após 48 horas expostas à cisplatina. .... -	136 -
<b>Tabela XIII</b> - Caracterização do ciclo celular das células HeLa após 48 horas expostas à docetaxel. .... -	136 -

## **Anexos**



**Tabela IX** - Viabilidade e tipos de morte celular após 48 horas de incubação com o valor de IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub> e IC<sub>80</sub> de cisplatina.

	<b>Viáveis</b>	<b>Apoptose Inicial</b>	<b>Apoptose Tardia/ Necrose</b>	<b>Necrose</b>
	<b>Média±EP</b>	<b>Média±EP</b>	<b>Média±EP</b>	<b>Média±EP</b>
Controlo	91,63±1,25	2,38±0,42	1,50±0,22	3,25±0,56
IC <sub>20</sub>	70,25±0,70	15,63±0,56	4,75±0,41	10,25±0,80
IC <sub>50</sub>	59,13±2,32	19,50±0,68	7,25±0,62	12,13±0,40
IC <sub>80</sub>	37,38±2,19	22,25±1,62	10,13±1,11	28,25±1,77

**Tabela X** – Viabilidade e tipos de morte celular após 48 horas de incubação com o valor de IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub> e IC<sub>80</sub> de docetaxel.

	<b>Viáveis</b>	<b>Apoptose Inicial</b>	<b>Apoptose Tardia/ Necrose</b>	<b>Necrose</b>
	<b>Média±EP</b>	<b>Média±EP</b>	<b>Média±EP</b>	<b>Média±EP</b>
Controlo	85,80±0,89	4,90±1,05	1,40±0,16	7,90±0,59
IC <sub>20</sub>	75,60±1,10	12,10±1,52	2,40±0,16	9,90±1,21
IC <sub>50</sub>	62,40±1,45	14,10±2,04	5,80±0,59	17,70±1,79
IC <sub>80</sub>	44,80±1,87	18,10±2,25	11,20±1,66	25,90±2,42

**Tabela XI** - Viabilidade e tipos de morte celular, 48 horas após irradiação.

	<b>Viáveis</b>	<b>Apoptose Inicial</b>	<b>Apoptose Tardia/ Necrose</b>	<b>Necrose</b>
--	----------------	-------------------------	-------------------------------------	----------------



<b>Dose</b>	<b>Média±EP</b>	<b>Média±EP</b>	<b>Média±EP</b>	<b>Média±EP</b>
Controlo	90,25±0,83	2,31±0,37	2,06±0,34	5,69±0,85
2Gy	88,88±0,72	3,50±0,38	2,00±0,50	5,63±0,53
3Gy	82,60±1,96	5,70±0,86	3,50±0,65	8,50±1,54
10Gy	74,60±1,88	8,88±1,99	3,30±0,65	13,10±1,35

**Tabela XII** – Caracterização do ciclo celular das células HeLa após 48 horas expostas à cisplatina.

	<b>Pré-G0/G1</b>	<b>G0/G1</b>	<b>S</b>	<b>G2/M</b>
	Média±EP	Média±EP	Média±EP	Média±EP
Controlo	0,63±0,18	66,88±1,01	21,50±0,65	11,63±0,84
IC <sub>20</sub>	8,88±4,23	7,13±1,51	33,00±2,51	59,88±3,96
IC <sub>50</sub>	8,63±3,17	9,00±1,31	55,88±4,90	35,38±5,14
IC <sub>80</sub>	7,63±2,82	24,63±3,57	63,50±4,66	11,88±1,26

**Tabela XIII** - Caracterização do ciclo celular das células HeLa após 48 horas expostas à docetaxel.

	<b>Pré-G0/G1</b>	<b>G0/G1</b>	<b>S</b>	<b>G2/M</b>
	Média±EP	Média±EP	Média±EP	Média±EP
Controlo	0,90±0,18	66,40±0,98	20,80±0,63	12,80±0,44
IC <sub>20</sub>	7,80±1,33	60,70±0,88	25,60±0,97	13,70±0,42
IC <sub>50</sub>	20,40±1,44	25,20±3,26	40,40±2,44	34,40±5,05
IC <sub>80</sub>	17,70±1,67	10,30±0,52	29,90±2,29	59,80±2,45



