

Fernando José Figueiredo Agostinho D'Abreu Mendes

**CARATERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR
DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO EM NEOPLASIAS**
Estudo experimental em linfoma e carcinoma
do pulmão de pequenas células

Tese de Doutoramento do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Tecnologias da Saúde,
orientada pelo Professor Doutor Manuel Santos Rosa, pela Professora Doutora Maria Filomena Botelho e
pela Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Fevereiro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Fernando José Figueiredo Agostinho D'Abreu Mendes

**CARATERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR
DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO EM NEOPLASIAS**
Estudo experimental em linfoma e carcinoma
do pulmão de pequenas células

Fevereiro 2016



Capa:

Pintura em acrílico s/tela inspirada numa imagem linha celular humana de cancro do pulmão de pequenas células (H69) após irradiação com 15 Gy de radiação X, pela pintora Conceição Mendes, tia e madrinha do autor da tese, pintada especificamente para este trabalho.

Tese de Doutoramento do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Tecnologias da Saúde, orientada pelo Professor Doutor Manuel Santos Rosa, pela Professora Doutora Maria Filomena Botelho e pela Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, financiada pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e pela Delta Cafés.



A Faculdade de Medicina não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta dissertação (Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Artigo 108, parágrafo único).

O trabalho experimental descrito nesta tese foi desenvolvido no Instituto de Biofísica, no Laboratório de Oncobiologia e Hematologia da Unidade de Biologia Molecular Aplicada e Clínica Universitária de Hematologia e no Instituto de Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, com a colaboração do Serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

“Always look on the bright side of life”

Monty Python

Aos meus Pais e Irmã

À minha mulher

Ao meu filho Pedro

A todos os meus mestres

Aos meus Amigos

Aos meus Colegas

Aos meus Familiares e Amigos que não se encontram entre nós

PREFÁCIO

O cancro do pulmão constitui, há várias décadas, o tipo de cancro mais comum e a causa mais frequente de morte por cancro em todo o mundo. Este cancro caracteriza-se por proliferação rápida, metastização e recidivas frequentes. Atualmente, as terapêuticas disponíveis para o cancro do pulmão englobam a cirurgia, as terapêuticas sistémicas, como a quimioterapia e algumas terapias dirigidas, e a radioterapia; no entanto, a sobrevivência dos doentes ainda se revela modesta.

O linfoma difuso de grandes células B é a forma mais comum de linfoma não-Hodgkin em todo o mundo ocidental. Trata-se de um linfoma clinicamente agressivo, em que, apesar da boa resposta inicial à terapêutica com quimioterapia e com radioterapia, as recidivas são frequentes. O estabelecimento da terapia combinada com o anticorpo monoclonal e a quimioterapia convencional permitiu um avanço na qualidade de vida e na sobrevivência.

Contudo, assim como no cancro do pulmão a radioterapia continua a integrar os regimes de tratamento do linfoma difuso de grandes células B. Usámos estes tipos de cancro como exemplos representativos de tumores sólidos e hematopoiéticos, respetivamente.

A radiação ionizante é utilizada para o tratamento do cancro acerca de um século, sendo as células tumorais descritas como mais radiosensíveis que o tecido normal. No entanto, apesar das lesões induzidas pela radiação ionizante ser em estudados há vários anos, o foco principal foi nos seus efeitos diretos em alvos específicos, nomeadamente nos ácidos nucleicos. Mais recentemente a investigação dos efeitos indiretos da radiação surge como uma área bastante dinâmica. Como resultado destes efeitos, a resposta celular culmina na morte das células irradiadas e na libertação de moléculas sinalizadoras pelas mesmas.

Associadamente, o conseqüente desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio e a capacidade antioxidante da célula resulta em stresse oxidativo e lesão de macromoléculas, com desregulação da sinalização celular, da proliferação e da sobrevivência. Esta resposta contribui ainda para a produção de

citocinas e recrutamento de células do sistema imunitário. A eliminação das células tumorais pode ser mediada pelo sistema imunitário; neste contexto, a radiação ionizante contribui para a produção de diferentes moléculas essenciais para uma resposta imune com reflexo periférico.

Este projeto surgiu com o principal propósito de caracterizar e avaliar a importância de marcadores celulares e moleculares envolvidos nos efeitos da radiação em linhas celulares de cancro do pulmão e de linfoma difuso de grandes células B. Paralelamente pretendeu-se contribuir para a caracterização do reflexo periférico da radioterapia no sistema imunitário de doentes com estas neoplasias. Esta abordagem, no futuro, poderá contribuir para combinar novas estratégias terapêuticas com melhoria da resposta à radioterapia e, conseqüentemente, da sobrevivência.

Este projeto envolveu investigação básica e em patologia humana e foi conduzido com o pensamento constante na possível translação clínica e congregou diversas técnicas que contaram com a colaboração de centros detentores de especialização que permitiram alargar a análise em diversas vertentes.

O trabalho experimental de investigação que conduziu a esta tese resulta do empenho de uma equipa multidisciplinar, com contributos fundamentais que não podem deixar de ser destacados. Por essa razão muitas foram as pessoas que, das mais variadas formas inspiraram, colaboraram, apoiaram, ensinaram e contribuíram direta e indiretamente para este trabalho. Assim gostaria de expressar os meus sinceros e especiais agradecimentos a algumas delas.

Ao Professor Doutor Manuel Santos Rosa, Diretor do Instituto de Imunologia, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, devo a orientação desta Tese, o apoio, e agradeço a dedicação que mostrou na realização deste trabalho, pelo empenho e incentivo na concretização dos objetivos propostos no que concerne à imunologia e cancro, bem como o estudo imunológico do mesmo, assim como as palavras amigas de incentivo, clarividência e compreensão.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Diretora do Instituto de Biofísica, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, devo a orientação desta Tese, o apoio, o incentivo na procura de colaborações, a disponibilidade, a dedicação e o empenho diários. Agradeço pelas críticas e pelos conselhos na revisão do manuscrito e, em especial, pelo apoio

incondicional, pela partilha de conhecimento e de experiência científica, pelos ensinamentos, pela amizade, pela confiança e pelo exemplo sólido de rigor, exigência e conhecimento. Obrigado, por ter acreditado em mim e por tudo o que fez por mim.

À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço a partilha de conhecimento na área do cancro e da biologia celular e molecular pois, sem a sua análise crítica e rigor, parte deste trabalho não seria possível. Agradeço pela constante disponibilidade, pela sua amizade e paciência numa temática tão complexa.

À Professora Doutora Catarina Resende de Oliveira, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço pela tutoria durante todo o Programa de Doutoramento, disponibilidade e compreensão.

À Professora Doutora Ana Margarida Coelho Abrantes, Professora Auxiliar de Biofísica, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço pela contribuição inestimável, disponibilidade e empenho que colocou neste trabalho. Agradeço a partilha de conhecimentos pois, mesmo em assuntos tão áridos, a sua facilidade de comunicação fez com que a transmissão fosse simplificada. Pela sua enorme amizade, frontalidade que tão bem a caracteriza, franqueza, estima, apoio e acima de tudo por ser minha Amiga em todos os momentos de forma única e memorável.

À Mestre Ana Cristina Gonçalves, por neste caminhado ter sido uma ajuda constante, quer ao nível científico quer ao nível pessoal, pelo incentivo e amizade, pela forma única de nos comunicarmos e trabalhar, pela amizade, por tudo.

Ao Dr. Paulo Santos, pela inflexibilidade, pela retidão, pelo exemplo, pela transmissão dos seus conhecimentos e disponibilidade de tempo, pelos conselhos amigos, daqueles que só os amigos podem dar, e acima de tudo pela amizade, Paulo obrigado!

À Doutora Mafalda Laranjo, pelo seu apoio, incentivo e disponibilidade permanentes, por partilhar responsabilidades profissionais, mesmo quando isso implicou um acréscimo de trabalho, sem nunca esmorecer o sorriso, nem deixar esmorecer a força que lá existe.

Ao Serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra particularmente à Dra. Paula Soares, à Dra. Margarida Borrego, à Dra. Ana Cleto, ao

Dr. Miguel Jacobetty, à Dra. Inês Nobre Góis, ao Dr. Pedro Fernandes e ao Eng^o. Paulo César Simões que participaram na seleção dos doentes incluídos no estudo de patologia humana e na irradiação das linhas celulares.

À Doutora Ana Brito e à Doutora Sara Ferreira pelo seu apoio, incentivo, disponibilidade permanente bem como a partilha das vossas alegrias.

Às Mestres Rita Silva, Salomé Pires, Ana Catarina Mamede, Cátia Domingues, Maria João Carvalho e Susann Schugk a minha gratidão por todo o empenho, dedicação e profissionalismo com que sempre reiteraram a sua ajuda ao longo dos últimos meses nas várias vertentes deste projeto.

Aos Mestres Tiago Sales, Ricardo Teixo, João Encarnação, Telmo Gonçalves pela sua colaboração inestimável na investigação experimental e amizade.

À Professora Doutora Clara Rocha e ao Mestre João Casalta Lopes, pela amizade e total disponibilidade para realização dos cálculos, análise estatística e crítica dos resultados.

A todos os alunos de doutoramento do Instituto de Biofísica, a todos os alunos de mestrado e licenciatura, que ao longo destes anos têm passado pelo instituto, exemplos de alegria e descontração no trabalho, que de alguma forma contribuíram para a concretização desta obra, muito em especial à Mónica Curado e Jéssica Estrela.

Pelo financiamento atribuído ao projeto que conduziu a esta Tese, agradeço à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e à Delta Cafés.

À Vera Alves, do Instituto de Imunologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, devo o apoio laboratorial, e agradeço a dedicação que mostrou na realização deste trabalho.

À Cláudia Caridade, secretária do Instituto de Biofísica, por todo o apoio e incentivo e disponibilidade incondicional que em tanto ultrapassou a sua obrigação.

Aos colegas do Programa Doutoral, alguns já doutorados mas para sempre aqueles amigos, com os quais vivenciei momentos únicos, formando um grupo excecional, uma rede de apoio e amizades para a vida, Andreia Figueiredo, Filipa Cardoso, Isabel Ramalho, Siri Paulo, Teresa Neves, Graciano Paulo, Joaquim Pereira e Rui Cruz.

Aos colegas da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, do Sindicato dos Técnicos Superiores de Saúde das Áreas de Diagnóstico e Terapêutica, da

European Association for Professions in Biomedical Science, da *International Federation of Biomedical Laboratory Science*, alunos ou simplesmente todos os que de alguma forma contatei ou entraram em contato comigo durante esta caminhada, obrigado por me ajudarem a ser mais forte, resiliente e pelo apoio.

Aos meus amigos do Hospital Distrital da Figueira da Foz e aos meus amigos pessoais pela paciência e incentivo e sobretudo pela vossa amizade que tornou a realização deste projeto mais fácil.

Aos meus colegas e amigos que durante esta caminhada sempre acreditaram em mim e me apoiaram em momentos de quase desespero e me deram a força e energia necessárias para continuar. Que me perdoem se me esqueci de mencionar alguns, mas à Carla Mainsel, ao Fernando Pais de Sousa e ao meu afilhado Martim Pais de Sousa, o meu profundo agradecimento.

Aos meus excepcionais e únicos pais, à minha estupenda irmã Carla, aos meus sobrinhos Margarida, Frederico e Francisco, aos meus tios: São e Jorge, Magui e Raul, João e Tozé, Alexandra e Zé, primos e primas, às minhas cunhadas, cunhados e avó Bé.

Uma atenção especial à minha avó Graça, grande apoio e desde que me lembro, fonte de amor e mimo. À Gracinha, minha prima, pelo amor incondicional que fez nascer dentro de mim por ela!

À minha mulher Lena pelo apoio incondicional, pela dedicação, pelo estímulo e pela sensatez com que sempre me ajudou, por todo amor em 25 anos de vida conjunta. Apesar dos momentos em que fomos privados um do outro, o companheirismo e o encorajamento foram constantes, constituindo papel fundamental para a concretização deste projeto, assim como em todos os outros da minha vida, sem ti não conseguiria, és inigualável.

Ao meu filho Pedro, pela sua sensatez e silêncios, pelo seu apoio, palavras, ações, por ter sido ele sempre um exemplo para mim, aluno brilhante e excepcional, pelo seu amor, pela sua constante alegria, felicidade e pensamento positivo, pelo seu humor único, por ser como é... tudo isto é para ti.

ÍNDICE

PREFÁCIO	XV
ÍNDICE	21
RESUMO	25
ABSTRACT	29
PARTE I - ESTADO DE ARTE.....	33
CAPITULO 1 – RADIOTERAPIA.....	35
RADIOTERAPIA NO TRATAMENTO DO CANCRO	37
TIPOS DE RADIAÇÃO IONIZANTE E SEUS EFEITOS	37
UNIDADES E GRANDEZAS DA RADIAÇÃO.....	40
BASES FÍSICAS E BIOLÓGICAS DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO	43
INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA	43
TIPOS DE RADIOTERAPIA.....	45
FRACIONAMENTO	46
<i>Hiperfracionamento e hipofracionamento em radioterapia.....</i>	<i>49</i>
RADIOBIOLOGIA ASSOCIADA À RADIOTERAPIA	53
<i>Radiação ionizante e ciclo celular.....</i>	<i>57</i>
<i>Radiação ionizante e morte celular.....</i>	<i>63</i>
<i>Radiação ionizante e stresse oxidativo.....</i>	<i>68</i>
CAPÍTULO 2 - CANCRO.....	75
CANCRO DO PULMÃO.....	80
DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	81
CARATERIZAÇÃO E TIPOS	84
<i>Cancro do pulmão de não pequenas células</i>	<i>84</i>
<i>Cancro do pulmão de pequenas células</i>	<i>85</i>
TRATAMENTO DO CANCRO DE PULMÃO	87
<i>Cirurgia no cancro do pulmão.....</i>	<i>89</i>
<i>Quimioterapia no cancro do pulmão.....</i>	<i>89</i>
<i>Tratamento dirigido no cancro do pulmão.....</i>	<i>92</i>
<i>Radioterapia no tratamento do cancro do pulmão.....</i>	<i>98</i>
LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B	105
DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	105

FATORES PROGNÓSTICOS CLÍNICOS	105
CARACTERIZAÇÃO E TIPOS	108
ORIGEM CELULAR DO LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B	108
<i>Linfoma difuso de grandes células B subtipo centro germinativo de células B</i>	109
<i>Linfoma difuso de grandes células B subtipo células B ativadas</i>	111
TRATAMENTO DO LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B.....	112
<i>Doença em estágio avançado</i>	114
RADIOTERAPIA NO LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B.....	115
<i>Campos de radiação</i>	118
<i>PET no linfoma difuso de grandes células B</i>	119
RESPOSTA AO TRATAMENTO NO LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B.....	122
CAPÍTULO 3 - SISTEMA IMUNOLÓGICO E RADIOTERAPIA.....	123
SISTEMA IMUNOLÓGICO E CANCRO	126
SISTEMA IMUNOLÓGICO E A RADIOTERAPIA	135
CAPÍTULO 4 – OBJETIVOS.....	139
PARTE II – ESTUDO EXPERIMENTAL	143
CAPÍTULO 5 – ESTUDO EM LINHAS CELULARES.....	145
MATERIAL E MÉTODOS.....	147
CULTURAS CELULARES.....	147
RADIAÇÃO IONIZANTE	149
ENSAIO CLONOGÉNICO	152
VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR	154
<i>Ensaio do azul de tripano</i>	155
<i>Ensaio do Alamar Blue®</i>	156
MICROSCOPIA ÓTICA E MORFOLOGIA CELULAR.....	157
CITOMETRIA DE FLUXO	157
<i>Tipos de morte celular</i>	158
<i>Expressão de moléculas pró e anti-apoptóticas</i>	159
<i>Potencial de membrana mitocondrial</i>	160
<i>Stresse oxidativo - peróxidos, anião superóxido e glutatona reduzida</i>	161
<i>Ciclo celular</i>	163
GENOTOXICIDADE.....	163
EXPRESSÃO DA P53 E DE P53 FOSFORILADA.....	166
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	169
RESULTADOS.....	170
DISCUSSÃO	227

CONCLUSÕES	247
CAPITULO 6 – ESTUDO EM PATOLOGIA HUMANA.....	249
MATERIAL E MÉTODOS.....	251
DURAÇÃO DO ESTUDO E POPULAÇÃO EM ESTUDO	251
CONSENTIMENTO INFORMADO E APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA	251
COLHEITA DE AMOSTRA BIOLÓGICA.....	252
CONTAGEM DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNITÁRIO COM RECURSO AO LEUCOGRAMA.....	252
ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNITÁRIO COM RECURSO À CITOMETRIA DE FLUXO...	253
ESTUDO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO NOS DOENTES COM CANCRO DO PULMÃO E LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B.....	253
<i>Caraterização e quantificação das diferentes populações de células T reguladoras.....</i>	<i>254</i>
QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS E QUIMIOCINAS NOS DOENTES COM CANCRO DO PULMÃO E LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B.....	255
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	258
RESULTADOS.....	258
DISCUSSÃO	287
CONCLUSÕES	303
PARTE III – DISCUSSÃO CONCLUSIVA.....	307
PERSPETIVAS FUTURAS	312
PARTE IV - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	315
PARTE V – SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E EXPRESSÕES.....	357
PARTE VI – PUBLICAÇÕES RELACIONADAS COM A TESE.....	369
PARTE VII - ANEXOS.....	447
ANEXO 1.....	449
ANEXO 2.....	457
ANEXO 3.....	465
ANEXO 4.....	469

RESUMO

A radioterapia é uma das modalidades de tratamento mais comumente utilizada para o tratamento do cancro, tanto de tumores sólidos como de tumores com origem hematopoiética. O cancro do pulmão é um tumor sólido, com uma das taxas de incidência e de mortalidade mais elevadas em todo mundo. O linfoma difuso de grandes células B é um tumor hematopoiético e o tipo mais comum de linfoma não Hodgkin.

Este trabalho teve como um dos objetivos determinar e caracterizar os efeitos intracelulares da radioterapia em linhas celulares de cancro do pulmão de pequenas células (H69) e de não pequenas células (A549 e H1299) e de linfoma difuso de grandes células B (Farage). Para este propósito, foram determinados os efeitos da radiação ionizante na viabilidade, na proliferação, na sobrevivência e nos mecanismos de morte celular. Realizaram-se os ensaios do azul tripano, do Alamar Blue®, clonogénico, estudos de citometria de fluxo, através da dupla marcação com anexina V e com iodeto de propídeo, da marcação das proteínas BAX e BCL-2, das alterações no potencial de membrana mitocondrial e estudos de morfologia celular com a coloração May-Grünwald Giemsa. Para além disto, foram também avaliados, por citometria de fluxo, os efeitos da radiação ionizante no stresse oxidativo, no que respeita à produção intracelular de peróxidos, de radical superóxido e da defesa anti-oxidante glutatona reduzida. As lesões no DNA foram determinadas pelo ensaio cometa, e a expressão da proteína P53 total e fosforilada foi avaliada por western blot.

Paralelamente constituiu outro objetivo deste trabalho a avaliação dos efeitos da radioterapia no sistema imunitário de doentes com cancro do pulmão e com linfoma difuso de grandes células B. Para a concretização deste objetivo foram incluídos neste estudo 8 doentes de cancro do pulmão e 9 doentes de linfoma difuso de grandes células B. Após a colheita de sangue periférico foram determinadas as contagens leucocitárias pela realização de um leucograma, as contagens linfocitárias e das células T reguladoras com recurso a Lymphogram® e imunofenotipagem, respetivamente. Foram ainda avaliadas trinta e quatro citocinas e quimiocinas,

relevantes na resposta do sistema imunitário, através do kit comercial ProcartaPlex™ Immunoassay Magnetic Beads.

A radiação ionizante induziu diminuição da proliferação, da viabilidade e da sobrevivência celular em todas as linhas celulares. No entanto, a sobrevivência ajustou-se a modelos de agressão celular distintos. Enquanto as linhas celulares H1299 e Farage apresentaram uma resposta correspondente que se ajustou ao modelo linear quadrático, as linhas celulares H69 e A549 apresentaram uma resposta correspondente ao modelo de um só alvo um só toque portanto, ao modelo linear.

Após exposição à radiação ionizante, o tipo de morte celular preferencial foi dependente da dose e, presumivelmente, do perfil de expressão de P53. Assim a expressão P53^{Wild}, das células Farage e A549, foi associada a morte celular por apoptose, enquanto a ausência de expressão, verificada nas células H1299, e a produção de uma proteína mutada, descrita nas H69, foi associada a morte celular por necrose, particularmente com as doses mais elevadas. Além disso, nas linhas celulares Farage e A549 os níveis de expressão da proteína P53 com a irradiação tanto no que respeita à proteína total como à forma fosforilada aumentam. De forma complementar verificou-se que a despolarização de membrana mitocondrial e o aumento da razão BAX/BCL-2 indicam que a morte celular por apoptose, típica das células P53^{Wild}, parece ser ativada pela via intrínseca. Relativamente ao ciclo celular verificou-se bloqueio nas fases G₀/G₁ e na fase S nas linhas celulares Farage e A549 enquanto as linhas celulares H1299 e H69 progrediram nas referidas fases mas ficaram comprometidas mais tardiamente na fase G₂/M. Estes dados reforçam a importância do perfil molecular na resposta à radiação ionizante. Finalmente, o stresse oxidativo e as lesões no DNA destacaram-se como processos de grande importância associados aos efeitos da radiação ionizante.

Paralelamente, o estudo de patologia humana realizado no âmbito desta Tese revelou que a resposta do sistema imunitário ao tratamento por radioterapia foi dependente do tipo de cancro em estudo. A avaliação do leucograma dos doentes com cancro do pulmão evidenciou alterações nos leucócitos, linfócitos e monócitos a meio do tratamento com radioterapia. No entanto, não se observaram diferenças significativas no leucograma dos doentes com linfoma difuso de grandes células B. Do mesmo modo, nos doentes com cancro do pulmão observaram-se alterações no

linfograma no que respeita às células B, às células *Natural Killer* e às células *Natural Killer* citotóxicas. Por outro lado, nos doentes com linfoma difuso de grandes células B verificaram-se alterações a nível das células T reguladoras induzidas.

Relativamente às citocinas e às quimiocinas associadas ao perfil Th1 destacou-se o aumento da concentração de interferão γ nos doentes com linfoma difuso de grandes células B. Os doentes com cancro do pulmão apresentaram um perfil Th1 mais acentuado do que os doentes com linfoma difuso de grandes células B, o que se concluiu pelos níveis superiores de IL-2, de INF- γ e de IL-1 β . Paralelamente, o perfil Th2 caracterizou-se pela maior concentração de IL-5, no sangue periférico dos doentes com linfoma difuso de grandes células B. Finalmente, destacou-se o aumento da concentração de IL-27 e de IL-7 nos doentes com cancro do pulmão.

Com este trabalho foi possível concluir que a resposta à radioterapia é dependente das características celulares e moleculares das células tumorais em estudo. O melhor conhecimento e compreensão das características moleculares do tumor e dos mecanismos de resposta ao tratamento constituem uma mais-valia na decisão terapêutica e na avaliação do prognóstico. Para além disto, o microambiente tumoral, bem como a atuação do sistema imunitário sobre células tumorais no contexto da radioterapia, podem condicionar a resposta à terapêutica e a sobrevivência a longo termo.

Palavras Chave: Radioterapia, Radiação ionizante, Cancro do pulmão, Linfoma difuso de grandes células B, Stresse Oxidativo, Ciclo celular, Morte celular, P53, Sistema imune

ABSTRACT

Radiotherapy is one of the most common modalities used for treating both solid tumors and hematopoietic origin tumors. Lung cancer is a solid tumor, with one of the higher incidence and mortality rates worldwide. Diffuse large B-cell lymphoma is a hematopoietic tumor being the most common type of lymphoma non-Hodgkin.

One of the aims of this work was to determine and characterize the intracellular effects of radiotherapy in cell lines of small cell lung cancer (H69), non-small cell lung cancer (A549 and H1299) and diffuse large B cell lymphoma (Farage). For this purpose, we determined the effects of ionizing radiation on viability, proliferation, survival and cell death mechanisms. For this, trypan blue assay, Alamar Blue[®] assay, clonogenic studies, flow cytometry studies, using the double staining with Annexin V and propidium iodide, labelling BAX and BCL-2 proteins, alteration of mitochondrial membrane potential, and cell morphology studies, with May Grünwald-Giemsa staining, were performed. Furthermore, we also evaluated by flow cytometry, the effects of ionizing radiation in the oxidative stress regarding production of intracellular peroxides, superoxide radicals and of the anti-oxidant defense glutathione. The DNA damage was determined by the comet assay, and the expression of phosphorylated and total P53 protein was assessed by Western blot.

Alongside, another aim of this study was to evaluate the effects of radiation on the immune system of patients with lung cancer and with diffuse large B cell lymphoma. To achieve this goal eight lung cancer patients and nine diffuse large B cell lymphoma patients were included in this study. After collecting peripheral blood, leukocyte counts were determined as well as the lymphocyte counts and the regulatory T cells using the Lymphogram[®] and immunophenotyping, respectively. We also evaluated thirty four cytokines and chemokines relevant to the response of the immune system through the commercial kit ProcartaPlex[™] Immunoassay Magnetic Beads.

Ionizing radiation induced a decrease in proliferation, viability and cell survival in all cell lines. However, survival was adjusted to different cellular injury models. While H1299 and Farage cell lines had a response that corresponds to the linear

quadratic model, H69 and A549 cell lines showed a response set to the model of one touch one target, i.e. the linear model.

After exposure to ionizing radiation, the preferred type of cell death observed was dose dependent and, presumably, P53 profile expression dependent. Thus, expression of P53^{Wild} in Farage and A549 cells was associated with cell death by apoptosis while no P53 expression observed in H1299 cells, and production of a mutated protein, described for H69, was associated with cell death by necrosis, particularly at higher doses. In addition, the A549 and Farage cell lines the level of P53 protein and of phosphorilated P53 protein augmented. Complementarily, the depolarization of the mitochondrial membrane potential and the increase in BAX/BCL-2 ratio indicates that cell death by apoptosis, typical of P53^{Wild} cells, seem to be activated by the intrinsic pathway. For the cell cycle a blockage in G₀/G₁ and S phase was observed in A549 and in Farage cell lines while H69 and H1299 cell lines progressed in these phases but were compromised later in G₂/M phase. These findings underscore the importance of the molecular profile in response to ionizing radiation. Finally, the oxidative stress and DNA damage stood out as very important processes in the effects of ionizing radiation.

Parallely, the study of human pathology performed within this Thesis revealed that the immune system response to radiotherapy was dependent on cancer type. The assessment of leucocyte count of lung cancer patients showed changes in leukocytes, lymphocytes and monocytes during treatment with radiation. However, no significant differences in leucocytes were found in diffuse large B cell lymphoma patients. Similarly, in lung cancer patients changes were observed in lymphogram with respect to B cells, Natural Killer cells and cytotoxic Natural Killer cells. Furthermore in patients with diffuse large B cell lymphoma there were changes in the induced regulatory T cells.

Regarding cytokines and chemokines associated with Th1 profile, we observed an increase in interferon- γ concentration in diffuse large B cell lymphoma patients. Lung cancer patients showed a stronger Th1 profile than patients with diffuse large B cell lymphoma, which is confirmed by the higher levels of IL-2, INF- γ and IL-1 β . In parallel, the Th2 profile was characterized by the highest concentration of IL-5 in the peripheral blood of diffuse large B cell lymphoma. Finally, there was an increase in IL-27 concentration and in IL-7 in lung cancer patients.

We can concluded that the response to radiation is dependent on the cellular and molecular characteristics of the tumor cells under study. Better knowledge and understanding of the molecular characteristics of the tumor and mechanisms of response to treatment is an asset concerning the therapeutic decision and prognosis evaluation. In addition, tumor microenvironment, as well as the activity of the immune system on tumor cells in the context of radiotherapy, may contribute to better therapeutic outcome and survival in the long term.

Keywords: Radiotherapy; Ionizing radiation, Lung cancer; Large diffuse B cell Lymphoma, Oxidative stress; Cell cycle; Cell death; P53, Immune system

PARTE I – ESTADO DE ARTE

CAPITULO 1 – RADIOTERAPIA

Radioterapia no tratamento do cancro

A radioterapia é uma ferramenta essencial no tratamento do cancro. A descoberta dos raios-X por Roentgen disponibilizou à medicina uma ferramenta que se tornou essencial. Porém, para além do seu potencial diagnóstico, cedo se percebeu que a utilização desta radiação determinava o aparecimento de efeitos biológicos. Com a evolução dos conhecimentos sobre este ou outros tipos de radiação ionizante, a sua utilização como ferramenta terapêutica rapidamente foi equacionada, o que se traduziu no aparecimento de uma nova especialidade médica, a radioterapia. A radioterapia tem evoluído na compreensão do seu funcionamento, na justificação para o seu uso como tratamento do cancro e na forma da sua utilização. Durante a história natural do cancro, aproximadamente 50% dos doentes precisarão de radioterapia, oscilando esta percentagem em função do tipo de tumor, do estágio e do perfil populacional (Isa, 2014).

Tipos de radiação ionizante e seus efeitos

A radiação ionizante apresenta-se como diferentes tipos, ou seja, sob a forma de partículas ou de radiação eletromagnética. Das partículas, podemos referir as partículas alfa, as partículas beta, os prótons ou os neutrões, enquanto da radiação eletromagnética os raios gama e os raios-X. Cada tipo de radiação ionizante apresenta um poder ionizante e um poder de penetração característico (Andreo *et al*, 2011; Lima, 2014).

A radiação gama foi descoberta nos finais do século XIX, por Henri Becquerel e é de origem nuclear. A radiação gama é constituída por fótons de alta energia emitidos por um núcleo instável, após a emissão de partículas alfa ou beta. A radiação gama é capaz de provocar a ionização de átomos ou de moléculas quando interage com eletrões orbitais. Este tipo de radiação é extremamente penetrante, podendo percorrer longas distâncias através do ar, dos tecidos ou de outros materiais. Para além deste tipo de interação com os eletrões orbitais, os raios gama podem interagir com o núcleo. Uma outra possibilidade é que ao atravessar um

objeto, pode não ocorrer interação, ou seja, não há cedência de energia (Webb, 1998; Janjan et al, 2006; Podgorsak & Hendee, 2006; Rosenberg, 2008; Shimm, 2008; Khan & Stathakis, 2010; Andreo et al, 2011; Bortfeld & Jeraj, 2011; Baggarley & Lu, 2013; Perez et al, 2013; Lima, 2014).

As partículas alfa, descobertas por Ernest Rutherford, são constituídas por dois prótons e dois nêutrons, sendo idênticos ao núcleo de um átomo de hélio. Uma partícula alfa produz iões numa área muito bem localizada, perdendo energia cada vez que a partícula produz um ião. Estas partículas apresentam um curto alcance no ar (1-2 cm), e a sua blindagem pode ser efetuada por objetos com pequena espessura, tais como uma folha de papel. Contudo, materiais emissores alfa quando inalados ou ingeridos poderão expor os tecidos internos diretamente, provocando lesões biológicas (Andreo et al, 2011; Lima, 2014).

As partículas beta descobertas por Becquerel apresentam muito menor massa do que as partículas alfa e maior capacidade de penetração. Estas partículas podem apresentar carga negativa ou positiva. As partículas beta negativas são idênticas aos eletrões orbitais, e têm origem no núcleo de um átomo após decaimento radioativo, por transformação de um nêutron num próton. Por outro lado, partículas beta positivas são emitidas por decaimento radioativo de um átomo com transformação de um próton num nêutron. Quando a energia das partículas beta é consumida, a partícula negativa une-se a um átomo ou molécula tornando-se num eletrão periférico, enquanto se for a partícula beta positiva, colide com um eletrão do meio e as duas partículas aniquilam-se mutuamente, produzindo dois fótons de aniquilação (Andreo et al, 2011; Lima, 2014).

Nos finais do século XIX, Roentgen, detetou um novo tipo de radiação invisível, com poder de penetração, capaz de atravessar materiais opacos à luz e distinto das radiações já conhecidas, denominando-a de radiação-X ou raios-X. Os raios-X, que demonstraram pertencer ao grupo das radiações ionizantes eletromagnéticas, apresentam-se sob a forma de fótons de alta energia, que podem ter duas origens. Assim, podem resultar do rearranjo dos eletrões periféricos após ionização devido a interação de eletrões com os eletrões orbitais de átomos, constituindo os raios-X característicos, ou podem resultar de interação de eletrões com o núcleo constituindo a radiação de frenagem ou radiação de bremsstrahlung. Os raios-X, sendo radiação

eletromagnética, têm um poder de penetração semelhante à radiação gama. As características físicas dos raios-X permitiram a sua aplicação na radiografia médica e industrial, na radioterapia e em investigação (Andreo et al, 2011; Lima, 2014).

Durante o século XX, a utilização da radiação ionizante com efeito terapêutico em oncologia teve um forte desenvolvimento tendo por base as aplicações experimentais da radiação-X, culminando a sua utilização em modalidades complexas de tratamento (Webb, 1998; Bernier et al, 2004; Janjan et al, 2006; Podgorsak & Hendee, 2006; Rosenberg, 2008; Shimm, 2008; Khan & Stathakis, 2010; Bortfeld & Jeraj, 2011; Baggarley & Lu, 2013; Perez et al, 2013; Lima, 2014).

Nos primórdios da radioterapia, esta apresentava como principal objetivo incrementar as técnicas de irradiação, no entanto, devido aos contínuos desenvolvimentos técnicos e científicos, o paradigma mudou. De facto, atualmente, o principal objetivo prende-se com a exploração da genética e do microambiente do tumor, de forma a tornar mais eficiente o tratamento do cancro. (Bernier et al, 2004; Bortfeld & Jeraj, 2011).

As aplicações iniciais em oncologia da radiação ionizante, exploraram diversas modalidades de depositar a energia para obter efeito terapêutico. Utilizaram-se desde doses únicas até pequenas doses, tendo sempre como objetivo eliminar as células tumorais e, simultaneamente, evitar a lesão dos tecidos normais envolventes. Atualmente, a evolução dos equipamentos foi tal que as deposições das doses de radiação nos tumores se tornaram muito precisas. Esta evolução tornou crucial o conhecimento da radiobiologia e da biologia molecular e da genética tumoral, de modo a determinar os alvos terapêuticos mais relevantes, potenciando a citotoxicidade no tumor e conservando o tecido normal adjacente (Bernier et al, 2004).

Um dos aspetos fundamentais no uso da radioterapia como abordagem terapêutica no cancro é o planeamento do tratamento. Correntemente, a radioterapia é considerada uma forma eficaz de tratamento do cancro, sendo utilizada não só em diferentes tipos de cancro como em diferentes estádios daquela patologia. Como a radioterapia não é seletiva, obriga a uma prévia delimitação do volume a irradiar, de modo a depositar o máximo de energia no tumor, com minimização dos efeitos nos tecidos saudáveis contíguos (Bernier et al, 2004).

As células oncológicas caracterizam-se por um rápido e descontrolado crescimento. Tendo por base a leis de Bergonier e Tribodeau as células com aquelas características são mais radiosensíveis que as células normais. Porém, estas células não deixam de sofrer os efeitos das radiações, os quais estão na base da emergência de efeitos secundários. Perante tal situação, é essencial a existência de um equilíbrio entre a dose de radiação que permite a eliminação das células malignas e a simultânea minimização dos efeitos sobre as células normais envolventes (Formenti & Demaria, 2009; Balogh *et al*, 2013).

Dos efeitos secundários descritos na literatura que estão associados à radioterapia devemos salientar a toxicidade da pele, a astenia, a diarreia e a dor torácica, tendo sempre em atenção que a radioterapia é um tratamento localregional, dependendo os efeitos secundários do local e dos órgãos irradiados. A existência destes efeitos secundários são o resultado de terem sido lesados órgãos ou sistemas específicos, associado à variada radiosensibilidade dos diversos tecidos envolvidos. A importância destes efeitos secundários emerge, por serem estes que determinam a dose máxima a administrar ao doente, pelo que são denominados de efeitos secundários limitantes, enquanto os órgãos e sistemas não alvo afetados são denominados por órgãos em risco (Webb, 1998; Neville, 2005; Janjan *et al*, 2006; Podgorsak & Hendee, 2006; Rosenberg, 2008; Shimm, 2008; Khan & Stathakis, 2010; Bortfeld & Jeraj, 2011; Baggarley & Lu, 2013; Perez *et al*, 2013; Lima, 2014).

A medula óssea é um exemplo de um órgão em risco no tratamento do cancro do pulmão, determinando a redução dos valores periféricos de eritrócitos, de leucócitos e de plaquetas. Como efeitos limitantes podemos referir a esofagite e a pneumonite rádica. Outro exemplo de efeitos secundários da radiação é mielite rádica após irradiação da medula espinhal (Neville, 2005; Formenti & Demaria, 2009).

Unidades e grandezas da radiação

É importante caracterizar a radiação no que respeita à sua quantidade e qualidade e, desta forma, definir as unidades e as grandezas da radiação.

A dose exposição (X) é uma grandeza que exprime a carga elétrica (dQ) produzida pela radiação eletromagnética, por unidade de massa (dm) de ar, em condições de pressão e temperaturas normais (Lima, 2014), tal como expresso na Equação 1. A unidade do Sistema Internacional (SI) para a dose exposição é Coulomb/kg.

$$X = \frac{dQ}{dm} \quad \text{Equação 1}$$

A unidade exposição é definida apenas para o ar, de forma que não pode ser utilizada para descrever a dose no tecido. Assim, esta medida não apresenta utilidade clínica significativa, uma vez que não leva em consideração fatores tais como a área irradiada, o poder ionizante da radiação, o poder de penetração da radiação e a sensibilidade à radiação do órgão irradiado. Esta dificuldade levou à definição de outra unidade chamada dose absorvida (D). Define-se como a energia (dE) cedida por unidade de massa (dm) de material irradiado, para qualquer radiação ionizante e para qualquer material irradiado, tal como descrito na Equação 2. A unidade do SI para a dose absorvida é o Gray (Gy). Geralmente é considerada como a melhor maneira de quantificar a absorção de radiação ionizante (Lima, 2014).

$$D = \frac{dE}{dm} \quad \text{Equação 2}$$

Outra importante unidade é a dose equivalente (H_T) que corresponde à soma das doses absorvidas num órgão ou tecido, multiplicadas pelos fatores de ponderação dos diferentes tipos de radiação e das diferentes radiosensibilidades dos tecidos ou órgãos. A unidade do SI da dose equivalente é o Sievert (Sv) e resulta do produto da dose adsorvida por um determinado tecido ou órgão com um fator de ponderação que considera o tipo de radiação (W_R), designado frequentemente por fator de qualidade (Equação 3).

$$H_T = \sum_R W_R \cdot D_{T,R} \quad \text{Equação 3}$$

Este fator de qualidade varia com o órgão ou o tecido e com o tipo de radiação e é designado por eficiência biológica relativa (RBE, do inglês Relative Biological Effectiveness). Esta RBE ao corrigir a dose absorvida para o tipo de radiação, permite comparar o efeito biológico de diferentes tipos de radiações. A dose equivalente é, por isso, utilizada na proteção contra as radiações ionizantes e consequentes efeitos de exposição ocupacional já que é independente do tipo de radiação.

A RBE de cada tipo de radiação varia significativamente, pois depende da transferência linear de energia (LET, do inglês Linear Energy Transfer) que consiste na quantidade média de energia que um determinado tipo de radiação transmite ao meio, por unidade de comprimento de percurso. Exprime-se em keV/μm, uma vez que em radioterapia se consideram baixas energias e baixas distâncias. Por exemplo, os raios-X apresentam um valor de LET de cerca de 0,3 keV/μm, sendo considerada uma radiação de baixo LET, enquanto as partículas α apresentam um valor de LET de cerca de 100 keV/μm, pelo que são consideradas partículas de LET elevada. Encontra-se descrito que com o aumento da LET se observa uma maior taxa de morte celular por unidade de dose absorvida (Gy). Por este facto, lesões devidas a radiações com LET elevada são menos prováveis de serem corretamente reparados por deposição da energia num menor comprimento (Joiner & Kogel, 2009).

Quanto à dose efetiva (E), Equação 4, consiste na dose absorvida duplamente ponderada para órgãos ou tecidos. É utilizada de forma a estimar o risco da radiação nos seres humanos.

A dose é definida como a soma dos produtos das doses equivalentes para cada órgão ou tecido com o fator de ponderação tecidular (W_T), sendo a unidade do SI o Sv.

$$E = \sum_T W_T \cdot H_T \quad \text{Equação 4}$$

Uma outra unidade por vezes mencionada é a dose coletiva a qual é definida como a dose recebida por pessoa em Sv multiplicado pelo número de pessoas expostas. Esta medida é usada geralmente para fins de proteção radiológica (Andreo et al, 2011; Lima, 2014).

Bases físicas e biológicas dos efeitos da radiação

A utilização da radiação ionizante como terapia revela-se uma das abordagens terapêuticas mais importantes no tratamento do cancro, que pode ser utilizada em tumores em diferentes estádios evolutivos, tanto na modalidade neoadjuvante, como adjuvante ou mesmo como terapêutica paliativa. Apesar de o objetivo ser sempre o de depositar uma dose de radiação elevada em todo o volume tumoral, de forma a induzir morte celular na neoplasia, devemos ter sempre em conta as lesões nos tecidos normais envolventes, as quais devem ser minimizadas (Rosti et al. 2006; Jackman and Johnson 2005).

Atualmente com os novos aceleradores, a irradiação ocorre principalmente com recurso a fótons de alta energia, os raios-X, apesar de outro tipo de radiações ionizantes serem utilizadas, em especial os eletrões, os prótons ou mesmo átomos ionizados. Quando um objeto está sob um campo de radiação ionizante, a exposição à mesma determina que alguma dessa radiação interaja, ou seja, deposite energia. A interação de um feixe de radiação com a matéria resulta sempre na atenuação do feixe, por cedência de energia ao meio. Esta cedência de energia irá causar, numa primeira fase, ionização de átomos ou de moléculas do meio onde a radiação foi aplicada e, eventualmente, excitação dos eletrões, os quais mudam de orbital, numa reação em cascata (Webb, 1998; Rosenberg, 2008; Baggarley & Lu, 2013; Lima, 2014).

Interação da radiação com a matéria

A interação da radiação com a matéria ocorre quando há transferência de energia, podendo provocar ionização e/ou excitação dos átomos e/ou moléculas e, conseqüentemente, alterações nas mesmas. A ionização resultante induz reatividade química nas moléculas irradiadas que poderão causar lesões biológicas. Um exemplo deste tipo de lesão é a que resulta da interação da radiação com o ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês deoxyribonucleic acid), podendo originar quebras numa única cadeia da dupla hélice do DNA (SSD, do inglês single strand breaks) ou quebras nas duas cadeias da dupla hélice do DNA (DSB, do inglês double

strand breaks). As alterações moleculares ocorridas vão, mais tarde ou mais cedo, repercutir-se nas células. Contudo, as células vivas apresentam diferentes sensibilidades à radiação, que se correlacionam com a sua taxa de divisão celular. As células com elevada taxa de proliferação são as mais sensíveis à radiação ionizante e são encontradas em tecidos com elevada atividade mitótica, também denominados de tecidos de resposta rápida. De igual forma, as células que apresentam menor radiosensibilidade têm, por norma, maior grau de diferenciação celular. Voltando ao exemplo anterior, quando uma lesão no DNA resulta na quebra da molécula, a célula pode ter dificuldade em progredir no ciclo celular, podendo até morrer, mais ou menos imediatamente. Assim, quanto menor a diferenciação celular maior a probabilidade de indução de lesão por ação das radiações ionizantes (Andreo et al, 2011; Lima, 2014).

Considerando-se a irradiação de tecidos com radiação ionizante, existem diversas possibilidades de interação, resultando em lesões moleculares diversas. Essas lesões desenvolvem-se em fases distintas: a física a físico-química, a química e a biológica (Khan & Stathakis, 2010; Lima, 2014).

A fase física traduz a cedência de energia ao eletrão com o qual ocorre a interação. Esta fase é extremamente rápida, com durações de 10^{-13} a 10^{-15} segundos. Após este processo de transferência energética, ou seja após a interação, os eletrões dos átomos do tecido envolvido são ejetados com geração de iões (ionização). É a fase físico-química do processo de lesão molecular. Por sua vez, os eletrões ejetados poderão agir como partículas ionizantes secundárias e provocar mais ionizações e/ou excitações de outros átomos ou moléculas vizinhas, resultando numa cascata de ionização e/ou excitação. Após esta fase, com a formação de moléculas ionizadas, quimicamente reativas, iniciam-se sequências de reatividade químicas com produção de espécies radicalares responsáveis pela fase química. A fase biológica, que pode durar dezenas de anos, traduz a repercussão no organismo irradiado, na dependência da via metabólica afetada por esta interação (Khan & Stathakis, 2010; Lima, 2014).

Após esta sequência de lesões moleculares, se a célula não conseguir reparar a ou as lesões, há repercussão celular com aparecimento do efeito biológico (Held, 2010; Stewart, 2012).

Uma característica dos efeitos da radiação é que a lesão pode ser só percebida algum tempo após a exposição à radiação. Este período de tempo denomina-se tempo de latência. Não é pois de estranhar que os efeitos começam algum tempo após o fim da exposição à radiação e são comuns às células saudáveis e às células oncogénicas (Dörr, 2009; Held, 2010; Khan & Stathakis, 2010; Lima, 2014).

Considerando que existem várias populações celulares em simultâneo, quando se fala de efeitos biológicos da radiação, teremos de considerar as diferentes radiosensibilidades dessas populações. Alguns exemplos de lesões causadas por exposição à radiação são as lesões da mucosa intestinal ou das células hematopoiéticas (Dörr, 2009; Held, 2010).

Tipos de radioterapia

Podemos considerar várias formas de radioterapia como a telerradioterapia, a braquiterapia e a radioterapia metabólica (Aichinger et al, 2012; Howington et al, 2013b).

A telerradioterapia caracteriza-se por ser uma técnica que recorre a uma fonte externa, tais como um acelerador linear ou uma fonte radioativa. No acelerador linear um feixe de eletrões é acelerado de modo a aumentar a sua energia até MeV para que após colidirem num alvo de tungsténio, originem raios-X de energia adequada para tratamento (Aichinger et al, 2012).

Na braquiterapia, o procedimento consiste na colocação de uma fonte radioativa diretamente no tumor ou na sua contiguidade, por norma sob a forma de um implante, que poderá ser um fio fino, tubos plásticos, cápsulas ou as denominadas “sementes”. Estes dispositivos contêm no seu interior a fonte radioativa adequada tendo em conta o tamanho do tumor. Assim, a braquiterapia poderá ser efetuada com implantes temporários ou permanentes. A escolha tem em consideração as características da fonte de radiação e a energia que é preciso depositar. Neste contexto, os implantes temporários estão normalmente associados a fontes radioativas com períodos de semidesintegração maiores e/ou com emissões de energias mais altas (Pazdur et al, 2009; Hawley, 2013).

A radioterapia metabólica consiste na administração de radiofármacos que têm

a particularidade de o átomo radioativo que incorporam ser emissor alfa, beta ou de electrões Auger. Esta modalidade de radioterapia pode ser incluída nas terapias dirigidas, pois o radiofármaco é específico para uma determinada via metabólica, pelo que é incorporado no metabolismo do órgão alvo (Gerber & Chan, 2008; Howington *et al*, 2013b; Perez *et al*, 2013).

Quando comparamos a radioterapia interna com a radioterapia externa concluímos que a radioterapia interna permite a deposição de doses totais de radiação mais elevadas do que a radioterapia externa (Gazda & Coia, 1941; Pazdur *et al*, 2009; Hawley, 2013).

Fracionamento

No tratamento do cancro com recurso à radiação ionizante, todas as células, quer sejam neoplásicas quer sejam células normais, desde que se encontrem dentro do volume irradiado, são mais ou menos expostas. Contudo, se tivermos em conta a radiobiologia é espectável que as células normais apresentem uma maior capacidade de reparação. Na modalidade de telerradioterapia, a mais usada em clínica, a dose de radiação total administrada é, geralmente, fracionada sendo designada por radioterapia fracionada. Este fracionamento determina doses individuais reduzidas e em intervalos de tempo alargados, geralmente cinco sessões por semana, durante seis a sete semanas, até perfazer a dose terapêutica (Aichinger *et al*, 2012; Howington *et al*, 2013b).

Quando comparamos a radioterapia de dose única com a radioterapia fracionada, apesar dos benefícios no que diz respeito à recorrência e à taxa de sobrevivência parecerem ser melhores na primeira, a radiotoxicidade nos tecidos normais envolventes limita a sua utilização generalizada. Deste modo, é imprescindível um equilíbrio entre estes dois fatores, de forma a atingir a taxa terapêutica ideal. Um dos principais fatores a ter em conta na dose de radiação a depositar está associado à tolerância do tecido normal. Neste contexto, a radioterapia fracionada permite salvaguardar os tecidos normais e maximizar o efeito no cancro (Saunders *et al*, 1997; Neville, 2005).

O facto de a radiação ser administrada de forma fracionada, em doses pequenas,

poderá contribuir para reduzir a morbidade, dependente dos efeitos tardios sobre as células normais. Apesar de ser um procedimento por norma indolor, poderá apresentar efeitos secundários eventualmente limitantes, que podem afetar os sistemas hematopoiético, gastrointestinal ou neurológico, dependentes da região irradiada (Gudkov & Komarova, 2010).

Depois da irradiação, as células são redistribuídas em diferentes fases do ciclo celular, na tentativa de reparar as lesões induzidas. Para além desta dependência do ciclo celular, a resposta biológica à exposição da radiação ionizante é altamente influenciada pela presença do oxigénio (Vansteenkiste *et al*, 2013).

Os tumores sólidos são frequentemente hipóxicos, o que contribui para uma redução da sensibilidade à radiação. Não obstante, se a radiação for administrada em frações, as células tumorais poderão ter tempo para se reoxigenar entre as sessões de tratamento, aumentando assim a sensibilidade à radioterapia das células tumorais residuais (Parente Lamelas *et al*, 2012; Vansteenkiste *et al*, 2013).

Quando os tumores são irradiados com uma única dose de radiação, a maioria das células radiosensíveis normóxicas morrerão. Por outro lado, as células sobreviventes são na sua grande maioria hipóxicas e, dessa forma, a fração de células hipóxicas será aproximadamente de 100% (Joiner & Kogel, 2009). Esta fração irá diminuir após o tratamento e aproximar-se-á dos valores iniciais. Este fenómeno é designado por reoxigenação e refere-se às alterações no estado de hipoxia das células viáveis remanescentes. Este processo de reoxigenação tem sido reportado ocorrer numa grande variedade de sistemas tumorais, com velocidade variável, de apenas algumas horas até vários dias (Joiner & Kogel, 2009). Para além disso, a pressão parcial de oxigénio tecidual após a reoxigenação poderá ser variável, podendo apresentar-se inferior ou superior ao valor inicial (Joiner & Kogel, 2009). Quando o processo de reoxigenação ocorre rapidamente, poderá ser devido tando à desobstrução dos vasos sanguíneos que devido ao tratamento foram temporariamente bloqueados como à reduzida respiração celular. Quando, pelo contrário, a reoxigenação ocorre numa taxa mais lenta, poderá ser o resultado de morte celular, que possa ter causado diminuição do volume tumoral e consequente redução das distâncias intercapilares, permitindo a entrega de oxigénio às células hipóxicas. Esta reoxigenação tem, pois, implicações nos resultados finais do

tratamento com radioterapia fracionada, sendo essencial para o seu sucesso (Joiner & Kogel, 2009).

Contudo, se a reoxigenação ocorrer entre frações, a morte de células inicialmente hipóxicas induzida pela radiação será maior, pelo que as células em hipoxia terão um menor impacto na resposta ao tratamento (Joiner & Kogel, 2009). Por outro lado, alguns estudos apontam para que a presença de células num estado de reoxigenação intermédio, poderão induzir radiorresistência durante o tratamento por radioterapia fracionada, mesmo na presença de reoxigenação extensa (Joiner & Kogel, 2009). Estas células neste estado intermédio de reoxigenação acabam por não influenciar a resposta a doses únicas elevadas, o que é apenas determinado pela fração de células hipóxicas mais resistentes. Contudo, as células em estado de reoxigenação intermédio poderão contribuir, de forma significativa, na resposta às doses clinicamente relevantes e, assim, desempenhar um papel crucial na determinação do resultado terapêutico após tratamento baseado em radioterapia fracionada (Joiner & Kogel, 2009).

Estes conceitos traduzem-se, na prática clínica, naquilo que se convencionou chamar os cinco Rs da radiobiologia, nos quais se baseia a radioterapia clínica moderna, isto é, a radiorresistência intrínseca, a (re)oxigenação, a reparação, o repovoamento e a redistribuição (Hall, 2000; Suntharalingam *et al*, 2007; Joiner & Kogel, 2009; Held, 2010).

Quando passamos da célula para um sistema constituído por conjuntos de células de diversa natureza e em diversas fases do ciclo celular, a complexidade aumenta, não só do sistema em si como dos efeitos provocados pela exposição às radiações. Esta complexidade tornou necessário o desenvolvimento de modelos matemáticos que traduzam a sobrevivência celular após exposição a feixes de radiações ionizantes. Dos modelos desenvolvidos, o modelo linear quadrático (LQ) domina o campo da radiobiologia clínica (Held, 2010). Este modelo incorpora o efeito da dose-por-fração e os efeitos de repovoamento (Held, 2010). Deste modo temos duas componentes na curva de sobrevivência, uma correspondente à radiosensibilidade que se traduz pelo valor do α e outra, traduzida pelo valor de β que corresponde à capacidade de reparação celular. A relação α/β refere-se à dose de radiação, para a qual a morte celular varia com o quadrado da dose. É uma

indicação da dose em que ocorre a transição entre os dois componentes da curva de sobrevivência celular. Quanto menor for a relação α/β , maior o efeito preservador do fracionamento. Contudo, não pode deixar de ser chamada a atenção para as dificuldades no cálculo desta relação para os diversos tipos de tecidos e/ou tumores. Várias são as razões que estão na base daquela dificuldade. Neste contexto, não podemos deixar de referir que, para além da heterogeneidade tumoral, os valores de α e de β foram originalmente calculados em modelos animais pelo que têm, à partida, influência da diferente radiosensibilidade que, como se sabe, varia com a espécie (Hall, 2000; Laws, 2006; Suntharalingam et al, 2007; Joiner & Kogel, 2009; Held, 2010).

Hiperfracionamento e hipofracionamento em radioterapia

Quando nos referimos a radioterapia com intenções curativas podemos administrar as doses de radiação segundo vários esquemas terapêuticos, dos quais os principais são a radioterapia convencional, a radioterapia hipofracionada, a radioterapia hiperfracionada e a radioterapia acelerada contínua e hiperfracionada também denominada pelo acrónimo inglês CHART (Jassem, 2007).

A diferente radiosensibilidade dos tumores e dos vários tecidos normais envolventes, é explorada de forma a obter ganho terapêutico. Esta diferente radiosensibilidade (α) traduz, na prática, diferentes capacidades de reparação (β) das lesões induzidas pela radiação ionizante. Neste contexto, os tecidos normais que respondem tardiamente apresentam valores baixos de α/β , enquanto os tecidos normais que respondem mais rapidamente, assim como a maioria dos tumores, apresentam um valor de α/β elevado. A razão α/β permite, pois, classificar a maneira como os tecidos respondem à exposição a radiação ionizante. Assim, tecidos de resposta rápida apresentam α/β na ordem dos 10 Gy enquanto os tecidos de resposta tardia têm α/β inferiores e na ordem dos 3 Gy. De acordo com este tipo de respostas é possível reduzir não só a dose de cada fração (por exemplo de 2 Gy para 1,5 Gy) como aumentar o número de frações (Laws, 2006; Panel chair, 2015; Panel-Chair, 2015).

O aumento da dose que pode ser tolerada no que diz respeito à lesão tardia dos

tecidos normais deverá ser maior do que o necessário para manter o controlo do tumor, ou seja, o tumor deverá receber uma maior dose biológica efetiva. Para se entregarem estas doses mais elevadas e simultaneamente controlar a lesão tardia existem os diversos regimes de fracionamento das doses. Na radioterapia convencional, são administradas frações diárias de 1,8 a 2 Gy durante cerca de seis semanas e meia até perfazer a dose total de 55 a 66 Gy. Este regime pode associar quimioterapia (Demetri et al, 2010).

Outra possibilidade é aumentar o número de frações, com diminuição da dose individual e expondo o doente mais do que uma vez por dia, contudo a duração do tratamento permanece a mesma. Este tipo de protocolo de tratamento é denominado hiperfracionamento (Jassem, 2007). O principal objetivo do hiperfracionamento passa por manter, ou mesmo melhorar, as taxas de controlo tumoral e, ao mesmo tempo, reduzir os efeitos tardios. Como objetivo secundário devemos considerar a radiosensibilização devido à redistribuição, pois com o aumento do número de frações a probabilidade de serem encontradas células tumorais na fase mais radiosensível do ciclo celular é maior. Esta radiosensibilização está na base do agravamento dos efeitos iniciais quando comparado com o fracionamento convencional. É espectável um aumento na morbidade quando as múltiplas frações diárias são depositadas em campos que incluam a medula óssea, sendo que tal foi observado em doentes que receberam três frações diárias (Jassem, 2007). O aumento das reações iniciais nos tecidos normais seria espectável no hiperfracionamento das doses, uma vez que maiores valores α/β para os tecidos responsivos iniciais implicam menor quantidade de reparações, uma vez que a dose administrada em cada fração é menor quando comparada com o verificado em tecidos responsivos tardios. O aumento da dose que pode ser tolerada pode ser estimada, mas tais cálculos são limitados pela baixa fiabilidade das estimativas disponíveis de valores α/β para os tecidos ou órgãos. O racional do tratamento baseado em hiperfracionamento não considera a reoxigenação dos tecidos. Uma vez que não existe alteração no tempo total de tratamento, assume-se que a reoxigenação será semelhante à verificada num regime de fracionamento convencional. Ensaios clínicos com o objetivo de avaliar a entrega de uma maior dose por hiperfracionamento têm vindo a ser realizados. Os seus resultados têm

demonstrado um aumento no controlo local, não se verificando qualquer alteração significativa na lesão observada nos tecidos normais. Estes dados confirmam a hipótese de que o aumento da dose total por hiperfracionamento, não aumenta a probabilidade de complicações tardias. A redução do tempo total de tratamento pode também melhorar a razão terapêutica, uma vez que reduzirá o tempo necessário para que ocorra proliferação celular e consequente recuperação de células tumorais no tumor durante o tratamento. A redução do tempo de tratamento é conseguida ao administrar mais de uma fração por dia, com frações de doses padronizadas, depositadas em intervalos de 6 horas a 8 horas, de modo a não permitir reparação celular do tecido neoplásico, uma estratégia denominada por fracionamento acelerado. Acredita-se que a utilização de doses menores contribua para uma melhoria na resposta ao tratamento, uma vez que preserva o tecido normal. A título de exemplo, no cancro do pulmão poder-se-ão realizar duas sessões diárias de radioterapia com 1,2 Gy atingindo um total de 69,6 Gy em 29 dias (Jassem, 2007).

Na tentativa de melhorar o efeito terapêutico e diminuir os efeitos secundários, foi proposto uma variante ao regime de radioterapia hiperfracionada, conhecida como radioterapia acelerada contínua e hiperfracionada (CHART, do inglês *continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy*). Neste regime, o tratamento é realizado em apenas doze dias, minimizando assim a oportunidade de ocorrer proliferação das células tumorais sujeitas a radiação. Neste tipo de regime, em termos gerais, as doses são administradas em três frações diárias de 1,5 Gy cada, em doze dias consecutivos, perfazendo uma dose total de 54 Gy (Schaake-Koning, 1995; Saunders et al, 1997; Zhang et al, 2015b). A tolerância dos tecidos normais que respondem tardiamente deverá ser pouco afetada, uma vez que a proliferação celular nestes tecidos ocorre a um ritmo inferior ao observado nas células tumorais (Jassem, 2007; Joiner & Kogel, 2009).

Estudos randomizados em que se comparam as estratégias de CHART e de fracionamento convencional no tratamento de cancro do pulmão demonstraram que a recuperação do número de células tumorais entre frações é uma importante causa de ineficiência do tratamento. Um ensaio clínico para avaliação da CHART, em que eram administradas três frações por dia durante 12 dias demonstrou que, no

braço experimental, apesar da redução da dose por fração se manteve o mesmo controlo do tumor com simultânea redução na morbidade tardia (Saunders *et al*, 1999). Um segundo ensaio clínico, em que foi administrada uma dose equivalente em ambos os braços experimentais, revelou um aumento do controlo tumoral no braço referente à CHART, contudo, foi também observado um aumento da toxicidade tardia (Jassem, 2007; Inoue *et al*, 2015).

A modalidade de radioterapia hipofracionada usa-se preferencialmente em tumores com pequeno volume, que são tratados com menor número de frações mas com doses de radiação elevadas e ablativas, sendo denominada de radioterapia estereotáxica ablativa (SABR, do inglês *stereotactic ablative radiotherapy*) também conhecida como radioterapia estereotáxica corporal (SBRT, do inglês *stereotactic body radiation therapy*). Nesta modalidade podem-se depositar doses totais de 60 Gy em três ou oito sessões ou, em alternativa, 45 Gy distribuídos por três sessões. Embora atualmente existam muitas técnicas e vários tipos de equipamentos para a SBRT, a maioria dos centros de radioterapia continuar a usar aceleradores lineares acoplados a colimadores multifolha para facilitar a moldagem do campo e o volume a irradiar. O uso da radioterapia estereotáxica foi expandido para incluir não só os locais primários mas também as metástases em especial as intratorácicas, as do fígado e as na espinal medula (Kollar & Rengan, 2014).

Para alguns cancros no estágio I a SABR/SBRT é recomendada para doentes medicamente inoperáveis e/ou que recusam a cirurgia (Panel-Chair, 2015). Nos estádios iniciais da doença, a SABR/SBRT poderá ser uma opção terapêutica, mas nesta circunstância com regimes intensivos de dose biologicamente eficaz (BED, do inglês *biological effective dose*), isto é, com doses totais iguais ou superiores a 100 Gy. Esta modalidade está associada a melhor controlo local e sobrevivência do que regimes menos intensivos (Eberhard *et al*, 2005; Panel-Chair, 2015).

A radioterapia poderá ainda ser utilizada com fim paliativo estádios avançados da doença, que frequentemente associam importantes comorbilidades como a síndrome de veia cava superior, a presença de metástases cerebrais ou ósseas associadas a dores, ou qualquer metástase em doentes com mau *performance status*¹

¹ Escalas e critérios para avaliar a progressão da doença, como esta afeta o dia-a-dia do doente, contribuindo para determinar o tratamento apropriado e prognóstico.

(Stewart, 2012; Leone et al, 2013; Panel-Chair, 2015).

Radiobiologia associada à radioterapia

A exposição de qualquer célula à radiação ionizante poderá ter como resultado a indução de lesão nos diferentes organelos e nas suas membranas celulares, bem como em biomoléculas por ação direta ou indireta, que poderão conduzir a diferentes resultados conforme os tipos de tecidos e de células (Zhao et al, 2012a). Diferentes tipos de radiação diferem na maneira como interagem com o material biológico pelo que iguais doses absorvidas não produzem, necessariamente os mesmos efeitos biológicos. Assim, os efeitos biológicos resultam da interação da radiação com a matéria e são especialmente lesivos quando interagem com o material genético, ou moléculas essenciais para a sua correta replicação e manutenção. Esta interação poderá causar lesões irreversíveis ou reversíveis, de acordo com a eficiência do sistema de reparação celular (Webb, 1998; Janjan et al, 2006; Podgorsak & Hendee, 2006; Rosenberg, 2008; Shimm, 2008; Khan & Stathakis, 2010; Bortfeld & Jeraj, 2011; Baggarley & Lu, 2013; Perez et al, 2013; Lima, 2014).

Os efeitos biológicos provocados pela exposição a radiação ionizante caracterizam-se pelo polimorfismo, não especificidade, possível reversibilidade, tempo de latência, existência ou não de limiar e podem ou não ser transmissíveis. O facto de que os efeitos biológicos serem altamente dependentes do tipo de tecido ou do órgão irradiado faz com que o polimorfismo assuma uma importância elevada na sua caracterização. Por outro lado, a não especificidade demonstra que um efeito biológico provocado pela radiação pode ter outra causa. Embora certos estudos epidemiológicos e estatísticos apresentem uma relação de causa e efeito entre uma irradiação e determinadas lesões, muitas vezes essa relação não pode ser estabelecida no individual (Webb, 1998; Janjan et al, 2006; Podgorsak & Hendee, 2006; Rosenberg, 2008; Shimm, 2008; Khan & Stathakis, 2010; Bortfeld & Jeraj, 2011; Baggarley & Lu, 2013; Perez et al, 2013; Lima, 2014).

Os efeitos biológicos produzidos pela radiação podem apresentar características de reversibilidade devido aos mecanismos de reparação celular. Quando a radiação

provoca alterações funcionais, estas são transitórias, seguindo-se uma reparação que poderá ou não ser total. A nível celular, este poder de reparação poderá estar relacionado com a capacidade da célula poder ou não sintetizar novamente toda a maquinaria celular necessária à sua normal função. Contudo, alguma dessa maquinaria celular poderá ser demasiado complexa e especializada para que a célula possa ressintetizá-la e a sua lesão determinará efeitos irreversíveis (Webb, 1998; Janjan et al, 2006; Podgorsak & Hendee, 2006; Rosenberg, 2008; Shimm, 2008; Khan & Stathakis, 2010; Bortfeld & Jeraj, 2011; Baggarley & Lu, 2013; Perez et al, 2013; Lima, 2014).

A maioria dos efeitos biológicos celulares induzidos pela exposição à radiação não se transmite às células das gerações seguintes. Porém, lesões particularmente graves que afetem a função reprodutiva assim como o património hereditário poderão ser transmitidos à descendência da unidade biológica irradiada (Webb, 1998; Janjan et al, 2006; Podgorsak & Hendee, 2006; Rosenberg, 2008; Shimm, 2008; Khan & Stathakis, 2010; Bortfeld & Jeraj, 2011; Baggarley & Lu, 2013; Perez et al, 2013; Lima, 2014).

A relação entre dose de radiação e efeito biológico deverá igualmente ter em conta que existem efeitos que só ocorrem quando é ultrapassado um determinado valor de dose, abaixo do qual não há efeito. Esta dose limite denomina-se dose limiar. Contudo, doses inferiores ao limiar também são passíveis de causar lesões a nível celular, uma vez que existe sempre a possibilidade de ocorrência de ionizações e/ou excitações, com as respetivas consequências físico-químicas e biológicas. Para além disso, poderá existir um tempo de latência entre o momento da irradiação e o aparecimento das lesões, sendo esse tempo variável (Webb, 1998; Janjan et al, 2006; Podgorsak & Hendee, 2006; Rosenberg, 2008; Shimm, 2008; Khan & Stathakis, 2010; Bortfeld & Jeraj, 2011; Baggarley & Lu, 2013; Perez et al, 2013; Lima, 2014).

Os efeitos biológicos a nível celular podem ser classificados como diretos ou indiretos, na dependência da molécula alvo da interação. Os efeitos diretos podem surgir pela lesão de uma macromolécula de importância relevante dentro da célula, como é o DNA. Por sua vez, os efeitos indiretos resultam da interação se dar numa molécula que é capaz de produzir espécies quimicamente reativas. Quaisquer destas modificações celulares podem ser corrigidas através da ação de mecanismos de

reparação mais ou menos específicos. Caso a reparação não seja possível, poderá existir a indução de lesões bioquímicas que, por sua vez, podem causar lesões tais como morte celular, alteração no processo de divisão celular e, inclusive, alterações genéticas (Zhao et al, 2012a).

Quando falamos de efeitos diretos para além da molécula de DNA existem outras moléculas que desempenham função relevante na célula como proteínas e lípidos, especialmente os membranares. As lesões ocorridas nestas estruturas poderão, ou não, ser alvo de reparação, resultando na sobrevivência da célula normal ou em morte celular, mutações ou aberrações cromossômicas. As mutações podem ser pontuais, quando existe apenas substituição de nucleótidos, ou mutações mais complexas que abrangem vários genes, tais como rearranjo dos cromossomas. Estes efeitos desempenham igualmente um papel importante nos processos de oncogénese (Zhao et al., 2012).

No que diz respeito aos efeitos indiretos, a molécula intermediária mais importante é a da água, já que é a mais abundante no meio intracelular. Assim, quando a radiação interage com água, ocorre um processo chamado radiólise da água. Neste processo, um eletrão é extraído da molécula de água, o que inicia uma sequência de reações químicas que culminam na produção de radicais livres e de iões altamente reativos. Estes radicais livres e iões produzidos recombina-se e formam peróxido de hidrogénio (H_2O_2), que é responsável pela maioria das lesões induzidas pela radiação, como resultado de radiólise da água, contribuindo para a destruição celular. Entre os radicais livres produzidos, o radical hidroxilo ($HO\cdot$) é particularmente agressivo para o DNA, pois facilmente difunde até ao núcleo, sendo responsável por uma parte importante das lesões (Held, 2010; Stewart, 2012; Zhao et al, 2012a; Lima, 2014).

Uma outra classificação dos efeitos biológicos da radiação é a divisão em efeitos determinísticos e estocásticos (Lima, 2014). Os efeitos determinísticos são consequentes à exposição a altas doses de radiação e dependem diretamente da exposição à radiação pelo que existe uma correlação entre a dose de radiação absorvida e a extensão da lesão provocada provocando morte celular. As lesões provocadas pelos efeitos determinísticos estão associados a doses limiares. Tanto a probabilidade de ocorrência, bem como a severidade da lesão estão diretamente

relacionadas com o aumento da dose. Estes efeitos levam a alterações somáticas. Sempre que é ultrapassada a dose limiar verifica-se efeito, porém quando as lesões não são passíveis de ser reparadas, podem surgir efeitos com repercussão clínica, sendo que a sensibilidade à radiação ionizante varia de indivíduo para indivíduo (Lima, 2014). Pequenas reduções do número de células existentes em determinado órgão ou tecido não levam, normalmente, a alterações na sua função. Contudo, e caso a diminuição do número de células seja significativa, podem-se observar efeitos patológicos. Estes efeitos podem-se manifestar sob a forma de eritema, de leucopenia, de anemia, de hemorragia, de náuseas, de cataratas, de necrose celular e consequentes alterações fibróticas em órgãos internos e esterilidade (Lima, 2014).

Os efeitos estocásticos provocam transformação celular e podem ser somáticos ou hereditários. Como estão relacionados com exposição a baixas doses de radiação apenas se manifestam meses ou anos após a exposição, mantendo-se as lesões latentes durante largos períodos de tempo o que dificulta a associação causa-efeito. Dos efeitos estocásticos, destacam-se a mutação e a carcinogénese, ou seja, a exposição à radiação ionizante pode levar ao surgimento de uma alteração aleatória no DNA de uma única célula que mantém a sua capacidade proliferativa intacta, dando origem a outras células e, consequentemente, levar a transformação celular. Quando este tipo de lesões ocorre nas células dos gâmetas, poder-se-ão verificar efeitos hereditários na geração seguinte (Lima, 2014).

Em alguns casos, as lesões provocadas nas células podem iniciar um processo de transformação maligna, conduzindo ao desenvolvimento de um clone maligno e, consequentemente, a um cancro (L. Zhao et al., 2012). A extensão e a severidade dos efeitos estocásticos não dependem da dose absorvida, sendo principalmente baseados em modelos matemáticos de probabilidade. Desta forma, quanto maior a dose absorvida, maior será a probabilidade de ocorrência de efeitos estocásticos. Ao contrário do que se verifica quanto aos efeitos determinísticos, não existe um limiar de dose a partir do qual os efeitos estocásticos possam se verificar (Zhao et al, 2012a; Lima, 2014).

Tendo em conta todos estes efeitos, podemos dizer que a radiação ionizante gera stresse celular quer por transferência direta de energia quer indiretamente pela radiólise da água. Os efeitos fatais da radiação ionizante devem-se sobretudo à

lesão na molécula de DNA. Das lesões do DNA, as que se verificam numa única cadeia da dupla hélice são mais benignas, ao contrário do que acontece quando a lesão ocorre nas duas cadeias. Estas são as mais letais, pois a reparação pode ser impossível. A morte celular pode ainda ocorrer indiretamente, devido ao stresse oxidativo com origem na radiólise da água e do efeito oxigénio (Ward, 1990; Barcellos-hoff & Nguyen, 2010; Held, 2010).

A etapa biológica ocorre em seguida, podendo temporalmente acontecer a dias ou a anos de distância. Após a agressão, a célula poderá promover a ativação de várias vias de sinalização, as quais poderão culminar em bloqueio do ciclo celular, ativação de vias de reparação ou de indução de morte (Falck *et al.* 2001; Katz, Ito, and Liu 2009).

Radiação ionizante e ciclo celular

A divisão celular caracteriza-se por ocorrer em dois processos consecutivos: a replicação do DNA e a segregação dos cromossomas replicados em duas células filhas separadas e iguais. O ciclo celular divide-se em duas partes principais, a interfase, onde ocorrem as fases *gap* (G_1 , síntese (S) e G_2 , e a mitose (M), como se pode observar na Figura 1. A replicação do DNA ocorre na fase S, sendo por isso designada como fase de síntese. Na fase G_1 a célula prepara-se para a divisão celular, correspondendo ao maior período de crescimento celular. Nesta fase, ocorre a síntese de novos organelos, pelo que a célula necessita de proteínas e de enzimas estruturais, coincidindo com a fase de maior síntese proteica e, conseqüentemente, uma taxa metabólica elevada. A fase G_1 é constituída por quatro subfases: *early* G_1 ; *middle* G_1 e *late* G_1 e é seguida pela fase S. Na fase G_2 , a célula prepara-se para a mitose. Ainda na fase G_1 as células, antes de iniciarem a replicação do DNA, poderão entrar num estado de repouso ou quiescência, sendo esta fase denominada por G_0 (Murray, 2004).

Todo o processo de transição entre as diferentes fases do ciclo celular é altamente regulado, desenvolvendo-se sequencialmente. Os mecanismos reguladores envolvem um conjunto de proteínas celulares, as ciclinas e as cinases

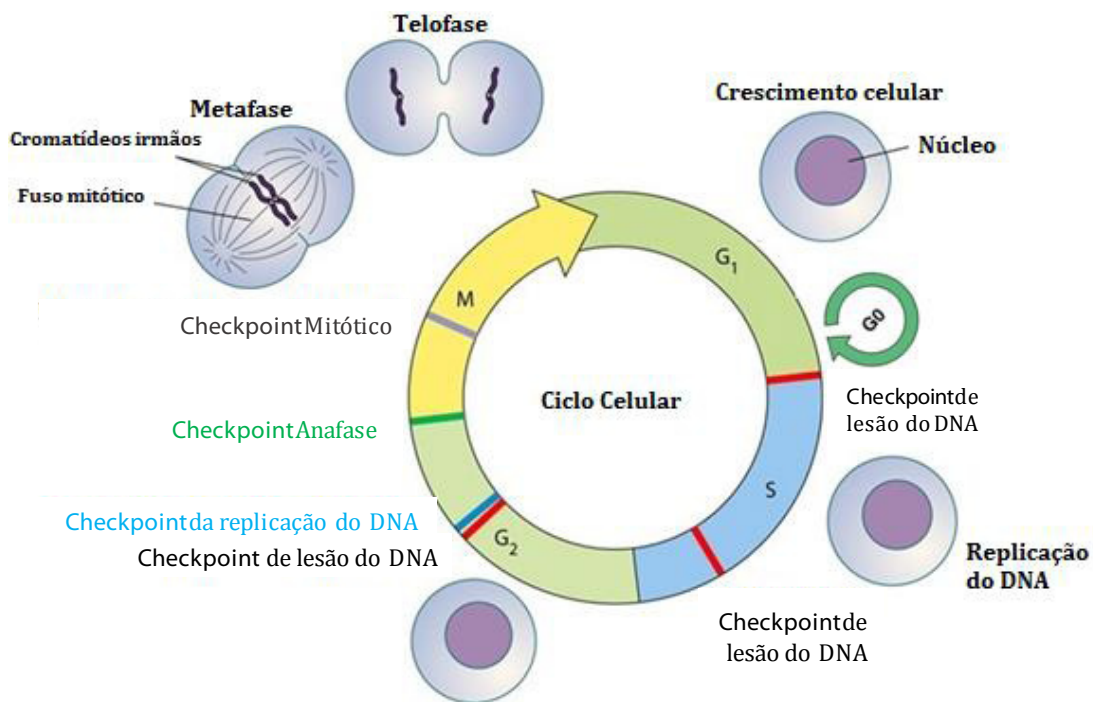


Figura 1: Ilustração do ciclo celular e dos respetivos pontos de controlo sobre o mesmo. Retirado de Chin and Yeong 2010.

ciclina-dependentes (CDK, do inglês cyclin-dependent kinases), sendo estas ativadas em momentos específicos do ciclo celular (Shackelford et al, 1999; Vermeulen et al, 2003). Por forma a garantir a sobrevivência e a reprodução de cópias fiéis do genoma, as células respondem às lesões ou a alterações no DNA, estando aqui incluídas as quebras de uma única ou das duas cadeias da dupla hélice do DNA, através de uma multiplicidade de respostas (Bartek & Lukas, 2001). Estas respostas são coordenadas entre a progressão do ciclo celular e a reparação do DNA, a remodelação da cromatina, a transcrição e outros ajustes metabólicos ou, caso a lesão seja irreparável, a indução de morte celular (Bartek & Lukas, 2001).

O bloqueio do ciclo celular, ou mesmo o seu atraso, fornecem tempo para que aconteça a reparação do DNA ou, quando a lesão se revela irreparável, inibir de forma permanente a proliferação celular através da senescência, ficando a célula na fase G₀ (Lukas et al, 2004).

Para que o bloqueio do ciclo celular ocorra, uma rede complexa de vias de sinalização é ativada, regulando os pontos de controlo, como se pode verificar na Figura 2 (Bartek & Lukas, 2001; Lukas et al, 2004; Reinhardt & Yaffe, 2013).

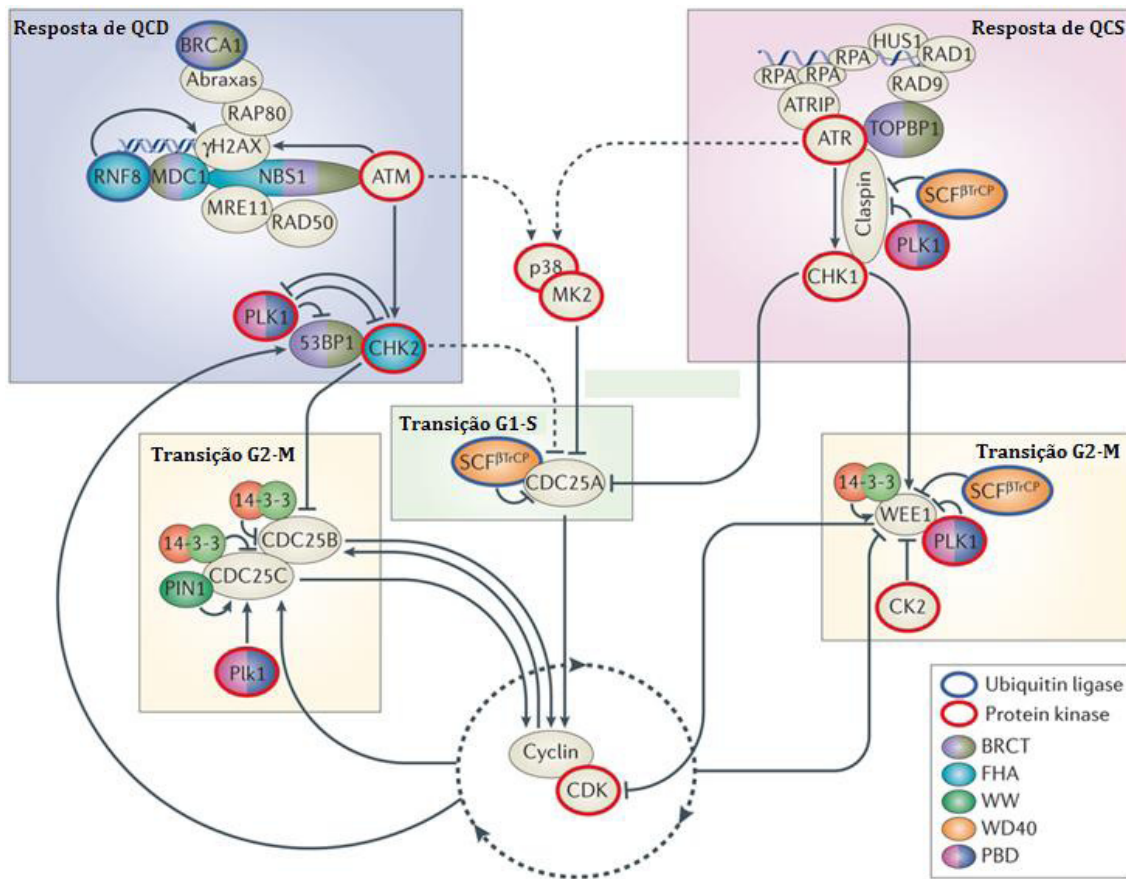


Figura 2: Pontos de controlo do ciclo celular. Representação esquemática das vias moleculares envolvidas na transmissão de sinais dos locais danificados do DNA. QCD: quebra nas duas cadeias da dupla hélice do DNA; QCS: quebra numa única cadeia da dupla hélice do DNA. Retirado de Reinhardt and Yaffe 2013.

Os pontos de controlo do ciclo celular revelam-se como pontos fulcrais que bloqueiam a sua progressão, não permitindo que progrida sem que a anterior fase se conclua (Lukas et al, 2004). A rede complexa anteriormente mencionada é constituída por cinco categorias de componentes de acordo com a sua posição e função: os sensores de lesão no DNA (complexos Rad9–Hus1–Rad1), o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, do inglês proliferating cell nuclear antigen-like e Rad17–RFC), os transdutores de sinal ataxia telangiectasia mutada (ATM, do inglês ataxia telangiectasia mutated) e ataxia telangiectasia Rad3 relacionada (ATR, do inglês ataxia telangiectasia and Rad3-related), as cinases efetoras (CHK, do inglês cell cycle checkpoint kinase) 1 e CHK2, os mediadores (BRCA1, MDC1/NFBD1, 53BP1 e claspin) e ainda as proteínas efetoras da divisão do ciclo celular (CDC, do inglês cell division cycle) 25 reguladoras do ciclo celular,

proteínas de reparação de DNA e fatores de transcrição (Zhou & Elledge, 2000; Lukas *et al*, 2004; Parrilla-Castellar *et al*, 2004; Reinhardt & Yaffe, 2013).

Como o próprio nome indica, as proteínas com função sensora do DNA monitorizam este para qualquer alteração que possa surgir, coadjuvando na geração de sinais que são posteriormente amplificados e propagados pelos mediadores e transdutores de sinal, culminando nas proteínas efetoras dos pontos de controlo, as quais são o elo de ligação entre estes e toda a estrutura central do ciclo celular (Lukas *et al*, 2004).

A resposta da célula a eventuais lesões do DNA envolve o atraso e bloqueio do ciclo celular nas transições da fase G₁ para S ou da fase G₂ para M, permitindo assim a ativação da cascata anteriormente referida de resposta à lesão. Assim, o produto final desta ativação poderá significar a sobrevivência celular, caso o DNA seja corretamente reparado ou, caso não seja reparado corretamente ou seja impossível a sua reparação, a indução de morte celular apoptótica ou mitótica. Desta forma, podemos concluir que o ciclo celular tem três principais pontos de controlo: um ponto de controlo na fase G₁, outro ponto de controlo na fase S e, finalmente, um ponto de controlo na fase G₂/M (Jorgensen, 2009; Mitchell *et al*, 2010; Deckbar *et al*, 2011; Zhao *et al*, 2012b).

A ativação das cinases de transdução ATM/ATR previnem a entrada das células na fase S, sempre que exista lesão no DNA, tendo como principais alvos dois efetores críticos, que atuam em diferentes locais do ponto de controlo G₁, sendo estes a CDC25A e o fator de transcrição da proteína P53. Assim, o bloqueio nesta fase do ciclo celular poderá ser dependente ou independente da proteína P53 (Lukas *et al*, 2004; Reinhardt & Yaffe, 2013).

A via que tem como alvo a CDC25A é independente da proteína P53, pode ser executada rápida e transitoriamente e tem capacidade de atrasar a progressão do ciclo celular durante várias horas (Molinari *et al*, 2000; Lukas *et al*, 2004). Já o mecanismo complementar responsável pela manutenção do atraso e do bloqueio prolongado da fase G₁ como resposta às lesões no DNA reflete a ativação da outra via do ponto de controlo G₁ dependente da proteína P53 (Bartek & Lukas, 2001; Wahl & Carr, 2001; Kastan & Bartek, 2004; Pawlik & Keyomarsi, 2004; Jorgensen, 2009; Mitchell *et al*, 2010; Deckbar *et al*, 2011; Zhao *et al*, 2012b).

A quantidade e a atividade da CDC25A diminuem rapidamente quando as células são expostas à radiação ionizante, refletindo então a ubiquitinação induzida pelas lesões ocorridas no DNA, e o *turnover* da proteína CDC25A pelos proteassomas. Como estes são complexos enzimáticos com actividade de protéase, este processo é independente da proteína P53 (Bartek & Lukas, 2001). Assim, o resultado da ativação desta via advém numa fosforilação inibitória persistente da CDK2, inibindo desta forma a atividade da ciclina E/CDK2, conduzindo a um bloqueio da transição da fase G₁ para a fase S (Bartek & Lukas, 2001).

A radiação ionizante tem ainda capacidade de atuar no ponto controlo da fase S, por norma representando uma inibição da iniciação da replicação após lesão no DNA (Deng, 2006). Caso ocorra uma falha na ativação deste ponto controlo, o resultado poderá ser uma síntese constante de DNA (RDS, do inglês *radioresistant DNA synthesis*) nos primeiros momentos logo após a exposição à radiação ionizante (Deng, 2006). Neste ponto de controlo poderemos verificar igualmente a existência de duas vias que correm em paralelo e que atrasam ou bloqueiam a síntese de DNA, sendo as duas controladas pelos componentes de sinalização da ATM/ATR. Um dos mecanismos efetores envolve a cascata de degradação da CDC25A. Da inibição da atividade da CDK2 surge o bloqueio da translocação de CDC45 para a cromatina. A CDC45 revela-se muito importante para o recrutamento da polimerase α do DNA para os complexos de pré-replicação. Deste modo, ao inibir a atividade da CDK2 impede a iniciação de uma nova replicação (Lukas *et al*, 2004).

Por outro lado, a outra via existente neste ponto de controlo reflete o impacto das fosforilações de uma proteína da família da nibrin (NBS, do inglês *nibrin*), a Nbs1, com funções de regulação do ciclo celular e de reparação do DNA, bem como da proteína de coesão e de manutenção estrutural dos cromossomas (SMC 1, do inglês *structural maintenance of chromosomes 1*), ambas mediadas por ATM (Kastan & Bartek, 2004). Ao contrário do que sucede no ponto de controlo G₁, a resposta às lesões induzidas no DNA na fase S do ciclo celular não apresenta manutenção sustentada da paragem do ciclo celular, tendo em comum ser igualmente independente da proteína P53 (Lukas *et al*, 2004).

O ponto de controlo G₂/M tem como função impedir a mitose na presença de lesão no DNA, sempre que esta ocorra na fase G₂, ou caso o ciclo tenha progredido e

ainda presente lesões/erros por corrigir, podendo estes ter acontecido nas fases G₁ e S (Kastan & Bartek, 2004; Lukas *et al*, 2004; Bitomsky & Hofmann, 2009; Okamoto *et al*, 2010).

O bloqueio na fase G₂ poderá ainda refletir a contribuição do ponto de controlo S/M, o qual pode verificar ainda a existência de algumas lesões no DNA persistentes, não corrigidas na fase anterior como sendo inapropriados ou uma replicação do DNA incompleta (Kastan & Bartek, 2004). Similarmente ao que acontece no ponto de controlo de G₁, o atraso e bloqueio na fase G₂ do ciclo celular é o resultado da combinação de vários mecanismos que atuam via modificações pós-translacionais de várias proteínas efetoras e ainda da ativação de mecanismos com maior duração e mais sustentados, envolvendo a alteração dos programas de transcrição (Lukas *et al*, 2004). Tal como no ponto de controlo da fase S este atraso e bloqueio pode ser induzido de forma dependente ou independente da proteína P53 (Vermeulen *et al*, 2003; Deorukhkar & Krishnan, 2010).

A ciclina B/CDK1 cinase revela-se o alvo principal deste ponto de controlo, cuja ativação após lesão do DNA é bloqueada ocorrendo a sequestração subcelular, sendo esta mediada pelas ATM/ATR e CHK1/CHK2 e pela inibição da fosfatase CDC25C. Esta última ativa a CDK1 na passagem da fase G₂ para a fase M do ciclo celular (Kastan & Bartek, 2004; Lukas *et al*, 2004; Matsuoka *et al*, 2007).

A via da proteína P53 julga-se ser um dos mecanismos que mais contribui para uma efetiva e longa inibição da ciclina B/CDK1. Esta proteína para além de ser crítica para o ponto de controlo em G₁, na inibição do P53-CDK-P21, contribui ainda para o atraso e/ou bloqueio na fase G₂ através dos seus alvos transcricionais, que incluem as proteínas GADD45 e 14-3-3 σ (Taylor & Stark, 2001; Bartek *et al*, 2004; Krämer *et al*, 2004; Lukas *et al*, 2004).

Sabe-se que células com o fenótipo P53 nulo têm tendência a atrasar e bloquear o ciclo celular na fase G₂ após lesão no DNA, indicando então que outros mecanismos adicionais, tais como a expressão da proteína P21 e GADD45 estimulada pela BRCA1, podendo assim colaborar com a cascata da proteína P53 participando no atraso nesta fase. Está já descrito na literatura que interferências no ponto de controlo G₂ poderão sensibilizar as células com défices no atraso G₁/S para lesões induzidas no DNA por radiação ou fármacos (Bartek *et al*, 2004; Krämer *et al*, 2004).

Radiação ionizante e morte celular

Em radioterapia considera-se morte celular, quando a célula perde capacidade reprodutora e não por apenas não ter sobrevivido à exposição. A morte celular poderá ocorrer devido à falência reprodutiva, caracterizada pela perda da capacidade de divisão celular, à apoptose, à autofagia, à necrose, à catástrofe mitótica ou devido a ter sido induzida pela senescência, apresentando características morfológicas e bioquímicas que as distinguem (Pawlik & Keyomarsi, 2004; Delaney *et al*, 2005; Grivicich *et al*, 2007).

As principais características morfológicas da apoptose são as alterações na morfologia nuclear, incluindo a condensação e a fragmentação da cromatina, as alterações nos organelos citoplasmáticos e a desidratação celular seguida da posterior formação de corpos apoptóticos ou *blebs*, sendo que nas fases iniciais da apoptose a membrana plasmática permanece íntegra (Grivicich *et al*, 2007). Este tipo de morte poderá ocorrer em diferentes momentos do desenvolvimento de um organismo como na organogênese e na hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos diferenciados, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após lesão celular por agentes genotóxicos, como é exemplo a radiação ionizante (Golstein & Kroemer, 2007; Grivicich *et al*, 2007; Jain *et al*, 2014).

A apoptose poderá ser iniciada por duas vias independentes que, em determinado momento, convergem para o passo crítico de ativação das caspases, sendo estas as proteases executoras de apoptose. Estas vias são a via extrínseca ou morte mediada por recetores membranares, e a via intrínseca ou morte mediada pela mitocôndria, como se pode observar na Figura 3 (Apraiz *et al*, 2011).

A via extrínseca é ativada quando os diferentes ligandos, tais como o fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*), o *TNF related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) ou o *tumor necrosis factor receptor superfamily member 6* (FAS), se ligam aos seus respetivos recetores membranares. Após esta ligação, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1 (do inglês, *fas-associated protein with death domain*, *MORT1*), *tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein* (TRADD) as quais

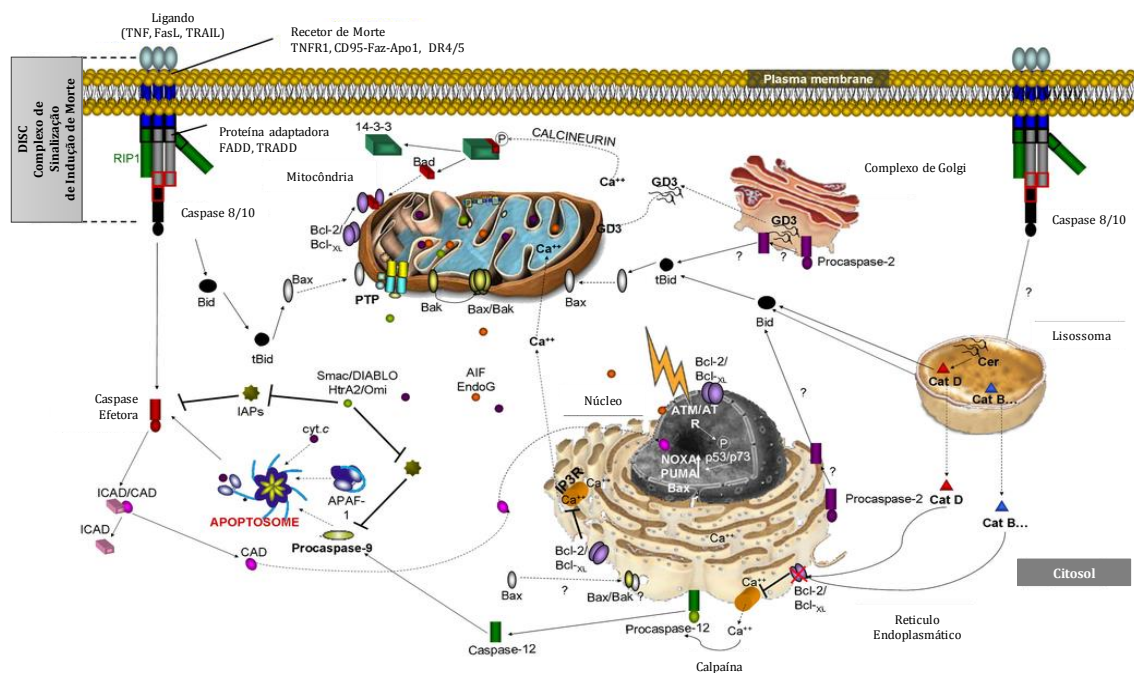


Figura 3: Visão geral das vias apoptóticas primárias. Vias de sinalização dependentes e independentes de recetores de morte, bem como conexões de sinalização entre os diferentes organelos estão representados. Os efeitos inibitórios são representados por (--) enquanto a ativação é projetada por flechas (→). As linhas de traço (---) foram utilizadas para representar o movimento e os pontos de interrogação (?) para as etapas indeterminadas. Retirado de Apraiz, Boyano, and Asumendi 2011.

recrutam a caspase-8 que, por sua vez, numa reação em cascata, ativará a caspase-3, executando a morte por apoptose (Daniel *et al*, 2001).

Na via intrínseca da apoptose, a mais importante na resposta à agressão por radiação ionizante, a mitocôndria possui um papel crucial, sendo que todo o processo se inicia com uma perda do potencial da membrana mitocondrial e posterior libertação do citocromo-c (Cyt c) para o espaço intracelular, formando um complexo com o fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1 (APAF-1, do inglês *apoptotic protease activating factor 1*) e a caspase-9, denominado de apoptossoma, que promove a clivagem da pró-caspase-9, libertando a caspase-9 e ativando-a. A cascata anteriormente descrita é altamente regulada pela família de proteínas *B-cell lymphoma 2* (BCL-2), proteínas reguladoras da apoptose que se localizam na membrana mitocondrial e no retículo endoplasmático. Após ativação da caspase-9, esta ativará a caspase-3 que, conseqüentemente, irá induzir morte celular (Rupnarain *et al*, 2004; Bitomsky & Hofmann, 2009). Desta forma, para além das caspases, as proteínas da família BCL-2 revelam-se fundamentais para este tipo de morte celular e incluem a BCL-2, exemplo de uma proteína anti-apóptica,

enquanto a *B-cell lymphoma-extra large* (BCL-XL) e a *Bcl-2-associated X protein* (BAX), que apresentam domínio transmembranar, e a *Bcl-2-associated death promoter* (BAD) são pró apoptóticas, que não apresenta domínio transmembranar, entre outros exemplos (Elmore, 2007; Verheij, 2008).

As proteínas que apresentam domínio transmembranar irão ligar-se a membranas celulares, nomeadamente da mitocôndria, enquanto as restantes se encontram no citosol. As proteínas previamente mencionadas desempenham diferentes funções na regulação da apoptose e podem distinguir-se em três grupos: o grupo anti-apoptótico como a BCL-2, o grupo pró-apoptótico como a BAX e o grupo pró-apoptótico apenas com domínios da BH3 (do inglês *BCL-2 homology3*) (Simone Reuter *et al*, 2011).

A indução da apoptose depende de uma interação entre os dois últimos grupos, resultando assim numa alteração na permeabilidade da mitocôndria, revelando-se esta fundamental para que ocorra a apoptose (Verheij, 2008).

Alguns autores propõem que as proteínas anti-apoptóticas sequestram as proteínas apenas com domínios BH3 impedindo-as assim de atuarem, formando dímeros. Caso exista um aumento da formação de dímeros bloqueadores, tais como a BCL-2 e a BCL-XL, a balança penderia para a resistência à apoptose, caso exista o predomínio de dímeros pró-apoptóticos, como a BAX ou a BAD, a balança penderia então para a apoptose (Verheij, 2008).

A ativação das vias apoptóticas encontra-se dependente da ativação de vias de transdução de sinal e, como anteriormente mencionado, da proteína P53 (Belka *et al*, 2001). Esta proteína consegue regular a expressão das proteínas da família BCL-2, inibindo a expressão de BCL-2 e potenciando a expressão de BAX (Belka *et al*, 2001).

Assim, lesões no DNA, induzidas pela radiação ionizante ativarão a proteína P53, sendo provável que a apoptose induzida pela radioterapia seja essencialmente dependente da ativação da via intrínseca da apoptose. Belka e colaboradores demonstraram ainda que a BCL-2 tem capacidade de bloquear a libertação de citocromo-C induzida pela radiação (Belka *et al*, 2001). Apesar do que foi previamente descrito, não poderemos excluir a via extrínseca, uma vez que a ativação da transcrição de genes recetores do TRAIL, através do recetor de morte

(DR, do inglês death receptor) 4 e DR5 parecem ser influenciados pela proteína P53 (Belka et al, 2001; Bartek et al, 2004; Kastan & Bartek, 2004; Lukas et al, 2004; Nome et al, 2005).

A necrose é um tipo de morte celular frequente quando a célula é exposta a um estado de stresse considerável. As principais características da necrose são o aumento de volume dos organelos, originando a ruptura da membrana plasmática e consequente libertação do conteúdo celular o que, para além de lesar as células vizinhas, inicia um processo inflamatório local. Esta inflamação poderá resultar ou num processo favorável ou desfavorável. Se o processo for favorável, desencadeia uma resposta imune anti-tumoral, recrutando células do sistema imune ao local do tumor enquanto se o processo for desfavorável, as células do sistema imune promovem inflamação com secreção de fatores de crescimento e de enzimas que contribuem para o crescimento tumoral e para a metastização. Para além do mencionado, estas células tem ainda capacidade de produzir espécies reativas de oxigénio que apresentam potencial mutagénico (Grivicich et al, 2007).

Outro tipo de morte bem conhecida é a autofagia, sendo este um processo geneticamente controlado. Neste processo os componentes celulares são incorporados em vesículas que se irão fundir com os lisossomas para posterior degradação e reutilização, atuando fundamentalmente na manutenção do desenvolvimento celular, no controlo de doenças e na resposta celular à privação de nutrientes (Danial & Korsmeyer, 2004; Lum et al, 2005). Este tipo de morte celular designava inicialmente a resposta celular à carência de nutrientes, stresse celular metabólico ou exposição a quimioterapia ou a radioterapia (Ziegler & Groscurth, 2004; Chen & Karantza-Wadsworth, 2009). A autofagia poderá, de acordo com o postulado por Chen e colaboradores, induzir morte celular, ativando a apoptose, provavelmente por ativação de reguladores comuns tais como as proteínas da família BCL-2 (Chen & Karantza-Wadsworth, 2009).

Para além dos diferentes tipos de morte previamente mencionados, um contribuidor reconhecido há muito para a morte celular após exposição a radiação ionizante é a catástrofe mitótica, ocorrendo nas células que não conseguem completar a mitose corretamente (Joiner & Kogel, 2009).

A catástrofe mitótica acontece quando as células entram em mitose de forma

inadequada, seja devido a lesões no DNA não reparadas ou mal reparadas evitando, desta forma, a sua proliferação (Castedo & Kroemer, 2004).

O termo catástrofe mitótica tem evoluído ao longo dos últimos anos para abranger o tipo de morte celular que resulta de, ou se segue, a uma mitose aberrante, estando morfológicamente associada à acumulação de células gigantes multinucleadas, que contêm cromossomas condensados, com a presença de aberrações cromossómicas e de micronúcleos (Joiner & Kogel, 2009).

A morte celular pode ser considerada uma perda de potencial replicativo, podendo ocorrer simplesmente a partir de uma incapacidade física para replicar e separar o material genético corretamente, ou perda de material genético, sendo em grande medida dependente dos tipos de aberrações cromossómicas presentes nas células irradiadas. Para além de atuar como um mecanismo de morte celular, a catástrofe mitótica poderá também servir de gatilho para outras vias de morte celular, independentemente da causa da lesão inicial induzida pela radiação. Assim, a catástrofe mitótica, que resulta na fusão celular, na poliploidia, ou na falha na execução da citocinese pode, posteriormente, induzir morte celular por apoptose, senescência, autofagia ou mesmo necrose. Neste caso, é a tentativa de entrar em mitose que conduz à ativação do programa de morte celular e não a lesão de DNA inicial, presente antes da mitose (Chu *et al*, 2004). Esta distinção revela-se importante pois a morte celular foi induzida pela catástrofe mitótica, em vez de uma resposta celular direta a uma lesão inicial no DNA (Joiner & Kogel, 2009).

Existem vários pontos de controlo na fase G₂ do ciclo celular e em toda a mitose por forma a evitar a catástrofe mitótica. Estes incluem pontos de controlo na fase G₂ sendo ativados pelo complexo DDR.

As células que apresentam defeitos na ativação deste ponto de controlo podem assim entrar em mitose e morrer prematuramente através de catástrofe mitótica. Julga-se que a incapacidade de impedir a entrada na mitose poderá contribuir para um aumento da radiosensibilidade, pois as células deficientes em ATM conseguem passar este ponto de controlo, permitindo a entrada prematura em mitose, mesmo que o DNA não tenha sido totalmente replicado ou reparado, observando-se como resultado um aumento da catástrofe mitótica (Joiner & Kogel, 2009).

As células que conseguem evadir-se da apoptose, após lesões irreparáveis

graves induzidas pela radiação, poderão induzir a catástrofe mitótica seguida de morte física ou, em alternativa, permanecerem vivas. Nesta circunstância o crescimento celular poderá ficar irreversivelmente bloqueado, permanecendo em senescência, porém os mecanismos envolvidos neste bloqueio de crescimento irreversível é ainda desconhecido. De entre as células normais que ocorre sofrer este tipo de bloqueio irreversível temos os fibroblastos, o que poderá indicar a existência de fatores determinantes serem específicos destas células. Por fim, as células poderão acumular várias mutações e transformarem-se, continuando a proliferar e a evoluir para cancro.

O bloqueio irreversível do crescimento celular é dependente da P53 e do gene *TP53 CDKN2A*-respondedor (que codifica a cinase dependente de ciclina (CDK, do inglês *cinase dependente kinase*) inibidor de P21^{WAF1} (do inglês, *cyclin-dependent kinase inhibitor 1* ou *CDK-interacting protein 1*), sendo estes últimos importantes e essenciais componentes deste bloqueio (Chang *et al*, 1999, 2000; Gudkov & Komarova, 2003).

Alguns autores postulam que a manutenção do bloqueio permanente do crescimento celular requer uma fonte constante de espécies reativas de oxigénio (Macip, 2002; Gudkov & Komarova, 2003; Macip *et al*, 2006). Ainda não é claro quando é tomada a decisão sobre a irreversibilidade de bloqueio de crescimento celular nos fibroblastos após irradiação. Se imediatamente após a lesão do DNA (ao mesmo tempo que a decisão de apoptose), ou a partir de tentativas frustradas para concluir a reparação do DNA, refletindo assim o seu fracasso. É claro, porém, que o bloqueio irreversível do crescimento celular não indica que a lesão seja irreparável, uma vez que em fibroblastos deficientes em P53 e em RB, conseguem recuperar após irradiação com doses que habitualmente determinam o bloqueio permanente dos fibroblastos *wild type* (Gudkov & Komarova, 2003).

Radiação ionizante e stresse oxidativo

O stresse oxidativo reflete o desequilíbrio entre os níveis de espécies reativas tóxicas para a célula e os mecanismos de defesa antioxidantes, em favor do das espécies reativas de oxigénio, resultando de uma condição bioquímica referente à

ação de diferentes fatores exógenos ou endógenos sobre a homeostase celular (Barreiros et al, 2006).

Dos agentes exógenos que contribuem para o stresse oxidativo, a radiação ionizante desempenha um papel importante, com produção de lesão biológica direta, contribuindo com cerca de 30 a 40% das lesões celulares ou, indiretamente, devido à radiólise da água com cerca de 60 a 70% das lesões. Este processo leva à formação de radicais livres que, por sua vez, originam espécies reativas de oxigénio. Ainda ao nível celular, ocorre a auto-oxidação, a peroxidação lipídica, o envelhecimento e a carcinogénese como as principais consequências do stresse oxidativo, afetando principalmente a membrana celular, os constituintes do citoplasma e o DNA, contribuindo fortemente para o processo de surgimento de mutações (Barreiros et al, 2006).

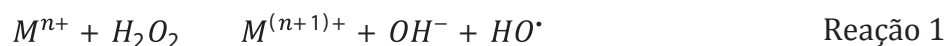
Uma forte evidência de que o stresse oxidativo se encontra intimamente associado à mutagénese deve-se ao facto de os radicais hidroxilo, uma das espécies reativas de oxigénio mais deletéria para o organismo, ao reagirem com a guanósina, originam 8-hydroxy-2'-desoxiadenosina, levando ao aparecimento de mutações nos pares de bases guanina-citosina e timina-adenina (Halliwell, 2007; Matés et al, 2008).

As espécies reativas de oxigénio não apresentam apenas efeitos nocivos. Dependendo da sua concentração, poderão atuar como segundos mensageiros na sinalização celular e são essenciais para inúmeros processos biológicos nas células normais, tais como a adesão celular, a morte celular e a resposta imune, quando em baixas ou moderadas concentrações (Wang & Yi, 2008). Podemos ainda associá-las à produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose e sinalização intercelular (Ushio-Fukai & Nakamura, 2008).

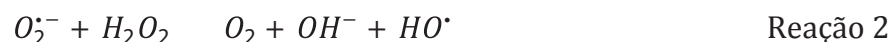
Alguns dos exemplos de espécies reativas de oxigénio são o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical superóxido (O_2^-), os radicais hidroxilo (HO^\cdot), peroxilo (ROO^\cdot) e alcoxil (RO^\cdot), com envolvimento na iniciação e na propagação de reações de radicais livres com efeitos nocivos para as células. O radical hidroxilo revela-se uma das espécies radicalares mais importantes induzida por radiação (Vieira, 2006; Ushio-Fukai & Nakamura, 2008; Wang & Yi, 2008).

A formação do radical anião superóxido ocorre pela ação de duas enzimas, a

xantina oxidase e a aldeído oxidase ($O_2 \xrightarrow{\text{xantina oxidase; aldeído oxidase}} O_2^{\cdot-} + HO_2$) ou ainda durante a auto oxidação de catecolaminas, no citoplasma, por ação da enzima dinucleótido de fosfato de nicotinamida e adenina (NADPH, do inglês nicotinamide adenine dinucleotide phosphat) oxidase e ainda na membrana citoplasmática por redução monoeletrónica do oxigénio molecular pela ubiquinona, na cadeia respiratória da mitocôndria. Já a formação do radical hidroxilo deve-se principalmente à redução do peróxido de hidrogénio por um metal de transição descompartimentalizado, pela reação de Fenton (Reação 1) e de Haber-Weiss (Reação 2) (Vieira, 2006).



O radical hidroxilo, resultante da reação de Fenton, apresenta elevada reatividade e uma semivida de aproximadamente um nanosegundo, limitando este último fator os alvos deste radical a macromoléculas na vizinhança do seu local de formação. O radical anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) desempenha o papel de metal redutor de acordo com a reação de Haber-Weiss (reação 2), dando origem ao radical hidroxilo (Vieira, 2006).



Hoje, sabe-se que a principal via de formação do radical hidroxilo é a radiólise da água, resultante da ação da radiação ionizante sobre as moléculas de água (Wang & Yi, 2008).

A presença de espécies reativas de oxigénio em elevadas concentrações, revela-se prejudicial para o organismo, isto porque ocorre a oxidação de vários componentes celulares, como as proteínas celulares, os lípidos, especialmente os das membranas celular e nuclear e o DNA. Estes fatores poderão induzir senescência e lesões degenerativas ou fatais nas células as quais estão, por norma, relacionadas com várias patologias, das quais como o cancro é um exemplo (Vieira, 2006; Ushio-Fukai & Nakamura, 2008; Wang & Yi, 2008).

Por forma a combater as espécies reativas de oxigénio, o organismo detém mecanismos de defesa, enzimáticos tais como a superóxido dismutase (SOD), a

glutathione peroxidase e a catalase e não enzimático a glutathione reduzida (GSH), os peptídeos de histidina, a transferrina, a ferritina e o ácido dihidrolipóico (Barreiros *et al*, 2006). Para além dos antioxidantes produzidos, a dieta alimentar fornece ainda o α -tocoferol, o β -caroteno e o ácido ascórbico bem como alguns compostos fenólicos (Barreiros *et al*, 2006).

Os compostos previamente mencionados, independentemente da sua proveniência, contribuem para que não ocorra oxidação de várias biomoléculas, ou para que haja um atraso nesta, reduzindo assim as lesões que possam ser provocadas pelo stresse oxidativo. Alguns autores propõem a existência de uma relação entre a sua atividade antioxidante e a capacidade de inibir ou de retardar o surgimento de células neoplásicas (Valko *et al*, 2007; Wang & Yi, 2008).

Segundo Wang e Yi as espécies reativas de oxigénio poderão induzir morte celular. Devido a este facto, algumas terapias não-cirúrgicas no tratamento do cancro, nomeadamente, a quimioterapia, a radioterapia, e a terapia fotodinâmica, utilizam este dado, partilhando o mecanismo subjacente, por forma a eliminar as células tumorais (Wang & Yi, 2008).

Dependendo da sua concentração, as espécies reativas de oxigénio poderão apresentar efeitos opostos sendo assim propostas em terapias pró-oxidantes e antioxidantes no tratamento do cancro (Wang & Yi, 2008).

A capacidade de um tumor se expandir encontra-se diretamente dependente da taxa de proliferação celular, da diferenciação e da taxa de apoptose, assim tal como proposto por *Hanahan and Weideberg*. Os mecanismos de evasão ou de resistência à apoptose, uma das marcas do cancro, poderão ser adquiridos através de vários mecanismos, sendo provavelmente um dos mais comuns as mutações no gene *TP53* (Hanahan & Weinberg, 2011). Este encontra-se no cromossoma 17p13 e codifica uma fosfoproteína nuclear, a proteína P53, com variadas funções, desde a manutenção da integridade celular ao controlo na proliferação celular. As principais funções associadas à proteína P53 são a reparação do DNA, o bloqueio do ciclo celular, a senescência celular e a indução de apoptose, sendo por isso denominada de guardião do genoma humano, como se pode observar na Figura 4 (Pecorino, 2008; Sousa *et al*, 2011). Alguns autores propõem que em determinadas condições de

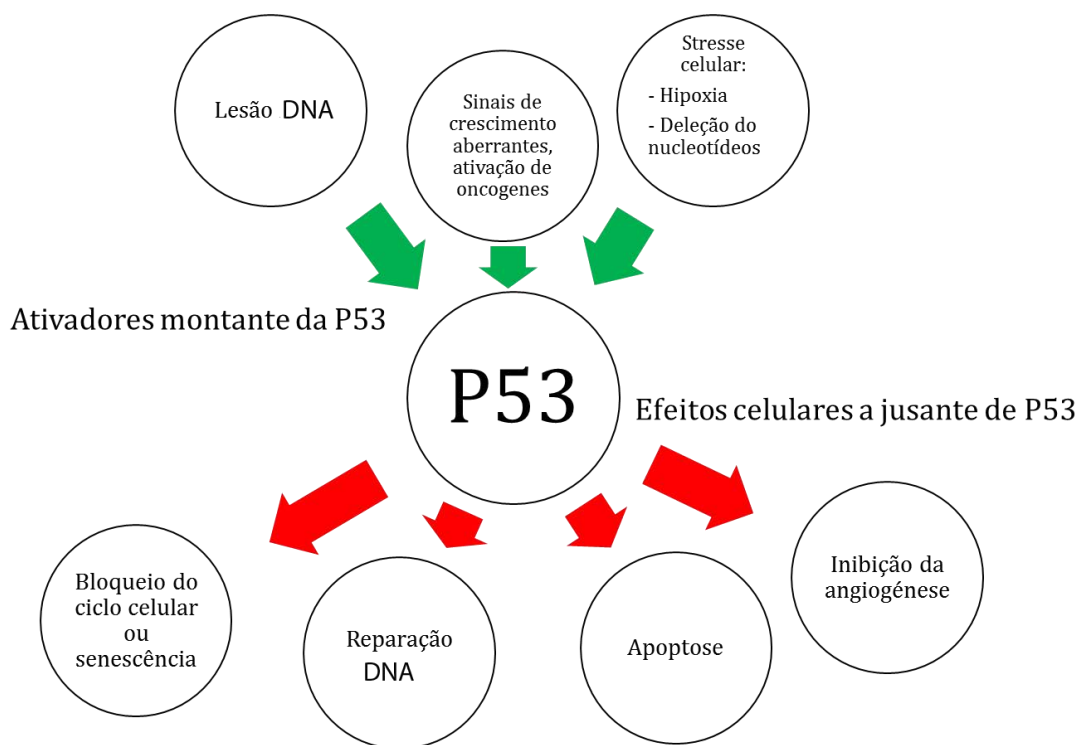


Figura 4: Ativadores a montante e efeitos a jusante da P53. Adaptado de Pecorino 2012.

stresse celular, a proteína P53 apresenta igualmente capacidade de gerar stresse oxidativo, desta forma contribuindo para potenciar a morte celular por apoptose (Achanta *et al*, 2004).

Alguns autores propõem que a proteína P53 mutada ($P53^{Mut}$) poderá ser metabolicamente mais estável do que a proteína P53 *wild type* ($P53^{Wild}$), ocorrendo desta forma uma acumulação desta na célula (Finlay *et al*, 1988; Kuerbitz *et al*, 1992; Bullock *et al*, 1997; Sieben *et al*, 2008).

A proteína P53 tem uma participação crucial no ponto de controlo G₁. Quando uma célula sofre uma agressão, seja ela derivada de uma infeção viral ou devido a stresse, e caso ocorra lesão no DNA, esta poderá ser detetada no ciclo celular na fase G₁. Pelo anteriormente exposto, a proteína P53 poderá induzir bloqueio do ciclo para permitir a reparação do DNA. Se esta proteína se encontrar mutada não poderá desempenhar as suas funções na fase G₁ do ponto de verificação, conduzindo então a proliferação celular e a um acumular de alterações genéticas que poderão contribuir para o desenvolvimento tumoral (Finlay *et al*, 1988; Kuerbitz *et al*, 1992; Bullock *et al*, 1997; Sieben *et al*, 2008).

A mutação do gene *TP53* está presente em mais de 50% dos tumores malignos

e em cerca de 10 a 15% dos casos restantes verifica-se que esta ou é inibida ou é regulada negativamente (Oliveira & Oliveira, 2001; Duarte & Paschoal, 2006; Ramos, 2008; Sousa *et al*, 2011). No caso de mutações da proteína P53, estas caracterizam-se pela interrupção das suas funções promovendo alterações nos pontos de controlo do ciclo celular, promovendo a imortalização celular, a instabilidade genómica e a sobrevivência inapropriada, contribuindo para a proliferação contínua (Fridman & Lowe, 2003).

Sempre que a lesão celular seja pouco extensa ou permita a sua correção por enzimas, a proteína P53 bloqueia o ciclo celular, permitindo que a correção da mutação aconteça. Contudo, no caso desta última ser irreparável, a proteína P53 bloqueia o ciclo celular e inicia o processo de morte celular programada, sendo que células expressando proteína P53 mutada ou que não codifiquem de todo esta proteína poderão assim não induzir apoptose, permitindo a proliferação. (Anazetti & Melo, 2007; Reinhardt *et al*, 2007).

A proteína P53 poderá exercer sua atividade, ativando e interagindo com diversas vias de sinalização (Lowery *et al*, 2004). Através da ativação da proteína P21, proteína reguladora da transição da fase G₁ para S no ciclo celular. A P21, codificada pelo gene *WAF1*, igualmente designado por *Cip1*, *SDi1* ou *Pic1*, inativa o complexo ciclina-CDK através da formação de um complexo CDK2/ciclina A ou E. Assim a proteína P53 controla a fosforilação do complexo molecular ativo ciclina/CDK, bloqueando o ciclo celular. Pela conjugação da proteína P21 com a proteína PCNA, a proteína P53 induz reparação do DNA (Lowery *et al*, 2004).

CAPÍTULO 2 – CANCRO

O cancro é um problema de saúde importante e crescente na sociedade moderna, de etiologia multifatorial na dependência de fatores exógenos e de grupos de risco. A evolução da doença é ainda influenciada pela abordagem médica no que respeita ao rastreio, ao diagnóstico, ao prognóstico e à terapêutica. Todos estes fatores oscilam muito entre os diferentes tipos de cancro. Entre as neoplasias mais frequentes mundialmente destaca-se o cancro da mama, o cancro da próstata, o cancro do pulmão e o cancro colo-retal e, na Figura 5 está representada a incidência e a mortalidade para o ano de 2012.

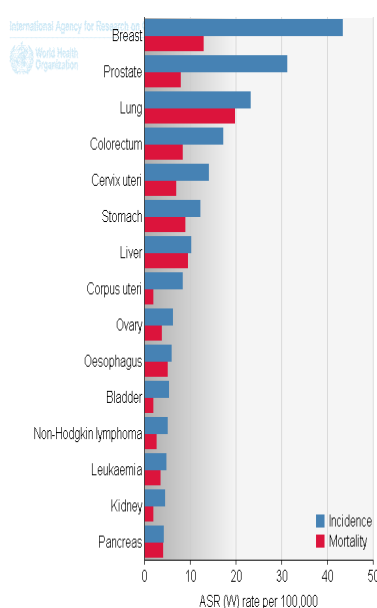


Figura 5: A incidência (barras azuis) e a mortalidade (barras vermelhas) do cancro para o ano de 2012. As barras representam o número de casos por 100.000 indivíduos. Retirado de Ferlay et al, 2015.

Nos países desenvolvidos verifica-se a maior incidência de cancro, no entanto, estão disponíveis melhores serviços de saúde, o que constitui uma mais-valia em termos de deteção, de diagnóstico e de tratamento. Pelo contrário, nos países em desenvolvimento, o diagnóstico de tumores malignos frequentemente ocorre mais tarde, o que se reflete na resposta ao tratamento (Stewart & Wild, 2014; Ferlay et al, 2015).

Na globalidade, a incidência do cancro é cerca de 25% superior em homens do que em mulheres. No que respeita ao género masculino, as populações da Austrália e da Nova Zelândia apresentam a maior incidência (365/100 000 indivíduos) enquanto a menor incidência ocorre na África Ocidental (79/100 000). No caso do

género feminino, a maior incidência de cancro verifica-se na América do Norte (295/100 000) e a menor na Ásia Central e do Sul (103/100 000) (Ferlay *et al*, 2015).

A mortalidade relacionada com o cancro, em países desenvolvidos, é significativamente superior no sexo masculino (15%) do que no sexo feminino (8%). A maior frequência de morte por cancro em homens acontece na Europa Central e Oriental, enquanto nas mulheres ocorre na Melanésia e na África Oriental (Ferlay *et al*, 2015).

Em Portugal, durante o ano de 2009, na região Norte, foram diagnosticadas 14 584 novas neoplasias, o que corresponde a uma incidência de 446,3/100 000. A incidência de cancro para o sexo masculino foi de 504,6/100 000, o que corresponde a 7 917 casos, e para o sexo feminino foi de 392,4/100 000, o que corresponde a 6 667 casos. Estes resultados traduzem um aumento de 2,1% no número de tumores malignos registados relativamente ao ano de 2008. Os cancros mais frequentes em Portugal foram o colorretal, o da mama, o da próstata e o do estômago que, em conjunto, representaram 49,0% das patologias oncológicas registadas na Região Norte (Pontes *et al*, 2008).

A carcinogénese é um processo que ocorre em diferentes etapas, que refletem várias alterações genéticas e epigenéticas que culminam na transformação progressiva das células normais em suas derivadas com elevado grau de malignidade (Stewart & Wild, 2014).

O cancro pode caracterizar-se por multiplicação celular desregulada, por capacidade de invasão e por capacidade de disseminação para além do local primário (Hanahan & Weinberg, 2000). Aproximadamente 85% dos tumores sólidos têm origem em células epiteliais e são classificados como carcinomas; os tumores derivados das células da mesoderme são denominados de sarcomas e os cancros com origem em tecido glandular são designados por adenocarcinomas. No caso dos tumores líquidos destacam-se o mieloma, as leucemias e os linfomas, com origem nos diferentes precursores hematopoéticos (Jemal *et al*, 2011; Ferlay *et al*, 2015).

Independentemente da sua origem, Hanahan e Weinberg em 2000 reconheceram seis características, referidas como *hallmarks* na literatura anglo-saxónica, comuns à maior parte das neoplasias. Estas características são a capacidade de multiplicação independente de sinais de crescimento, a evasão aos sinais de inibição de multiplicação celular, a evasão à apoptose, o potencial de replicação ilimitado, a angiogénese e a invasão e a metastização (Hanahan & Weinberg, 2000). Em 2011, os mesmos autores reconheceram mais quatro *hallmarks* que respeitam à evasão à destruição pelo sistema imune, à inflamação promovida pelo tumor e resposta do sistema imunitário, à instabilidade genómica e mutacional bem como à desregulação do metabolismo energético, características reproduzidas na Figura 6 (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).

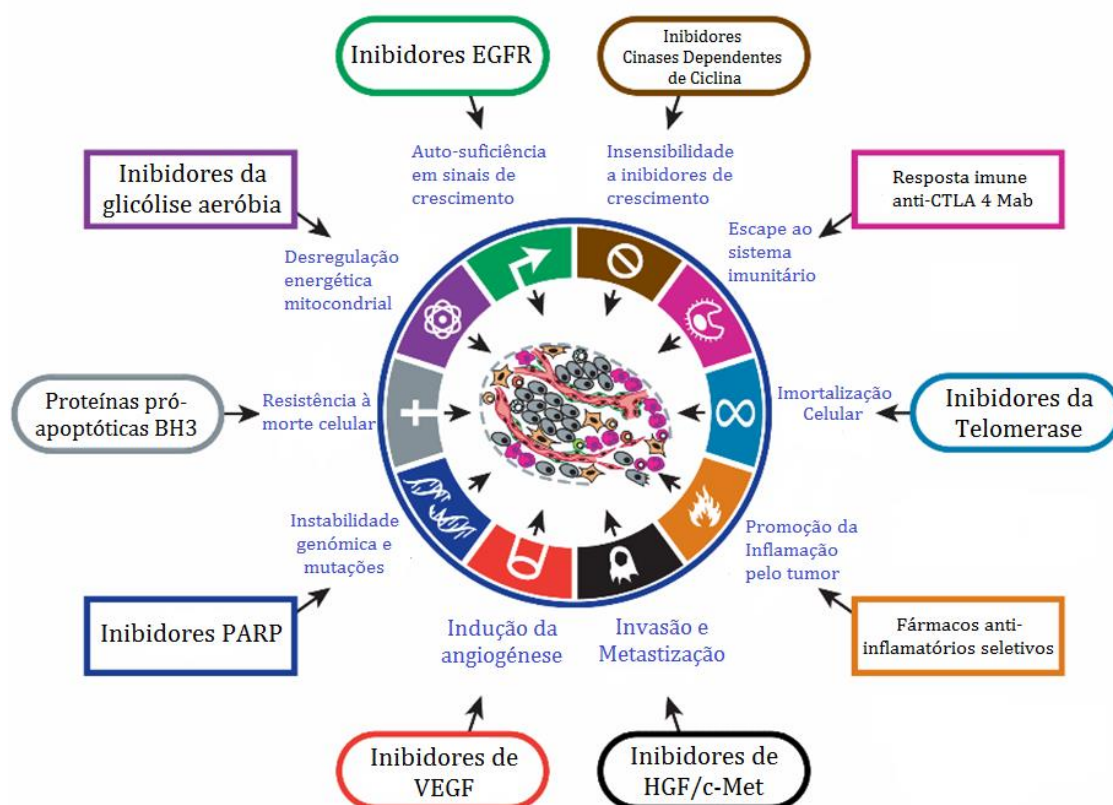


Figura 6: As *Hallmarks* do cancro. O esquema representa as *hallmarks* reconhecidas em 2000 e em 2011 por Hanahan e Weinberg. Retirado de Hanahan and Weinberg 2011.

CANCRO DO PULMÃO

O cancro do pulmão é um dos cancros mais frequentes, atualmente responsável por um número elevado de mortes em todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o cancro do pulmão pode ser subdividido em dois grandes tipos: o cancro do pulmão de pequenas células e o cancro do pulmão de não pequenas células. O último pode ainda ser subdividido em carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células (Edwards *et al*, 2005; Jeremic, 2005; Ettinger *et al*, 2012; Peters *et al*, 2012; Früh *et al*, 2013).

Os diferentes tipos de neoplasias do pulmão apresentam características próprias, no que respeita à sua evolução e à capacidade de metastização, o que faz com que este cancro seja considerado não um tipo mas sim como um conjunto de doenças. A sua identificação e caracterização dependem da morfologia celular e da expressão de diferentes proteínas, que permitem reconhecer padrões imunohistoquímicos distintos, os quais podem possibilitar diferentes abordagens terapêuticas.

O estadiamento da doença está de acordo com o *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), atualmente na 7^a edição, que a classifica segundo o sistema tumor-gânglios-metástase (TNM, do inglês, *tumor node metastasis*) (Edge & Compton, 2010). Assim, após biópsia positiva é avaliada a extensão da doença e realizado o planeamento da terapêutica (Edge & Compton, 2010). Esta avaliação considera a dimensão do tumor, a invasão dos tecidos adjacentes e a metastização ganglionar regional e à distância. O estadiamento e a caracterização realizam-se com recurso a exame clínico e patológico, consoante seja baseado em dados clínico-imagiológicos ou na análise anatomopatológica de uma peça cirúrgica (Edge & Compton, 2010).

A disseminação do cancro ocorre por via local, por via linfática e por via sanguínea. A disseminação local ocorre no próprio tecido envolvente, por proliferação e invasão através dos limites do tecido transformado, até atingir as estruturas adjacentes. Na disseminação por via linfática e por via sanguínea, as células tumorais entram no vasos do sistema linfático ou sanguíneo,

respetivamente, onde circulam até invadir outros tecidos ou órgãos. Deste modo, as células tumorais têm capacidade de invadir outros órgãos ou tecidos, o que define o processo de metastização.

A sobrevivência a cinco ou mais anos após a data do diagnóstico está limitada a apenas 15,9% dos doentes com cancro do pulmão (Ferlay *et al*, 2015). Apesar desta evidência, os últimos 10 anos constituíram um marco na evolução a nível do diagnóstico e do tratamento deste cancro, com o estabelecimento de técnicas minimamente invasivas e de terapias dirigidas a alvos moleculares.

Dados epidemiológicos

O cancro do pulmão é uma patologia que frequentemente apresenta mau prognóstico, pois é considerado uma neoplasia agressiva e apresenta elevada mortalidade. As últimas estimativas mundiais, plasmadas no GLOBOCAN 2012, demonstram que o cancro do pulmão se encontra entre os cancros mais diagnosticados, com aproximadamente 1,82 milhões de novos casos o que corresponde a 13% de todos os cancros (Ferlay *et al*, 2013). É também claramente o mais mortal com aproximadamente 1,59 milhões de mortes associadas, o que corresponde a 19,4% de todos os cancros (Ferlay *et al*, 2013; Torre *et al*, 2015). O cancro do pulmão apresenta elevada prevalência em indivíduos fumadores (Boyle, 1997). Apesar de continuar a afetar maioritariamente o sexo masculino, nos últimos anos observou-se uma diminuição desta predominância, em oposição a um aumento de casos no sexo feminino. Na população masculina, as taxas de incidência mais elevadas encontram-se no Sudeste e no Leste Europeu, na América do Norte, na Micronésia, na Polinésia e no Leste da Ásia, enquanto as mais baixas ocorrem em África. Na população feminina, as taxas de incidência são mais elevadas na América do Norte, no Norte da Europa, na Austrália e na Nova Zelândia, como se pode verificar na Figura 7 (Parkin *et al*, 1999; Ferlay *et al*, 2013).

A taxa de sobrevivência a 1 ano dos doentes com cancro do pulmão aumentou aproximadamente 35%, entre os anos de 1975 e 1979, para 43%, entre os anos de 2003 e 2006. Este incremento deve-se principalmente ao desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas e ao recurso a terapias combinadas. Nos casos de doença

localizada, a taxa de sobrevivência é de 53%, contudo apenas 15% são diagnosticados precocemente. Porém, a taxa de sobrevivência aos 5 anos e para a combinação de todos os estádios é apenas de 16%. No que respeita aos subtipos de cancro do pulmão a taxa de sobrevivência aos 5 anos dos doentes de cancro do pulmão de pequenas células é de 6% enquanto dos doentes de cancro do pulmão de não pequenas células é de 17% (Parkin *et al*, 1999).

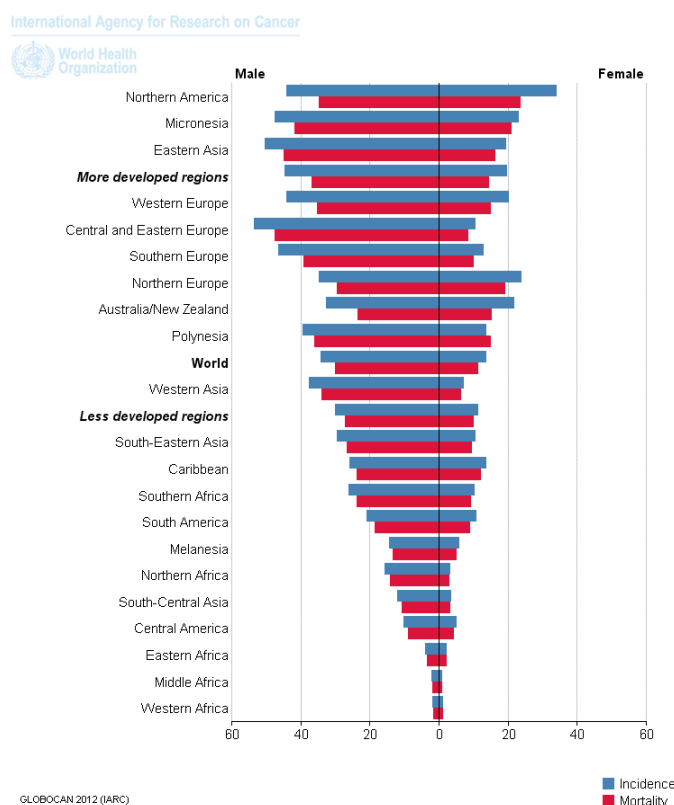


Figura 7: Incidência e mortalidade estimadas para o cancro do pulmão para o ano de 2012. Retirado de Ferlay *et al*, 2013.

O hábito tabágico constitui um dos fatores de risco mais importantes. Aliás, sabe-se que um cigarro contém mais de 60 substâncias carcinogénicas como as nitrosaminas ou o benzo-pireno-diol-epóxido. Estas substâncias, para além de carcinogénicas, têm ainda a capacidade de induzir inflamação crónica (Takahashi *et al*, 2010). A história de hábito tabágico, presente ou passado, é um fator comum em cerca de 85% a 90% dos casos de cancro do pulmão (Barnard, 2004; Gaughan *et al*, 2013). Além deste fator de risco destacam-se as alterações genéticas relacionadas com o ambiente ou a presença de mutações nos genes do recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2, do inglês *human epidermal growth factor*

receptor 2), do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês epidermal growth factor receptor) e da proteína BRAF (BRAF, do inglês protein B-Raf). Esta carga genética está associada principalmente à incidência de cancro do pulmão em populações de faixas etárias mais baixas (Tolosa et al, 2003; Stewart, 2012). A exposição a substâncias específicas poderá igualmente ser considerada como fator oncogénico, como é o caso dos asbestos e do gás radão (Molina et al, 2008; Peto et al, 2012).

Turner et al. referem nos seus estudos que, o segundo maior fator de risco associado ao cancro do pulmão, possa ser o radão, um gás radioativo que surge do decaimento de rádio-226. Sabe-se que o decaimento deste isótopo do rádio origina elementos radioativos emissores de partículas alfa, as quais, provocam lesões celulares que contribuem para o aumento da probabilidade de mutações genéticas (Turner et al, 2011). Em relação ao asbesto, cerca de 3 a 4 % dos casos de cancro do pulmão poderão ser causados pela exposição a este mineral que é constituído por longas e finas fibras que podem ser inaladas, e constitui fator de risco também para o mesotelioma. A exposição a este carcinogénico incrementa significativamente o risco de cancro do pulmão em fumadores (Schmid et al, 2010; Paracha et al, 2015).

A identificação de um fator ambiental desencadeante de cancro do pulmão como os anteriormente apresentados contribui para a sua prevenção, através da implementação de medidas preventivas de higiene e de segurança (Duarte & Paschoal, 2006).

Muitos casos de cancro do pulmão são diagnosticados em populações idosas e, por esse motivo, a idade é também considerada um fator de risco (Stewart, 2012).

Outros fatores de risco são a exposição ocupacional e ambiental a outros carcinogénicos, tais como o cádmio, o crómio, o níquel, o arsénio, o berílio e ainda os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Observa-se, assim, uma elevada incidência desta patologia em trabalhadores de indústrias de refinação de metal, de processos de fundição e de gás (Parkin et al, 1999; Molina et al, 2008).

De acordo com a OMS, o diagnóstico deste cancro deve ser realizado com recurso a diversos exames complementares de diagnóstico, como por exemplo, técnicas de imagiologia, moleculares ou citologia (Saeed & Anderson, 2011). O diagnóstico e o estadiamento poderão incluir biopsia, broncoscopia, tomografia por

emissão de positrões/tomografia computadorizada (PET/CT, do inglês *positrons emission tomography/computed tomography*) e ressonância magnética nuclear (Ceresoli, 2012). Para a caracterização do subtipo histológico, podem ainda ser realizados exames de diagnóstico por estudo molecular, com vista a avaliar a presença ou não de marcadores como mutações do gene do EGFR e do oncogene *cinase do linfoma anaplásico* (ALK, do inglês *anaplastic lymphoma kinase*), que podem ser relevantes na definição da terapêutica (Saeed & Anderson, 2011; Shepherd *et al*, 2013).

Após o diagnóstico, a extensão anatómica da doença é descrita através da classificação TNM que determina o prognóstico e o tratamento do cancro do pulmão (Demetri *et al*, 2010; Rami-Porta *et al*, 2011; Früh *et al*, 2013).

Caraterização e tipos

O cancro do pulmão de não pequenas células é o mais prevalente, contando com aproximadamente 80% de todos os cancros do pulmão (Breen *et al*, 2008; Tanaka *et al*, 2008). Este cancro apresenta, geralmente, um comportamento menos agressivo, desenvolve-se e metastiza mais lentamente que o cancro do pulmão de pequenas células.

Cancro do pulmão de não pequenas células

O cancro do pulmão de não pequenas células, como referido, inclui os subtipos adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, ou epidermoide ou espinhocelular e carcinoma de células grandes, no qual, por sua vez, podem ser reconhecidos vários subtipos (Beau-Faller *et al*, 2003; Molina *et al*, 2008).

O adenocarcinoma é o subtipo de cancro do pulmão de não pequenas células mais comum, particularmente entre os não fumadores. Geralmente tem a sua origem nas pequenas vias aéreas e nos alvéolos e, em muitas situações, parece surgir associado a locais de cicatrização (Neville, 2005). Dentro dos adenocarcinomas, o subtipo mais comum é o carcinoma bronco-alveolar, com evidências de associação com o sexo feminino e com os não fumadores, em contraste com o carcinoma de

células escamosas, que se desenvolve tipicamente nos brônquios e que progride mais lentamente que os restantes subtipos, onde está bem caracterizada a associação ao tabagismo (Neville, 2005; Goldstraw *et al*, 2011). O carcinoma de grandes células ocorre geralmente nas vias aéreas de menor raio, desenvolve-se aceleradamente e está, na maioria dos casos, associado ao tabagismo (Neville, 2005).

Nos últimos anos tem-se observado um aumento significativo de casos de adenocarcinoma, o que parece estar relacionado com uma mudança dos filtros dos cigarros com baixo teor de alcatrão os quais estão associados a uma quantidade superior de nitrosureias. A redução do teor de alcatrão no fumo dos cigarros permite que a inalação seja mais profunda, atingindo a periferia do pulmão e o simultâneo aumento das nitrosureias explica o aumento da incidência deste subtipo de cancro do pulmão. Por outro lado, a incidência de carcinoma de células escamosas tem vindo a decrescer (Neville, 2005).

Para além destes subtipos reconhece-se ainda o cancro do pulmão de não pequenas células não especificado (NOS, do inglês *not otherwise specified*), assim denominado devido ao pequeno tamanho de amostra, que limita a análise, ou por apresentar no exame histológico, células pouco diferenciadas (D'Addario *et al*, 2010; Panel-Chair, 2015).

Cancro do pulmão de pequenas células

O cancro do pulmão de pequenas células é responsável por cerca de 16% de todos os cancros do pulmão. A maioria está relacionada com o tabagismo e apenas 1% dos casos surge em não-fumadores (Jemal *et al*, 2009).

Em comparação com o cancro do pulmão de não pequenas células, o cancro do pulmão de pequenas células geralmente caracteriza-se por apresentar um tempo de duplicação inferior, o que se traduz por desenvolvimento rápido e metastização precoce. Tem origem normalmente nas áreas centrais do pulmão e afeta o sistema neuro-endócrino. A maioria dos doentes com cancro do pulmão de pequenas células apresenta metástases por disseminação hematogénica, enquanto apenas cerca de um terço dos doentes apresentam doença confinada ao tórax (Ettinger, 2012;

Ettinger *et al*, 2012).

O cancro do pulmão de pequenas células está associado a várias síndromas paraneoplásicas, de entre as quais a degeneração cerebral paraneoplásica, a síndrome da secreção inapropriada da hormona antidiurética e a síndrome de *Lambert-Eaton*. Apesar deste tipo de cancro do pulmão, numa primeira fase, se revelar sensível à quimioterapia e à radioterapia a sua remissão total é difícil.

Estudos publicados recentemente evidenciam que os indivíduos do sexo feminino, independentemente da idade, têm mais tendência a desenvolver este tipo de cancro do pulmão do que os do sexo masculino, sendo que as mulheres mais novas apresentam maior tendência do que as mais velhas. Este facto parece indicar que as mulheres que começam a fumar mais cedo parecem estar mais suscetíveis ao desenvolvimento de cancro do pulmão de pequenas células (Jackman & Johnson, 2005; Hammerschmidt & Wirtz, 2009; Rodriguez & Lilenbaum, 2010; Kazarian & Laird-Offringa, 2011; Zhang *et al*, 2013).

O cancro do pulmão de pequenas células é um tumor epitelial maligno constituído por células pequenas com pouco citoplasma, orlas das células mal definidas, cromatina nuclear finamente granular e nucléolos ausentes ou discretos. As células são, normalmente, redondas, ovais ou em forma de fuso e com moldagem nuclear proeminente, exibindo uma contagem mitótica elevada. Cerca de 30% das autópsias realizadas em doentes com este tipo de cancro do pulmão revelaram igualmente áreas de diferenciação com cancro do pulmão de não pequenas células, porém esta diferenciação é menos comumente detetada em amostras de doentes não tratados previamente. Este achado contribui para o surgimento da teoria de que a carcinogénese pulmonar poderá ter origem numa célula pluripotente, com capacidade de se diferenciar em diversas vias (Brambilla *et al*, 2001).

Sabe-se hoje que 95% dos cancros do pulmão de pequenas células se originam no pulmão, mas poderão igualmente surgir a partir de localizações extrapulmonares, incluindo a nasofaringe, o trato gastrointestinal e o trato geniturinário (Klimstra, 2005; Pervez *et al*, 2013; Panel-Chair, 2015). No entanto, o comportamento clínico e biológico é similar, com elevado potencial de disseminação metastática. Contudo, as células malignas de doentes com cancro do pulmão de pequenas células extrapulmonar, ao contrário do de origem pulmonar, não

costumam apresentar deleções 3p macromoleculares, o que poderá insinuar uma patogenia diferente (Klimstra, 2005; Pervez *et al*, 2013; Panel-Chair, 2015).

O estadiamento dos doentes foi, durante algumas décadas, efetuado de acordo com um sistema de dois estádios: doença localizada e doença extensa. Os doentes num estádio com doença localizada caracterizavam-se por tumores localizados ao hemitórax ipsilateral, ausência de metástases enquanto os doentes com doença extensa se caracterizavam pela presença de metástases (Edge & Compton, 2010; Ceresoli, 2012; Panel-Chair, 2015). Atualmente o estadiamento do cancro do pulmão de pequenas células e do cancro do pulmão de não pequenas células é realizado de acordo com a classificação TNM, versão 7, do sistema de estadiamento da *Union for International Cancer Control*, representado na Tabela 1 e na Tabela 2 (Edge & Compton, 2010; Lababede *et al*, 2011; Panel-Chair, 2015).

Para os doentes com doença localizada de cancro do pulmão de pequenas células, a opção terapêutica de primeira linha é a cirurgia e o tratamento com quimioterapia e com radioterapia torácica constituem terapêuticas neoadjuvantes ou adjuvantes (Kalemkerian *et al*, 2006; Panel-Chair, 2015). No entanto, a terapêutica cirúrgica é recomendada para um grupo muito restrito de doentes, cerca de 2% a 5%, o que corresponde a doença no estádio I, ou seja, em fase cirurgicamente ressecável (Panel-Chair, 2015). Para os doentes com doença localmente avançada (estádios III e IV), a utilização de quimioterapia pode constituir um efeito paliativo com o intuito de aliviar os sintomas e de melhorar a qualidade de vida.

Tratamento do cancro de pulmão

A abordagem terapêutica dos doentes com cancro do pulmão depende de vários fatores, nomeadamente o tipo de cancro e seu subtipo, a existência ou não de invasão ganglionar, o grau de metastização bem como o estado geral do doente. Os tratamentos incluem a cirurgia e a radioterapia, para tratamento localizado, e a quimioterapia como abordagem sistémica tanto na modalidade neoadjuvante como na modalidade adjuvante (Bearz *et al*, 2011; Ettinger *et al*, 2012).

Tabela 1: Classificação tumor-gânglio linfático-metástase para o cancro do pulmão.

TX	Citologia positiva unicamente
T1	≤3cm
T1a	≤2cm
T1b	>2 to 3 cm
T2	Brônquio principal ≥2 cm da carina e invade a pleura visceral, atelectasia parcial
T2a	>3-5cm
T2b	>5-7cm
T3	> Parede 7 centímetros no peito, diafragma, pericárdio, pleura mediastinal brônquio principal <2 cm da carina, atelectasia total, o nódulo separado (s) no mesmo lobo
T4	Mediastino, coração, grandes vasos, carina, traqueia, esófago, vértebra; nódulo tumoral separado(s) em um lóbulo ipsilateral diferente
N1	Peribronquial ipsilateral, hilar ipsilateral
N2	Subcarinal, mediastinal ipsilateral
N3	Contralateral do mediastino ou hilar, escaleno ou supraclavicular
M1	Metástases à distância
M1a	Nódulo tumoral separado(s) em um lobo contralateral; nódulos pleurais ou maligno da pleura ou derrame pericárdico
M1b	Metástases à distância

Adaptado de Lababede *et al*, 2011 e de Früh *et al*, 2013.

Tabela 2: Estadiamento anatómico/grupos de prognóstico.

Carcinoma oculto	TX	N0	M0
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio IA	T1	N0	M0
Estádio IB	T2a	N0	M0
Estádio IIA	T2b	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2a	N1	M0
Estádio IIB	T2b	N1	M0
	T3a	N0	M0
Estádio IIIA	T1-2	N2	M0
	T3	N2-1	M0
	T4	N0-1	M0
Estádio IIIB	T1-2	N3	M0
	T3	N3	M0
	T4	N2-3	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1a
	Qualquer T	Qualquer N	M1b

Retirado de Lababede *et al*, 2011 e de Panel-Chair, 2015.

Nos últimos anos, observou-se um grande desenvolvimento de terapias dirigidas a alvos moleculares, com o fim de alcançar estruturas específicas do tumor. Na maioria dos casos, o tratamento do cancro do pulmão associa estas terapêuticas às abordagens convencionais (Hammerschmidt & Wirtz, 2009; Stewart, 2012).

Cirurgia no cancro do pulmão

O tratamento de doentes com o diagnóstico de cancro do pulmão de não pequenas células no estágio I ou no estágio II é elegível para cirurgia, sendo a ressecção o procedimento de primeira linha (Howington *et al*, 2013a; Panel chair, 2015). A cirurgia assegura a maior probabilidade de remissão completa, e é considerada sempre que possível, como proposta de terapia local curativa. A elegibilidade cirúrgica está dependente da localização, da dimensão e da extensão do tumor, ou seja, do seu estadiamento (Howington *et al*, 2013a; Panel-Chair, 2015).

No caso do cancro do pulmão de não pequenas células mais de metade dos doentes, no momento do diagnóstico, apresenta lesões irressecáveis devido ao estágio avançado do tumor (Howington *et al*, 2013a; Panel-Chair, 2015).

A cirurgia pode assumir três tipos, isto é, a ressecção sublobar, a lobectomia e a pneumectomia. A ressecção sublobar, que é a cirurgia mais realizada para o tratamento de cancro do pulmão, é opção quando o tumor é diagnosticado num estágio inicial. De facto, uma revisão efetuada por um grupo de Pittsburgh mostrou, que esta opção cirúrgica, tem baixas taxas de morbilidade e de mortalidade, preserva a função pulmonar, quando comparada à lobectomia, e representa a única opção efetiva de tratamento para doentes com alto risco de repercussão cardiopulmonar, sendo a cirurgia mais realizada para o tratamento de cancro do pulmão (Schuchert *et al*, 2010, 2011; Mohiuddin *et al*, 2014). A lobectomia envolve a remoção do lobo pulmonar atingido, enquanto a pneumectomia envolve a remoção de todo o pulmão (Scott *et al*, 2007; Howington *et al*, 2013a).

Quimioterapia no cancro do pulmão

Atualmente, a quimioterapia convencional é a abordagem terapêutica mais utilizada para o cancro. Como se sabe, os fármacos usados na quimioterapia

convencional afetam tanto as células tumorais como as células normais. Os fármacos utilizados podem atuar em diversos pontos do ciclo mitótico e como as células tumorais se dividem mais rapidamente do que as células normais, são mais vulneráveis ao efeito terapêutico (Neville, 2005; DeVita & Chu, 2008).

De acordo com o seu mecanismo de ação, os fármacos usados na quimioterapia convencional podem ser categorizados em fármacos antimetabólitos, agentes alquilantes, antibióticos antitumorais, alcaloides de vinca, agentes hormonais e modificadores de resposta biológica. Os antimetabólitos mimetizam nutrientes celulares como, por exemplo, o 5-fluorouracilo, a capecitabina ou o metotrexato; os agentes alquilantes, como a ciclofosfamida, o clorambucil ou o melfalan, induzem lesão no DNA impedindo a sua replicação; os antibióticos antitumorais como a actinomicina, a bleomicina, a daunorrubicina e a doxorrubicina, inserem-se nas cadeias de DNA e quebram a ligação da molécula ou inibem a síntese de ácido ribonucleico (RNA, do inglês ribonucleic acid); os alcalóides da vinca, como a vimblastina e a vincristina, impedem a formação dos fusos acromáticos necessários para a divisão celular; os agentes hormonais, como o tamoxifeno ou o fulvestranto, inibidores da aromatase, inibem o crescimento de alguns cânceros através da sua ligação às proteínas celulares; por fim, os modificadores de resposta biológica onde se incluem o ipilimumab, um anticorpo monoclonal dirigido à cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), ou o pembrolizumab, um anticorpo monoclonal dirigido ao recetor de morte 1 (PD-1, do inglês Programmed cell death protein 1), que interrompem processos fundamentais para o crescimento ou a disseminação das células cancerígenas (Zavala & Kalergis, 2015).

A quimioterapia apresenta elevado grau de toxicidade e, por isso, é efetuada em ciclos com períodos de descanso. A medula óssea, o sistema digestivo, o sistema reprodutor e os folículos pilosos são constituídos por células com elevada taxa de divisão sendo, por isso, particularmente afetados por esta terapia (Lutschg, 2009).

Embora a quimioterapia possa ser usada isoladamente em alguns casos, geralmente é usada em combinação, como no tratamento neoadjuvante, de forma a reduzir as dimensões do tumor ou a ter um efeito radiosensibilizante (Begg et al, 2011).

As terapias que usam os derivados da platina são predominantemente usadas

como quimioterapia adjuvante, e são recomendadas para doentes em estágio II por forma a auxiliar o tratamento, com diminuição do risco de disseminação metastática. Devido aos seus diferentes e complementares mecanismos de ação, os derivados da platina e os taxanos são geralmente combinados na quimioterapia.

Para os doentes no estágio III de cancro do pulmão o plano terapêutico é variável e depende da localização e do número de gânglios linfáticos envolvidos. Caso não exista o envolvimento de outros lóbulos e do sistema linfático (estádio IIIA), o tratamento recomendado é semelhante ao dos estádios I/II, com associação de quimioterapia adjuvante. Caso contrário, se houver envolvimento dos gânglios linfáticos e como a cirurgia, por norma, não é opção terapêutica neste estágio, é proposto o tratamento baseado em quimioterapia e radioterapia. Os doentes no estágio IIIB ou IV apresentam envolvimento dos gânglios linfáticos e grandes massas tumorais, pelo que as terapias são baseadas na radioterapia local associada a quimioterapia. Devido à extensão da lesão, a terapêutica assume um propósito paliativo (Hammerschmidt & Wirtz, 2009; Bearz *et al*, 2011; Dienstmann *et al*, 2011; Mazzone & Mekhail, 2012; Stewart, 2012).

Os doentes com suspeita de ter um nódulo solitário de doença metastática devem ter a confirmação do tecido sempre que possível. A suspeita de doença metastática deve ter a confirmação, caso seja viável, de um dos locais metastáticos. Os doentes que apresentem, vários locais de doença metastática deverão realizar uma biópsia da lesão pulmonar primária ou dos gânglios linfáticos do mediastino, sempre que a biópsia num dos locais metastáticos seja inacessível (Panel-Chair, 2015).

A sobrevivência da maioria dos doentes com cancro do pulmão de não pequenas células em estágio inicial é potenciada pela quimioterapia adjuvante (Früh *et al*, 2013).

Em relação ao cancro do pulmão de pequenas células, apesar de ter boa resposta à quimioterapia e à radioterapia a maioria dos casos apresenta já metastização linfática extensa no momento do diagnóstico (Kalemkerian *et al*, 2006). Este tumor, agressivo, de crescimento e disseminação rápida, apresenta ausência de sintomatologia o que determina a grande extensão da doença no momento do diagnóstico, e explica a inelegibilidade cirúrgica. A cirurgia está

limitada a um número diminuto de casos, em doentes no estágio I da doença, sendo seguida por quimioterapia, por radioterapia ou por ambas. A Figura 8 mostra um esquema simplificado das abordagens terapêuticas para o cancro do pulmão de pequenas células (Bayman *et al*, 2009; Hammerschmidt & Wirtz, 2009; Rossi *et al*, 2013).

Os doentes no estágio II ou III são geralmente tratados com uma combinação de quimioterapia (baseada nos derivados da platina) e com radioterapia, sempre que o doente seja elegível para realizar os dois tratamentos concomitantemente. No estágio IV de cancro do pulmão de pequenas células, a quimioterapia à base de platina, como tratamento paliativo, está indicada, na dependência do estado geral do doente (Früh, 2011; Stahel *et al*, 2011; Früh *et al*, 2013).

Os doentes de cancro do pulmão de pequenas células submetidos a tratamento com quimioterapia ou com quimioterapia combinada com a radioterapia (Herrmann *et al*, 2011) pode atingir o controlo da doença, no entanto, a recidiva é comum (Herrmann *et al*, 2011).

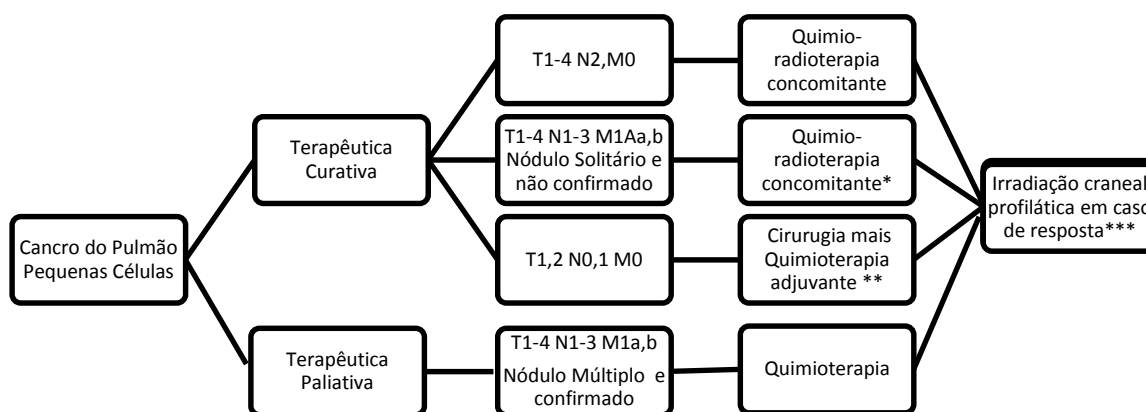


Figura 8: Algoritmo para o tratamento do cancro do pulmão de pequenas células. * Se não há confirmação de metástase solitária, a radioterapia poderá ser utilizada, após a primeira avaliação sendo omissa no caso de comprometimento metastático óbvio. ** Quimioterapia concomitante como opção alternativa. *** Ou doença estável em caso de doença localizada. Adaptado de Früh *et al*, 2013.

Tratamento dirigido no cancro do pulmão

Durante os últimos anos foram investigadas um grande número de alterações moleculares, em especial mutações e amplificações génicas, responsáveis pela

sobrevivência tumoral, as quais influenciam diretamente o prognóstico dos doentes (Tovar *et al*, 2014). Outra abordagem terapêutica no cancro do pulmão passa pelas terapias dirigidas a alvos moleculares. O conceito destas terapias está na utilização de novos fármacos, com a capacidade de interagir com moléculas que têm funções específicas. Por exemplo, fármacos que bloqueiam ou que diminuem a neovascularização do tumor, isto é, que limitam a angiogénese por interação com o receptor do *vascular endothelial growth factor* (VEGF), o qual participa no crescimento celular, proliferação e motilidade (Ray *et al*, 2010; Bearz *et al*, 2011; Lamelas *et al*, 2012; Parente Lamelas *et al*, 2012). Estes tratamentos têm como alvo alterações moleculares comuns nas células tumorais e podem aumentar a taxa de sobrevivência nos estádios não cirúrgicos (Słodkowska & Rojo, 2011; Lamelas *et al*, 2012; Chung *et al*, 2014).

As mutações no EGFR e no ALK estão bem caracterizadas como alvos moleculares no cancro do pulmão de não pequenas células e já foram identificados neste subtipo de cancro do pulmão outros potenciais alvos terapêuticos (Roh & Ph, 2014).

EGFR como alvo terapêutico

O EGFR é uma glicoproteína transmembranar, que desempenha um papel importante na carcinogénese (Lamelas *et al*, 2012). Este recetor é também um componente crucial de ativação da via de sinalização, que inclui as vias Ras-Raf-Mek e PI3K-Akt-mTOR (Villaruz & Socinski, 2012; Liu *et al*, 2014; Qu *et al*, 2014).

O EGFR é um dos 4 membros de uma família de proteínas tirosina cinase e por isso, têm uma resposta de cerca de 70% aos inibidores da tirosina cinase (TKI, do inglês *tyrosine kinase inhibitors*) (Roh & Ph, 2014).

No cancro do pulmão de não pequenas células, o EGFR tem demonstrado desregulação através de vários mecanismos, incluindo a sua sobre-expressão e amplificação e parece ter uma incidência mais elevada em não fumadores e em mulheres (West *et al*, 2012).

Os EGFR-TKI são uma classe de medicamentos bem tolerados pelo organismo, apesar de estar descrita alguma toxicidade que se traduz por efeitos ligeiros a moderados, a nível dermatológico e gastrointestinal (Antonicelli *et al*, 2013; Asami

& Atagi, 2014). Atualmente, os fármacos mais usados são o gefitinib (Chen *et al*, 2014b) e o erlotinib. Ambos são capazes de inibir a atividade catalítica do recetor (inibindo autofosforilação), interromper a transdução do sinal de crescimento e obter, deste modo, um efeito antitumoral (Varella-garcia, 2009; Lamelas *et al*, 2012). Num estudo, realizado na Ásia e na Europa, ambos os fármacos demonstraram um espectro de atividade muito semelhante, se bem que com diferenças ao nível, da farmacocinética e da biodisponibilidade. Neste contexto, o erlotinib apresentou uma maior biodisponibilidade (Antonicelli *et al*, 2013).

Outra das estratégias para inibir a atividade do EGFR é o uso de anticorpos monoclonais, que bloqueiam a ligação do ligando ao recetor, como o cetuximab ou o panitumumab (Planchard, 2013). Este tipo de terapêutica não inibe a autofosforilação do domínio da tirosina-cinase através da ativação constitutiva. Por isso, estas mutações podem ainda ativar outras vias, que regulam a progressão do ciclo celular, crescimento celular e angiogénese (Cheng *et al*, 2012; Chen *et al*, 2014a).

VEGFR como alvo terapêutico

O recetor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR, do inglês *vascular endothelial growth factor receptor*) é o principal mediador da angiogénese e uma elevada expressão deste fator tem sido associada a tumores em estádios avançados, sendo os seus níveis significativamente mais elevados no adenocarcinoma do que no carcinoma de células escamosas (Heuvers *et al*, 2012). A família do VEGF é constituída por diferentes proteínas denominadas, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentar (PGF, do inglês *placenta growth factor*) (Lamelas *et al*, 2012). O VEGF-A é o membro mais importante visto que é o principal responsável pelos mecanismos fisiológicos e patológicos da angiogénese e normalmente atua através da ligação ao VEGFR-2, gerando uma cascata de sinalização. Esta cascata leva à ativação dos fatores de transcrição no núcleo e, conseqüentemente, à formação de um novo vaso (Mello *et al*, 2012). Usualmente as células tumorais utilizam esta via para promover a sobrevivência e proliferação (West *et al*, 2012).

Este fator tem como funções, aumentar a mitose das células endoteliais,

controlar a permeabilidade vascular e, conseqüentemente, a sobrevivência do endotélio, capacidades que são ativadas pela ligação do VEGF aos seus recetores (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3) (Lamelas *et al*, 2012; West *et al*, 2012).

O VEGF é um alvo molecular importante para o desenvolvimento de terapêuticas dirigidas. O bevacizumab é um anticorpo monoclonal, que se liga ao VEGF-A e é capaz de neutralizar todas as suas isoformas. Observou-se que o tratamento com o bevacizumab aumenta o risco de hemorragia, especialmente em tumores localizados na proximidade de grandes vasos, no carcinoma de células escamosas (Lamelas *et al*, 2012; West *et al*, 2012).

Outro esquema de tratamento, que passa pela dupla inibição do EGFR e do VEGF, apresenta duas estratégias. A primeira é a combinação de dois fármacos anti-alvos específicos, como o erlotinib e o bevacizumab, e a segunda é o uso de um agente com dupla atividade, o vandetanib, que é uma molécula pequena com atividade contra o VEGFR-2, -3 e anti-EGFR (Lamelas *et al*, 2012; Pinho *et al*, 2015).

ALK como alvo terapêutico

A ALK é um membro da família dos recetores de tirosina cinase, pertencente à da superfamília da insulina, que é normalmente expresso no sistema nervoso central, intestino delgado e testículos (Planchard, 2013; Shaw *et al*, 2014).

Em alguns doentes com cancro do pulmão de não pequenas células ocorre a fusão EML4-ALK, que é formada a partir de uma inversão, no braço do cromossoma 2, que agrupa o intrão 13 do EML4 ao intrão 19 do ALK, que gera uma fusão oncogénica que codifica uma proteína constitutivamente ativada (Cheng *et al*, 2012). O oncogene EML4-AL é o resultado final desta fusão e é capaz de inibir a apoptose, e favorecer assim a proliferação do tumor (Nishino, Mizuki; Jagannathan, Jyothi P; Krajewski, Katherine M; O'Regan, Kevin; Hatabu, Hiroto; Shapiro, Geoffrey; Ramaiya, 2012). Este marcador é mais frequente em doentes jovens, não fumadores ou fumadores recentes e em doentes com adenocarcinoma (Lamelas *et al*, 2012; Kobayashi & Hagiwara, 2013). Esta translocação é normalmente exclusiva de mutações do EGFR ou do KRAS, e está também associada com a resistência aos EGFR-TKI (Planchard, 2013).

O crizotinib foi aprovado para o tratamento em doentes com mutações no ALK

e verificou-se que era significativamente mais efetivo do que a quimioterapia convencional. No entanto, uma minoria de doentes com cancro do pulmão de não pequenas células, que apresentavam a mutação EML4-ALK, não teve resposta de tratamento com crizotinib pelo que se pensa que estas alterações se devam a mutações no domínio ALK (Moreira & Thornton, 2012). O ceritinib, um inibidor da ALK, foi aprovado em abril de 2014 pela *Food and Drug Administration* (FDA), para o tratamento em doentes com cancro do pulmão de não pequenas células com resistência ao crizotinib (Mortaza *et al*, 2015; Pinho *et al*, 2015).

BRAF como alvo terapêutico

O *BRAF* codifica uma proteína serina/treonina cinase importante na via de sinalização do KRAS, que ativa funções celulares importantes, como a proliferação e a sobrevivência celular (Shackelford *et al*, 2014). O B-RAF faz parte da família RAF cinase que inclui três membros: o A-RAF, o B-RAF e o RAF-1, também designado c-RAF. Tanto o gene *KRAS* como o *BRAF* fazem parte da cascata de sinalização da família de proteínas EGFR (Planchard, 2013).

As mutações do *BRAF* podem ser encontradas em cerca de 1% a 3% dos cancros do pulmão, maioritariamente nos adenocarcinomas. As mutações do *EGFR* e do *KRAS* tendem a estar associadas a uma fraca resposta à terapêutica com EGFR-TKI (Cheng *et al*, 2012).

Alguns inibidores específicos do BRAF foram aprovados pela FDA, como o vemurafenib e o dabrafenib, que atuam a nível de mutações específicas do *BRAF-V600E*, no entanto apenas 40% a 50% dos doentes com mutação do *BRAF* possuem esta mutação (Forde & Ettinger, 2014; Okimoto & Bivona, 2014; Pinho *et al*, 2015).

RAS como alvo terapêutico

As proteínas homólogas do oncogene viral do sarcoma de rato (RAS, do inglês *rat sarcoma viral oncogene homolog*) ou *p21ras* pertencem à superfamília guanosina-trifosfatase, onde os três membros mais conhecidos são o oncogene viral homólogo de sarcoma de Kirsten (KRAS, do inglês *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), o oncogene viral homólogo do sarcoma de rato de Harvey (HRAS, do

inglês *Harvey rat sarcoma viral oncogene*) e o homólogo do oncogene viral RAS homólogo do neuroblastoma (NRAS, do inglês *neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog*) (Raparia *et al*, 2013).

O KRAS é uma GTPase frequentemente posicionada na membrana celular e que é ativada por recetores transmembranares de fatores de crescimento, como o EGFR, o HER2, o ALK, o fator de transição mesenquimal epitelial (c-MET, do inglês *mesenchymal epithelial transition factor*) e o FGFR (do inglês, *fibroblast growth factor receptor*) (Dienstmann *et al*, 2011). A presença de mutações pontuais que determinam a alteração de alguns aminoácidos compromete a atividade da GTPase e resultam na ativação constitutiva das cascatas de sinalização a jusante. Estas mutações são encontradas entre 20% a 30% dos adenocarcinomas do pulmão e normalmente existem em conjunto com mutações noutros genes (Girard, 2013).

Normalmente o KRAS é inativado, depois da conversão de guanosina trifosfato (GTP, do inglês *guanosine-5'-triphosphate*) para guanosina difosfato (GDP, do inglês *guanosine-5'-diphosphate*), com consequências na regulação da proliferação e do crescimento celular. As mutações no gene *KRAS* resultam numa constante conversão de GTP em GDP, o que leva a um crescimento e a proliferação celular descontrolada das células tumorais (Mortaza *et al*, 2015).

Ainda não existe terapia dirigida efetiva aprovada para mutações no gene KRAS, devido à perda da função enzimática normal do RAS (Kerr, 2012; Pinho *et al*, 2015).

c-MET como alvo terapêutico

O c-MET é um proto-oncogene localizado no cromossoma 7q21, que codifica um recetor transmembranar tirosina cinase, o fator de crescimento do hepatócito (HGFR, do inglês *hepatocyte growth factor*) (Kim *et al*, 2013; Planchard, 2013). O aumento da expressão do c-MET significa resistência adquirida aos EGFR-TKI e cerca de 20% dos doentes resistentes, apresentam uma amplificação do c-MET (Dacic, 2011; Früh, 2011; Mortaza *et al*, 2015).

Já existem alguns inibidores do c-MET, como o cabozatinib que foram aprovados pela FDA para o tratamento de alguns cancros específicos, mas ainda não existem dados clínicos da eficácia do cabozatinib em doentes com cancro do pulmão de não pequenas células (Mortaza *et al*, 2015; Pinho *et al*, 2015).

As mudanças genéticas que ocorrem nas células tumorais determinam a desregulação oncogénica de genes supressores do tumor, bem como, a sobre-expressão ou a ativação de genes que promovem a progressão do cancro. As alterações estruturais nos recetores da tirosina-cinase, causadas pelas alterações génicas, levam à proliferação das células cancerígenas criando assim oportunidades para uma terapêutica dirigida.

Assim, as terapias como por exemplo o EGFR-TKI e os inibidores da ALK providenciaram um novo tipo de tratamento para doentes diagnosticados com adenocarcinoma do pulmão. No entanto a resistência à terapêutica dirigida continua a ser um grande obstáculo a resultados clínicos satisfatórios. Torna-se então necessário, identificar outras alterações moleculares específicas que contribuam para uma melhor resposta à terapêutica.

Radioterapia no tratamento do cancro do pulmão

A radioterapia é uma das terapêuticas mais importantes no tratamento do cancro pois contribui para o controlo dos sinais e sintomas. A radioterapia é eficaz sempre que exista dor devido a massa torácica, presença de metástases ósseas ou compressão nervosa. Pode também desempenhar um papel importante quando o doente apresenta hemoptise, tosse e dispneia devido à obstrução das vias aéreas, ou sinais correspondentes à síndrome da veia cava. Quando o doente apresenta risco ou mesmo fraturas patológicas, a radioterapia após a estabilização cirúrgica, deve ser tida em consideração (D'Addario *et al*, 2010).

O recurso à radioterapia tem apresentado um aumento nos últimos anos. Este aumento da sua utilização deve-se não só à melhoria técnica dos equipamentos, mas também à generalização dos mesmos e ao grande desenvolvimento da imagem médica, em particular a vulgarização dos sistemas de imagem tridimensionais. Com estes avanços, hoje em dia, é possível segmentar a lesão oncogénica com grande precisão e depositar localmente elevadas doses de radiação. Como consequência ocorre uma melhor taxa de controlo do tumor o que faz com que a radioterapia comece a surgir como uma alternativa à cirurgia em alguns estádios do cancro do

pulmão, nomeadamente nos estádios I e II. Howington et al. propõem que doentes com cancro do pulmão de não pequenas células nestes estádios e com baixo risco cirúrgico, a ressecção cirúrgica deverá ser o tratamento de primeira linha. No entanto, devido à maior utilização da tomografia computadorizada, muitos cancros de pulmão começam a ser detetados pequenos ou surgem principalmente como lesões opacas. Assim, o tratamento por ressecção sublobar bem como as abordagens não-cirúrgicas, como a SBRT/SABR começam a ser exploradas como opção (Ikushima, 2010; Howington et al, 2013a).

A radioterapia poderá ser uma abordagem terapêutica em quase todos os estádios de desenvolvimento do cancro do pulmão, nomeadamente no cancro do pulmão de não pequenas células. No estágio I, poderá revelar-se uma opção terapêutica alternativa à cirurgia, enquanto nos restantes estádios (II, IIIA, IIIB e IV) é usada em protocolos combinados com a cirurgia e com a quimioterapia (Howington et al, 2013a; Leone et al, 2013).

A radioterapia desempenha um papel fundamental nos estádios mais avançados, sendo recomendada para tratamento paliativo ou para prevenir e atenuar sintomas como a dor, a hemorragia ou a obstrução local. Poderá ainda ser uma terapia local definitiva para metástases isoladas ou em pequeno número (oligometástases), incluindo localizações no cérebro, no pulmão, e nas glândulas suprarrenais, permitindo um aumento da sobrevivência numa pequena percentagem de doentes bom performance status, que previamente foram submetidos a terapia radical para a doença intratorácica. A radioterapia revela-se importante no caso da existência de oligometástases, particularmente a SABR, caso se possa realizar com segurança nos locais envolvidos (Leone et al, 2013; Panel-Chair, 2015). Infelizmente, a radiorresistência tumoral, independentemente de ser ou não intrínseca é usual, revelando-se um dos maiores obstáculos à eficácia terapêutica (Sato et al, 2007).

Embora o cancro do pulmão seja um dos cancros mais prevalentes entre todos os cancros, as guidelines oficiais para a utilização da radiação são constantemente revistas e atualizadas, pois dependem das características do tumor, do número e da localização de nódulos linfáticos afetados e da existência ou não de metástases (Jeremic, 2005; Stewart, 2012; Hubers et al, 2013).

As diretrizes de tratamento são diferentes para o cancro do pulmão de não pequenas células e para o cancro do pulmão de pequenas células. A radioterapia tem um papel potencial em todas as fases do cancro do pulmão de não pequenas células, estando neste momento decorrer estudos em estágio I e II com SBRT, em que a radioterapia é uma opção como terapia radical ou paliativa (Howington et al, 2013b).

No cancro do pulmão de não pequenas células, apesar de ser o tipo mais comum de cancro do pulmão, apenas 15% a 20% dos casos são potencialmente curáveis. Nestes casos a radioterapia radical é recomendada, mas o prognóstico continua pouco satisfatório, com taxas de sobrevivência a 5 anos diminutas. De acordo com as diretrizes do Reino Unido, a partir de 2006, há três principais esquemas modalidades de radioterapia com intenções curativas: a radioterapia convencional, a radioterapia hipofracionada e a CHART (Jassem, 2007).

Na radioterapia hipofracionada é administrada uma dose entre 52,5 Gy e 55 Gy em vinte frações diárias durante quatro semanas, com ou sem quimioterapia. Na radioterapia convencional, uma dose que varia 60 Gy a 66 Gy é administrada em frações de 2 Gy durante seis semanas e meia, realizando-se, normalmente, com quimioterapia concomitante. Na opção CHART é administrada mais do que uma fração por dia, com uma dose cumulativa de 54 Gy em trinta e seis frações. Cada fração é aplicada três vezes por dia durante doze dias em regime de hospitalização, por forma a completar as trinta e seis frações (Stewart, 2012; Panel-Chair, 2015).

A radioterapia paliativa no cancro do pulmão de não pequenas células é utilizada sempre que existam doenças específicas tais como doença obstrutiva, síndrome da veia cava superior, pneumonia obstrutiva, presença de metástases ósseas, com ou sem massa de tecidos moles, presença de metástases cerebrais, presença de doença torácica sintomática ou qualquer metástase em doentes com mau performance status, correspondendo por norma a estádios tardios da doença (Stewart, 2012; Leone et al, 2013; Panel-Chair, 2015).

Para esta abordagem terapêutica, os doentes são divididos em dois grupos de acordo com o performance status. Para os doentes com um performance status pobre, de forma a obter um tratamento paliativo eficaz, sugere-se uma dose única de 10 Gy. Em doentes com um performance status bom ou médio, sugere-se uma

dose de 39 Gy, distribuída por treze sessões com proteção medular ou, em alternativa, 20 Gy em frações de cinco, sendo este um dos protocolos recomendados (Darlison, 2009; Baldwin *et al*, 2011; NICE Clinical Guideline 121, 2011; Huang *et al*, 2013).

Atualmente, e de acordo com as diretrizes do *National Comprehensive Cancer Network*, num estágio inicial do cancro do pulmão de não pequenas células (estádio I), a SABR/SBRT é recomendada para doentes que são inoperáveis ou que recusam a cirurgia após avaliação. Para cancro do pulmão de não pequenas células localmente avançado (estádios II-III) e em doentes inoperáveis, o padrão é a radioterapia concomitante com quimioterapia (Panel-Chair, 2015).

Em doentes com gânglios linfáticos negativos e em estágio inicial da doença, a radioterapia estereotáxica ablativa poderá ser uma opção terapêutica, normalmente com regimes intensivos de entrega de dose biologicamente eficaz com doses de 100 Gy ou superiores. Este tipo de regimes estão, por norma, associados a um melhor controlo local da doença e a sobrevivência significativa do que regimes menos intensivos. Para tumores localizados centralmente, bem delimitados e a 2 cm da árvore brônquica proximal, os regimes de radioterapia estereotáxica ablativa que incluem de quatro a dez frações parecem ser eficazes e seguros em comparação com os regimes que entregam doses de 54 Gy a 60 Gy em três frações, considerando-se esta abordagem com mais riscos pelo que deverá ser evitada (Eberhard *et al*, 2005; Panel-Chair, 2015).

As doses mais comumente prescritas na radioterapia radical em doentes em estádios localmente avançados variam de 60 Gy a 70 Gy, administradas em frações de 2 Gy (radioterapia fracionada convencional) (Rivera & Mehta, 2007; Ikushima, 2010). Os regimes que comportam um aumento da dose na radioterapia isolada, assim como a, quimioterapia associada a radioterapia sequencial ou simultânea estão associados a uma melhor sobrevivência. Doses até 74 Gy com quimioterapia concomitante poderão ser utilizadas com segurança, desde que as normais restrições dose/tecido sejam respeitadas (Rivera & Mehta, 2007).

As doses de 45 Gy a 50 Gy, com entrega de 1,8 Gy a 2 Gy por fração, são doses de pré-operatório normais enquanto no pós-operatório as doses padrão de radioterapia, após a ressecção completa, variam de 50 Gy a 54 Gy, igualmente em

frações de 1,8 Gy a 2 Gy. Na Tabela 3 podemos observar um resumo das doses mais utilizados bem como dos tipos de combinações de tratamentos com radioterapia para cancro do pulmão de não pequenas células (Panel-Chair, 2015).

No cancro do pulmão de pequenas células as características histológicas não são as mesmas do cancro do pulmão de não pequenas células. Os doentes com esta patologia geralmente fazem ciclos de quimioterapia como tratamento de primeira linha. A radioterapia neste tipo de cancro do pulmão é normalmente aplicada depois ou simultaneamente com a quimioterapia, de acordo com a *performance status* do doente e, quando há resposta à quimioterapia. Nestas circunstâncias, a dose de radioterapia deveram ser frações diárias de 1,5 Gy até obter uma dose total de 45 Gy, ou de 1,8 Gy a 2,0 Gy até uma dose total de 60 Gy a 70 Gy. Recomenda-se ainda a irradiação craniana, como ação profilática, com uma dose de 25 Gy administrada em frações de 10 Gy ou, em alternativa, 30 Gy em frações de 10 Gy a 15 Gy, com a finalidade de reduzir a probabilidade de metástases cerebrais, como podemos observar na Figura 8 (Demetri *et al*, 2010; Früh *et al*, 2013).

Tabela 3: Combinações de tratamentos, radioterapia fracionada convencional no tratamento do cancro do pulmão de não pequenas células.

Tipo de tratamento	Dose Total	Fração	Duração do tratamento
Radioterapia radical com ou sem quimioterapia	60-70 Gy	2 Gy	6-7 semanas
Radioterapia Pré-operatório	45-50 Gy	1,8-2 Gy	5 semanas
Radioterapia Pós-operatório			
Margens negativas	50-54 Gy	1,8-2 Gy	5-6 semanas
Extensão nodal extracapsular ou margens positivas microscópicas	54-60 Gy	1,8-2 Gy	6 semanas
Tumor residual	60-70 Gy	2 Gy	6-7 semanas
Radioterapia paliativa			
Doença obstrutiva (Síndrome da veia cava superior ou pneumonia obstrutiva)	30-45 Gy	3 Gy	2-3 semanas
Metástases ósseas com massa em tecidos moles	20-30 Gy	4-3 Gy	1-2 semanas
Metástases ósseas sem massas de tecidos moles	8-30 Gy	8-3 Gy	1 dia-2 semanas
Metástases Cerebrais	CNS GLs	CNS GLs	SNC GLs
Doença torácica sintomática em doentes com má PS	17 Gy	8,5 Gy	1-2 semanas
Qualquer metástase em doentes com PS fraca	8-20 Gy	8-4 Gy	1 dia-1 semanas

SNC-GLs: Sistema Nervoso Central – guidelines; PS: Performance status. Adaptado de NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Guideline Non-Smal cell lung cancer Version 7.2015.

Para os doentes com cancro do pulmão de pequenas células em estádios III e IV a radioterapia torácica consolidativa tem-se revelado benéfica, nomeadamente dentro do grupo de doentes que respondem positivamente ao tratamento com quimioterapia. Estudos demonstraram que radioterapia torácica consolidativa é bem tolerada, está associada a menos recorrências sintomáticas no tórax e a aumento da sobrevivência a longo prazo em alguns doentes (Yee *et al*, 2012). As restrições à dose estão diretamente relacionadas com os tecidos irradiados, na dependência do tamanho e da localização do tumor, e as doses prescritas são similares às utilizadas no cancro do pulmão de não pequenas células.

Em doentes em estágio limitado do cancro do pulmão de pequenas células que apresentem uma boa resposta à terapêutica inicial, a irradiação craniana profilática contribui para diminuir as metástases cerebrais, com aumento da sobrevivência global (Arriagada *et al*, 2002; Slotman *et al*, 2015). Nos doentes em estágio III e IV de cancro do pulmão de pequenas células, que respondem à quimioterapia, a irradiação craniana profilática diminui igualmente as metástases cerebrais. No entanto, um estudo randomizado conduzido pela EORTC (do inglês, *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*), apresentou uma melhoria da sobrevivência global após irradiação craniana profilática (Slotman *et al*, 2007). Por oposição, um estudo realizado no Japão, igualmente randomizado, não observou qualquer melhoria na sobrevivência global nos doentes com este tipo de cancro de pulmão (Panel-Chair, 2015). Para os doentes que não receberam irradiação craniana profilática recomenda-se vigilância por imagiologia cerebral para pesquisa de metástases (Panel-Chair, 2015).

A dose preferida para a irradiação craniana profilática é de 25 Gy em 10 frações diárias. Um curso mais curto (por exemplo, 20 Gy em frações de 5Gy) poderá ser apropriado em doentes selecionados, com a doença em estágio III e IV. Um estudo randomizado em que os doentes receberam uma dose de 36 Gy apresentou maior mortalidade e maior neurotoxicidade crónica em comparação com os doentes tratados com apenas 25 Gy (Le Péchoux *et al*, 2009; Wolfson *et al*, 2011).

O aumento da idade e a utilização de doses mais elevadas são os fatores que mais contribuem para o desenvolvimento de neurotoxicidade crónica. Um estudo, conduzido por Wolfson *et al*. Mostrou que 83% dos doentes com mais de 60 anos de

idade apresentaram neurotoxicidade crónica 12 meses após a irradiação craniana profilática *versus* 56% dos doentes com menos de 60 anos de idade ($p=0,009$) (Wolfson *et al*, 2011). O recurso à quimioterapia concomitante e à alta dose total de radioterapia (> 30 Gy) deve ser evitado em doentes que receberam irradiação craniana profilática (Panel-Chair, 2015).

O recurso à irradiação craniana profilática após resolução da toxicidade aguda com origem na terapia inicial, não é recomendado em doentes com baixo *performance status* baixo ou com alterações das funções neurocognitivas (Panel-Chair, 2015).

As metástases cerebrais deverão ser tratadas recorrendo à irradiação do cérebro total ao invés de radioterapia estereotáxica/radiocirurgia apenas, pois este grupo de doentes tende a apresentar múltiplas metástases no sistema nervoso central. Para um grupo de doentes selecionados que desenvolvam metástases cerebrais após a irradiação craniana profilática, a repetição de terapia de irradiação craniana total pode ser novamente considerada (Stahel *et al*, 2011; Son *et al*, 2012). A dose recomendada para a irradiação craniana total é de 30 Gy em 10 frações diárias (Panel-Chair, 2015).

A radioterapia estereotáxica/radiocirurgia poderá igualmente ser uma opção terapêutica, especialmente se já tenha decorrido um longo período entre o diagnóstico inicial e o aparecimento de metástases cerebrais e se concomitantemente não exista doença extracraniana (Stahel *et al*, 2011; Son *et al*, 2012).

LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B

Dados epidemiológicos

O linfoma difuso de grandes células B é reconhecido como um grupo heterogêneo de doenças hematológicas malignas, que constituem coletivamente o tipo mais comum e agressivo de linfoma não-Hodgkin (Ba, 2013). Esta patologia constitui cerca de 25% a 40% de todos os diagnósticos de linfoma não-Hodgkin. Ao longo das últimas décadas, a incidência desta neoplasia tem vindo a aumentar cerca de 3% a 4% ao ano (Morton *et al*, 2006; Ng, 2007; Persky & Miller, 2009; Campo *et al*, 2011; Ba, 2013).

O linfoma difuso de grandes células B constitui entre 30% a 58% de todos os tipos de linfoma, sendo a sua incidência na União Europeia de 3 a 4 pessoas por 100.000 por ano. A incidência na faixa etária dos 35 aos 39 anos é de 0,3 por 100.000 pessoas por ano enquanto para os indivíduos entre os 80 e os 84 anos é de 26,6 por 100.000 pessoas por ano. Nos Estados Unidos são diagnosticados aproximadamente 20.000 doentes com este tipo de linfoma por ano (Tilly *et al*, 2012).

No momento do diagnóstico, cerca de 25% a 50% dos doentes com linfoma difuso de grandes células B encontra-se nos estádios I ou II (Ng, 2007; Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, 2008; Persky & Miller, 2009; Campo *et al*, 2011).

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

Fatores prognósticos clínicos

O estadiamento do linfoma difuso de grandes células B é estabelecido de acordo com o sistema de *Ann Arbor*, descrito na Tabela 4. O prognóstico é estabelecido de

modo ajustado à idade de acordo com o Índice Internacional de Prognóstico (IPI, do inglês *International Prognostic Index*) (Shipp *et al*, 1993).

No diagnóstico são consideradas cinco características de prognóstico negativo, nomeadamente, a idade superior a 60 anos, a doença no estágio III/IV, os níveis séricos elevados de desidrogenase láctica, o *Eastern Cooperative Oncology Group performance status* superior ou igual a 2 ou superior a 1 e a doença local extranodal.

O Índice Internacional de Prognóstico categoriza os doentes em quatro grupos de risco em que a sobrevivência global aos 5 anos varia entre os 26% e os 73%. O Índice Internacional de Prognóstico foi reavaliado em doentes tratados com rituximab (anticorpo monoclonal quimérico contra a proteína *cluster of differentiation (CD)-20*) e comprovou-se a sua utilidade no prognóstico (Sehn *et al*, 2007; Ziepert *et al*, 2010). No entanto, este Índice apresenta uma baixa capacidade para identificar doentes de alto risco, porque todas as categorias de prognóstico têm uma probabilidade de cura superior ou igual a 50% quando tratados com rituximab associado a ciclofosfamida, a doxorubicina, a vincristina e a prednisolona (esquema R-CHOP, do inglês *rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone*). Recentemente, foi proposto um Índice Internacional de Prognóstico atualizado que considera os dados do *National Comprehensive Cancer Network – International Prognostic Index (NCCN-IPI)* e que foi validado numa população de doentes tratados na Columbia Britânica, Canadá (Zhou *et al*, 2014).

O *NCCN-IPI* incorpora as cinco variáveis previamente utilizadas, embora com refinamento da estratificação pela idade, com a normalização da desidrogenase láctica e com a identificação do envolvimento extraganglionar da medula óssea, do sistema nervoso central, do fígado, do trato gastrointestinal ou pulmonar como parâmetros negativos, em vez do número de locais extraganglionares. Comparado com o Índice Internacional de Prognóstico, o *NCCN-IPI* revelou-se mais eficaz a discriminar um grupo de alto risco com sobrevivência global aos 5 anos de 33% que, no entanto, representou apenas 8% a 14% dos doentes. Foram identificados ainda outros fatores clínicos que poderão igualmente contribuir para um pior resultado após tratamento com rituximab, como o diâmetro máximo do tumor ser de 10 cm, o doente pertencer ao género masculino, haver envolvimento da medula óssea com

Tabela 4: Estadiamento do linfoma difuso de grandes células B segundo *Ann Arbor*.

Estádio I	Envolvimento de uma única região linfática (I) ou envolvimento localizado de órgão extralinfático único ou local
Estádio II	Envolvimento de duas ou mais regiões linfáticas do mesmo lado do diafragma (II) ou envolvimento localizado de um único órgão extralinfático ou local e de uma ou mais regiões linfáticas do mesmo lado do diafragma (IIE)
Estádio III	Envolvimento das regiões linfáticas em ambos os lados do diafragma.
Estádio IV	Envolvimento difuso vs. disseminado de um ou mais órgãos extralinfáticos com ou sem envolvimento linfático
A	Ausência de sintomas B
B	Presença de sintomas B: Perda de peso, mais de 10% do peso corporal durante os 6 meses anteriores, febre > 38°C, sudorese noturna
E	Disseminação extranodal de células tumorais
S	Envolvimento do baço
X	Doença <i>Bulky</i> (massa de glânglios > 10cm de diâmetro ou que ocupa mais de 1/3 do mediastino)
M	Envolvimento da medula óssea
O	Envolvimento do tecido ósseo
D	Envolvimento da pele
L	Envolvimento dos pulmões
H	Envolvimento do fígado
P	Envolvimento da pleura

Adaptado de Rosenberg 1977; National Cancer Institute 2015.

linfoma de células grandes, mas não discordante de pequenas células, elevados níveis de cadeias leves livres no soro, baixa contagem absoluta de linfócitos e de monócitos e deficiência de vitamina D (Pfreundschuh *et al*, 2008a; Drake *et al*, 2010; Maurer *et al*, 2011; Sehn *et al*, 2011; Wilcox *et al*, 2011; Carson *et al*, 2012; Müller *et al*, 2012; Porrata *et al*, 2014; Zhou *et al*, 2014).

O aumento do índice de massa corporal tem sido relatado como um fator prognóstico favorável, embora não tenha sido confirmado em todos os estudos (Carson *et al*, 2012; Hong *et al*, 2014).

Embora os fatores clínicos pareçam ser bons substitutos para as diferenças biológicas subjacentes entre os doentes, até à data o Índice Internacional de Prognóstico não foi substituído por qualquer marcador biológico. A incorporação de fatores clínicos adicionais e moleculares em futuros índices prognósticos poderá

permitir uma mais ampla diferenciação do resultado (Sehn & Gascoyne, 2014).

Caraterização e tipos

A classificação da Organização Mundial de Saúde de 2008 referente às neoplasias linfóides admite a heterogeneidade do linfoma difuso de grandes células B, ao reconhecer uma categoria ampla denominada linfoma difuso de grandes células B não especificado, bem como uma variedade de subtipos e "outros linfomas de grandes células B" que foram identificadas, devido às suas características clínicas e patológicas únicas (Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, 2008; Sabbatini et al, 2010; Campo et al, 2011). Apesar desta organização, com a exceção do linfoma primário no sistema nervoso central, a maioria dos doentes continua a receber tratamento igual independentemente do subtipo de linfoma diagnosticado (Sehn & Gascoyne, 2014).

A capacidade de identificar diferenças biológicas, poderá revelar-se crucial para permitir o recurso a terapias individualizadas em doentes que frequentemente apresentam tumores morfológicamente indistinguíveis (Sehn & Gascoyne, 2014).

Origem celular do linfoma difuso de grandes células B

Os linfomas difusos de grandes células B não especificados foram subdivididos, segundo perfis de expressão génica, em subtipo do centro germinativo de célula B, em subtipo de células B ativadas, e em subtipo sem classificação. Este subtipo representa 15%, e parece dever-se a diferentes estádios de diferenciação linfoide (Alizadeh et al, 2000; Rosenwald et al, 2002).

A distinção molecular tem implicações no prognóstico, uma vez que o linfoma difuso de grandes células B, subtipo de células B ativadas apresenta, por norma, um pior resultado do que o linfoma difuso de grandes células B, do subtipo centro germinativo de célula B. De facto, este último, 3 anos após terapia com R-CHOP, 75% dos doentes apresentam sobrevivência livre de progressão de doença versus 40% no caso do primeiro ($p < 0,001$) (Lenz et al, 2008b). De salientar ainda o facto de, para além de representarem diferentes subtipos moleculares de linfomas, estes

representam igualmente ativação de diferentes vias de sinalização oncogénica intracelulares, o que poderá futuramente vir a ser explorado com o propósito de melhorar o resultado da terapêutica (Davis *et al*, 2010; Shaffer *et al*, 2012; Pasqualucci, 2013; Roschewski *et al*, 2014).

Linfoma difuso de grandes células B subtipo centro germinativo de células B

A origem do linfoma difuso de grandes células B, subtipo centro germinativo de células B, parece residir nas células linfoides do centro germinativo, ou seja, nas células que expressam genes normalmente detetados nos centros germinais de células B, tais como o *Neprilysin*, o *LMO2* (do inglês, *homeodomain proteins Lin11, Isl-1 and Mec-3 Domain Only 2*) e a proteína 6 transcricional de linfoma de células B (*BCL-6*, do inglês *transcricional B-cell lymphoma 6 protein*) (Alizadeh *et al*, 2000; Rosenwald *et al*, 2002).

Cerca de 30% a 40% dos linfomas difusos de grandes células B, subtipo centro germinativo de células B, apresentam uma translocação t(14;18), 30% apresentam uma amplificação do gene c-REL, 20% apresentam mutações do gene intensificador do homólogo de zeste 2 (*EZH2*, do inglês *enhancer of zeste homolog 2*) e 10% têm uma deleção do gene homólogo da fosfatase e da tensina (*PTEN*, do inglês *phosphatase and tensin homolog*), alterações que nunca foram detetadas no linfoma difuso de grandes células B subtipo células B ativadas (Sehn & Gascoyne, 2014).

A *EZH2* é um regulador principal do fenótipo do subtipo centro germinativo de células B e coopera com a *BCL-6* para mediar a génese de linfomas, particularmente no subtipo do centro germinativo de células B (Béguelin *et al*, 2013; Caganova *et al*, 2013). A mutação somática pontual no exão 15 do gene de *EZH2*, que resulta na substituição de uma única tirosina (Tyr461), conduz a um ganho de função e aumento da metilação de histona 3, o que parece promover o silenciamento transcricional de vários genes reguladores-chave na génese do linfoma e constitui uma mutação recorrente nesta patologia (Morin *et al*, 2010; Sneeringer *et al*, 2010; Béguelin *et al*, 2013). Tanto o gene *BCL-6* como o gene *EZH2* podem representar

alvos seletivos importantes para o tratamento do linfoma difuso de grandes células B do subtipo centro germinativo. Por esse motivo, desde 2010 estão decorrer alguns estudos com potenciais agentes terapêuticos (Cerchiatti *et al*, 2010; McCabe *et al*, 2012).

A ativação da via do fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K, do inglês *phosphatidylinositol-3-kinase*), da proteína cinase B (AKT, do inglês *protein kinase B*) e da proteína-alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR, do inglês *mammalian target of rapamycin*) é fundamental para o crescimento e metabolismo celular. Foi demonstrado que esta via se encontra ativada num largo espectro de linfomas de grandes células B, incluindo o subtipo centro germinativo de células B (Pfeifer *et al*, 2013). Embora a deleção do gene *PTEN*, um gene supressor tumoral que afeta a via PI3K/AKT/mTOR, tenha sido detetada em cerca de 10% dos linfomas difusos de grandes células B do subtipo centro germinativo de células B, a perda de expressão de *PTEN* foi observada, por imunohistoquímica, em aproximadamente 55% dos casos. Por outro lado, apenas foi detetado em 14% dos casos de linfoma de grandes células B, de não-centro germinativo de células B (Pfeifer *et al*, 2013).

A sobre expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2 pode ser observada em ambos os subtipos de linfoma difuso de grandes células B, o subtipo centro germinativo de células B ou o subtipo células B ativadas, embora, devido a mecanismos muito distintos. No primeiro caso, esta sobre-expressão acontece em grande parte devido à presença da translocação t (14;18), enquanto no segundo, outros mecanismos, como a sobre regulação transcricional e amplificação do gene, parecem ser os predominantes (Lenz *et al*, 2008c).

Após o tratamento com R-CHOP, o impacto negativo no prognóstico devido à sobre-expressão BCL-2 parece afetar somente os linfomas difusos de grandes células B do subtipo centro germinativo de células B, possivelmente devido à regulação negativa do gene *fator nuclear cadeia-leve-kappa potenciador de células B ativadas* (NF- κ B, do inglês *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Iqbal *et al*, 2011). O recurso a inibidores da BCL-2 poderá revelar-se uma terapia promissora no tratamento do linfoma difuso de grandes células B, mas tendo por base o previamente mencionado, poderá ser especialmente benéfico no subtipo centro germinativo de células B (Souers *et al*, 2013).

Linfoma difuso de grandes células B subtipo células B ativadas

O linfoma difuso de grandes células B do subtipo células B ativadas parece ser derivado de células B num estágio plasmablastico, pouco antes da saída do centro germinativo e, portanto, a expressar genes que são frequentemente expressos em células plasmáticas maduras (Alizadeh *et al*, 2000; Rosenwald *et al*, 2002).

Um dos marcos de patogenicidade do linfoma difuso de grandes células B do subtipo células B ativadas, é a ativação constitutiva da via de sinalização do NF- κ B, que promove a sobrevivência celular, a proliferação e a inibição da apoptose (Davis *et al*. 2010). A ativação constitutiva ocorre principalmente devido à ativação do complexo de sinalização CBM, formado por domínio de recrutamento de caspases 11 (CARD11, do inglês *caspase recruitment domain-containing protein 11*), *B-cell lymphoma/leukemia 10* (BCL-10) e *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1* (MALT1), enquanto nas células B normais, esta é apenas ativada transitoriamente após a estimulação antigénica (Sehn & Gascoyne, 2014). Neste subtipo de linfoma, o complexo CBM poderá ser ativado através de diferentes alterações genéticas; 10% dos casos representam mutações pontuais ativadoras da CARD11, ao passo que nos restantes casos, parece existir uma ativação crónica do recetor de células B que, por sua vez, ativa a via de sinalização CBM (Lenz *et al*, 2008a; Davis *et al*, 2010).

A ativação crónica da via de sinalização do recetor de células B é mediada pelo respetivo recetor (são detetadas mutações no gene *CD79A* ou no gene *CD79B* em 20% dos casos) bem como pelas cinases a jusante, que incluem a tirosina cinase do baço (STK, do inglês *spleen tyrosine kinase*), a PI3K, a tirosina cinase de Bruton (BTK, do inglês *Bruton tyrosine kinase*) e a proteína cinase C beta (PKCB, do inglês *protein kinase C beta*) (Davis *et al*, 2010).

Em aproximadamente 30% dos casos de linfoma difuso de grandes células B do subtipo células B ativadas, verificou-se a existência de mutações recorrentes no gene *diferenciação mieloide resposta primária 88* (*MYD88*, do inglês *myeloid differentiation primary response 88*), resultando na regulação positiva de ambas as vias de sinalização NF- κ B e Janus. Finalmente, a perda da função de fator de necrose tumoral α induzido por proteína 3 (*TNFAIP*, do inglês *tumor necrosis factor, α -induced protein 3*) verifica-se tanto através de mutação como de deleção,

resultando em perda de inibição da via de sinalização do NF- κ B (Compagno *et al*, 2009; Kato *et al*, 2009).

Tratamento do linfoma difuso de grandes células B

A radiação continua a ser parte integrante do tratamento desta patologia, e contribui para a diminuição do risco de recidiva após quimioterapia. O tratamento do linfoma difuso de grandes células B evoluiu com a indicação da quimioterapia, constituída pela associação de rituximab com CHOP, o que contribuiu para taxas de recidiva inferiores e para maior sobrevivência (Landberg *et al*, 1979; Monfardini *et al*, 1980; Nissen *et al*, 1983; Persky *et al*, 2008; Phan *et al*, 2010).

A radioterapia continua a ser a primeira opção de tratamento, de acordo com o *Nacional Comprehensive Cancer Network*, para os doentes não elegíveis para quimioterapia, devido à existência concomitante de patologias impeditivas ou para o caso de linfomas refratários (Horning *et al*, 2004; Persky *et al*, 2008; Phan *et al*, 2010).

Atualmente cerca de 80% a 90% dos doentes em estágio precoce de linfoma difuso de grandes células B, estádios I e II, permanecem livres da doença após o tratamento com R-CHOP e com radioterapia de consolidação (Persky *et al*, 2008; Phan *et al*, 2010). No estágio de doença avançada, estádios III e IV, os doentes diagnosticados com linfoma difuso de grandes células B, são primeiramente tratados com terapia sistémica, tornando-se assim o estadiamento um importante fator de prognóstico neste tipo de neoplasia. Os doentes com doença avançada, em estádios III e IV, habitualmente apresentam desfechos clínicos inferiores em comparação com aqueles que se apresentam com doença localizada (Shipp *et al*, 1993).

Quando a doença é localizada, o que ocorre num quarto dos doentes, só é feito um campo de radiação, pelo que poderá ser favorável uma abordagem de tratamento combinado, de quimioterapia com radioterapia. Estes doentes geralmente apresentam características clínicas de baixo risco e um prognóstico favorável, embora não seja claro se isto representa uma verdadeira diferença biológica ou, simplesmente, um reflexo da menor incidência da patologia (Mendes

et al, 2015b).

O estudo mais preponderante foi realizado pelo *Southwest Oncology Group*, no qual os doentes com linfoma no estágio I e II de grau intermédio-alto foram tratados com 8 ciclos de CHOP ou 3 ciclos de CHOP e IFRT (Miller *et al*, 1998). Verificou-se que a abordagem combinada foi associada a uma maior sobrevivência livre de doença, sobrevivência global e perfil de toxicidade. Como consequência, três ciclos de CHOP e IFRT foram amplamente adotados como padrão de tratamento para o linfoma difuso de grandes células B em estádios I e II (Sehn & Gascoyne, 2014). No entanto, numa análise posterior, a melhoria observada na quimioterapia com menor número de ciclos de R-CHOP associada a IFRT, foi anulada após 7 a 9 anos de acompanhamento, em que neste coorte se verificou um maior número de recidivas tardias e mortes por linfoma, apesar de a maioria das recidivas terem ocorrido fora do campo da irradiação (Sehn & Gascoyne, 2014).

O uso de IFRT poderá estar indicado em doentes com fraca tolerância à quimioterapia, ou quando a sua toxicidade seja mínima, devido à localização da doença, uma vez que tal permite a utilização de quimioterapia por períodos mais curtos. Adicionalmente, a utilização seletiva de IFRT em doentes com menor resposta à quimioterapia pode ser considerada (Mendes *et al*, 2015b).

Um algoritmo de tratamento guiado por tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *positron emission tomography*) foi adotado pela *British Columbia Cancer Agency* em 2005, segundo o qual os doentes em que a PET se mantinha positiva após 3 ciclos de R-CHOP receberam terapia com radiação localizada, e os doentes em que a PET era negativa receberam um ciclo final de quimioterapia. A avaliação deste estudo sugere que os doentes quimiossensíveis com uma PET negativa podem ser eficazmente tratados com terapia sistémica, com apenas quatro ciclos de R-CHOP evitando assim o uso de radiação (Sehn, 2012).

Nos doentes que necessitam de radiação, uma revisão retrospectiva sugere que o uso de INRT (do inglês, *involved node radiation therapy*) parece ser equivalente à IFRT, com a mais-valia de parecer reduzir o risco de complicações a longo prazo (Campbell *et al*, 2012; Maraldo *et al*, 2013).

Doença em estágio avançado

Aproximadamente 75% dos doentes com linfoma difuso de grandes células B apresentam doença em estágio avançado, comumente definida como *Ann Arbor* em estádios III e IV ou em estádios I e II com sintomas B ou em doença *bulky* de 10 cm (Coiffier *et al*, 2002; Feugier *et al*, 2005).

O regime de quimioterapia CHOP tem sido o esteio da terapia, uma vez que combinações mais intensivas não demonstraram qualquer benefício adicional. A adição do rituximab melhorou consideravelmente os resultados, com melhoria absoluta de 16% na sobrevivência global a 10 anos, num ensaio clínico realizado em doentes com 60 ou mais anos de idade (Coiffier *et al*, 2002; Feugier *et al*, 2005). Outros ensaios clínicos demonstraram igualmente o benefício do rituximab, o que determinou o estabelecimento de R-CHOP como o *gold-standard* das terapêuticas disponíveis (Habermann *et al*, 2006; Pfreundschuh *et al*, 2006, 2008b). O estudo RICOVER-60 (*Rituximab with CHOP over 60 Years*) veio confirmar que seis ciclos de tratamento seriam suficientes para obter sobrevivência livre de eventos, progressão livre de doença e sobrevivência global, em doentes com estágio avançado da doença (Pfreundschuh *et al*, 2008b). Verificou-se ainda, que os doentes livres de eventos nos 24 meses subsequentes ao tratamento apresentaram uma sobrevivência global similar à da população em geral, destacando assim a importância da otimização desta terapia (Maurer *et al*, 2014).

Vários esquemas alternativos foram explorados, numa tentativa de melhorar a terapêutica com R-CHOP, contudo, apenas um estudo demonstrou vantagem na sobrevivência global (Récher *et al*, 2011). O R-CHOP-14 (R-CHOP administrados a cada 2 semanas) não demonstrou benefício adicional, mas apenas uma maior frequência de efeitos tóxicos (Cunningham *et al*, 2013; Delarue *et al*, 2013). Alguns estudos retrospectivos de base populacional sugeriram um benefício na sobrevivência com a adição do etoposídeo ao R-CHOP, para os doentes de alto risco; no entanto, isso não foi constatado numa análise de subgrupo, num estudo clínico de fase III em jovens doentes de baixo risco (Pfreundschuh *et al*, 2011; Gang *et al*, 2012).

O regime que associa a infusão de etoposídeo com ajustamento de dose com a ciclofosfamida, a doxorrubicina, a vincristina, a prednisona e o rituximab

(DA-EPOCH-R) demonstrou resultados promissores num estudo de fase II em linfoma difuso de grandes células B, especialmente dentro do subtipo centro germinativo de células B. No entanto, a confirmação do seu mérito deve aguardar os resultados de um ensaio de fase III comparando-o com o regime R-CHOP (Wilson *et al*, 2008, 2012).

Radioterapia no linfoma difuso de grandes células B

Na década de 80, preconizava-se que a radiação poderia ser a abordagem mais ativa no tratamento de linfoma difuso de grandes células B (Monfardini *et al*, 1980; Kaminski *et al*, 1986; Hudson *et al*, 1994).

A radioterapia de consolidação após a quimioterapia contribui para a diminuição do risco de recidiva nos locais tratados. Várias evidências têm demonstrado que a radioterapia de consolidação apresenta melhores resultados nos doentes em estágio inicial da doença (Miller *et al*, 1998; Horning *et al*, 2004; Bonnet *et al*, 2007; Ballonoff *et al*, 2008; Martinelli *et al*, 2009). No entanto, é particularmente eficaz na maior parte dos casos de patologia não amplamente disseminada. Existem pelo menos cinco estudos que suportam a melhoria dos resultados com o recurso à radioterapia de consolidação no estágio avançado de linfoma difuso de grandes células B. Reforçando estes resultados, a análise *post-hoc* do estudo RICOVER-60, assim como os resultados preliminares do estudo aleatório UNFOLDER (*Unfavorable Low-Risk Patients Treated With Densification of R-Chemo Regimens*) apoiam igualmente o recurso da radioterapia de consolidação (Ferreri *et al*, 2000; Schlembach *et al*, 2000; Horwitz *et al*, 2004; Phan *et al*, 2010; Dorth *et al*, 2012a, 2012b; Shi *et al*, 2013). Em ambos os estádios, inicial e avançado, do linfoma difuso de grandes células B, tratados apenas com quimioterapia, os locais em que mais comumente se observa falha do tratamento, são os envolvidos na apresentação inicial doença, particularmente em doentes com doença *bulky* (Ferreri *et al*, 2000; Schlembach *et al*, 2000; Bonnet *et al*, 2007).

A radioterapia é uma modalidade de tratamento altamente eficaz para o linfoma difuso de grandes células B, que está associada a excelentes taxas de controlo sustentado. Inicialmente, o linfoma difuso de grandes células B em estágio inicial era

tratado apenas com campo radioterapia *extended*. Apesar de as taxas de resposta terem sido muito elevadas dentro do campo irradiado, a sobrevivência a longo prazo era comprometida pelos altos índices de recidiva fora da área irradiada (Ba, 2013). Na prática clínica moderna, a quimioterapia combinada com terapia dirigida a alvos moleculares tornou-se a base do tratamento deste tipo de linfoma, principalmente para o controlo da doença sistémica. Adicionalmente pode constituir terapêutica de consolidação, com o objetivo de melhorar o controlo local. Assim, nos doentes em estágio inicial do linfoma difuso de grandes células B, a radioterapia adjuvante apresenta duas valências, constitui um meio para limitar a toxicidade do tratamento de quimioterapia, e serve para consolidar a terapia sistémica de modo a melhorar o controlo local da doença (Ba, 2013).

As diretrizes internacionais para o tratamento do linfoma difuso de grandes células B em estágio limitado são pouco consistentes e refletem algumas incertezas em relação à melhor estratégia de tratamento para esta patologia (Tilly & Dreyling, 2010; Zelenetz *et al*, 2013). Atualmente, as duas abordagens de tratamento mais comuns são a quimioterapia com R-CHOP seguida de radioterapia de consolidação, ou quimioterapia R-CHOP por mais ciclos (com ou sem radioterapia de consolidação). É geralmente aceite, que ambas as estratégias de tratamento são equivalentes em termos de sobrevivência a longo prazo e, portanto, a seleção da abordagem geralmente é influenciada pelas preferências do clínico e pelos perfis de toxicidade (Habermann *et al*, 2006; Ng, 2007; Wirth, 2007; Illidge & Tolan, 2008; Persky *et al*, 2008; Persky & Miller, 2009; Tilly & Dreyling, 2010; Pfreundschuh *et al*, 2011). Assim, pretende-se limitar a morbilidade pela otimização da terapia. Ciclos mais longos de quimioterapia foram associados a maiores taxas de toxicidade cardíaca, a mielossupressão, a infeções graves, à síndrome mielodisplásica e a leucemia mielóide aguda (Miller *et al*, 1998; André *et al*, 2004; Reyes *et al*, 2005). Os efeitos secundários podem ser minimizados pela utilização de ciclos mais curtos de quimioterapia, no entanto, à custa de riscos de toxicidade consequente da adição da radioterapia de consolidação ao tratamento. Os efeitos adversos induzidos pela radiação são dependentes do local irradiado (Reyes *et al*, 2005; Bonnet *et al*, 2007; Persky & Miller, 2009).

Após tratamento com quimioterapia, 41% a 63% apresentaram não resposta

inicial ou recorrência local. A radioterapia de consolidação melhorou o controle local e a sobrevivência após a terapia sistêmica isolada em doentes com linfoma difuso de grandes células B (Reyes *et al*, 2005; Bonnet *et al*, 2007; Persky & Miller, 2009).

As doses de radiação utilizadas no tratamento de doentes com uma grande variedade histológica de linfomas têm vindo a ser reduzidas ao longo da última década. Um estudo realizado no Reino Unido demonstrou a inexistência de diferenças entre doses de 30 Gy *versus* 45 Gy (Lowry *et al*, 2011). Para os doentes em estádios I/II da doença e com PET negativa pós quimioterapia, a dose de 30 Gy é atualmente considerada como terapia padrão (Boyle *et al*, 2014).

Na administração de radioterapia de consolidação no tratamento de linfoma difuso de grandes células B em estágio avançado, torna-se razoável considerar a administração de doses mais baixas do que as habitualmente utilizadas no caso de doença localizada. Este grupo de doentes não atingirá a cura, caso as terapias sistêmicas não sejam capazes de eliminar de forma eficaz a doença subclínica generalizada. A radioterapia de consolidação de baixas doses poderá então, ser suficiente para controlar a doença com resposta completa ao tratamento após quimioterapia. Estes doentes são tipicamente tratados com um número superior de ciclos de quimioterapia e, assim, presumivelmente, acabariam por apresentar uma menor carga de doença residual. Além disso, os volumes a tratar poderão ser maiores nesta população de doentes, sendo muito relevante reduzir a toxicidade aguda e a longo prazo (Boyle *et al*, 2014).

A abordagem atual é a utilização de doses entre os 18 Gy e os 24 Gy com o propósito de obter resposta completa ao tratamento com quimioterapia. As doses baixas, como as acima mencionadas, parecem ser tão eficazes como doses superiores e estão provavelmente associadas a menores riscos de toxicidade quer aguda quer tardia. Com recurso a estas doses, o controle local, relatado por estes autores foi de 94% (Phan *et al*, 2010; Dorth *et al*, 2012a, 2012b; Shi *et al*, 2013).

Os volumes de tratamento incluem todos os locais de envolvimento original, sempre que clinicamente viável, e o recurso a doses mais altas encontra-se restrito aos casos em que a PET é positiva após quimioterapia. Quando o tratamento foi apenas com quimioterapia, a ausência de uma resposta completa conforme

determinado por PET, encontra-se habitualmente associado a um risco significativo de recaída. Mesmo com recurso à terapia combinada, uma PET positiva após quimioterapia está, por norma, associado a piores resultados (Mikhaeel *et al*, 2000, 2005; Juweid & Cheson, 2005; Juweid *et al*, 2007).

O *Duke Cancer Institute* refere taxas de controlo local a quatro anos, considerando a presença de PET negativa ou positiva após quimioterapia, de 97% e de 81% ($p < 0,01$), respetivamente. As doses medianas de radiação correspondentes foram de 30 Gy e de 36 Gy, respetivamente. Num cenário de resposta parcial com uma PET positiva pós-quimioterapia, por norma, as doses de 36 Gy a 40 Gy são as geralmente administradas (Dorth *et al*, 2012a).

Campos de radiação

De acordo com as diretrizes do *International Lymphoma Radiation Oncology Group*, é recomendado delinear os volumes tumorais pré-quimioterapia, com exclusão dos órgãos que claramente não se encontram envolvidos, mas que se poderão ter deslocado devido ao tamanho do tumor. O volume de planeamento é definido com uma margem adequada, o que poderá depender de doente para doente e do movimento do próprio órgão (Boyle *et al*, 2014).

A *European Organisation for Research and Treatment of Cancer/Groupe d'Etude des Lymphoma de l'Adulte* (EORTC/GELA) propôs novas abordagens, para além do conceito de IFRT, o *Involved Site Radiotherapy* (ISRT) e agora o INRT, onde apenas os nódulos envolvidos são irradiados (Girinsky *et al*, 2006). Os resultados de uma série retrospectiva demonstraram sobrevivência livre de progressão e sobrevivência global equivalentes para o INRT e para o IFRT (Bonadonna *et al*, 2004; Noordijk *et al*, 2006; Zwam, 2013).

As abordagens atuais de tratamento do linfoma difuso de grandes células B dependem fortemente da quimioterapia sistémica e da imunoterapia. No entanto, a recorrência local continua a representar uma importante causa de falência do tratamento. Um conjunto crescente de evidências retrospectivas e prospetivas demonstra a capacidade da radioterapia para prevenir as recorrências locais em doentes com esta neoplasia, melhorando assim tanto a sobrevivência livre de

progressão como a sobrevivência global (Boyle *et al*, 2014).

PET no linfoma difuso de grandes células B

No caso de doentes em estágio avançado, a radioterapia de consolidação após conclusão do tratamento com quimioterapia, é frequentemente utilizada, com o propósito de erradicar doença residual dos locais de alto risco, tais como áreas de grandes massas iniciais (*bulky*) ou massas residuais observáveis na tomografia computadorizada. Embora os ensaios comparativos sugiram um possível benefício, a recente melhoria na terapia sistémica poderá ter diminuído a utilização da radioterapia (Avilés *et al*, 1994, 2004, 2005).

Até ao momento, não existem ensaios clínicos aleatórios que avaliem o papel da radioterapia de consolidação no linfoma difuso de grandes células B na era do rituximab. Vários estudos retrospectivos sugerem um benefício da radioterapia na sequência da terapia com R-CHOP, os quais demonstram melhor controlo local e um possível melhor resultado global (Phan *et al*, 2010; Dorth *et al*, 2012b; Shi *et al*, 2013). Num estudo comparativo recente (RICOVER-60) a radioterapia de consolidação com irradiação nos locais de apresentação inicial mais exuberante pareceu melhorar a sobrevivência livre de eventos, com uma tendência para a melhoria da sobrevivência global (Held *et al*, 2014). No entanto, nestes estudos o re-estadiamento por PET de varrimento com recurso a ¹⁸F-FDG não foi realizado rotineiramente (Held *et al*, 2014).

Com base na sua maior sensibilidade em comparação com as imagens de TC, a PET de varrimento (ou a fusão PET/TC, que agora é mais comumente usado) é a recomendada para o estadiamento de rotina e avaliação da resposta terapêutica do linfoma difuso de grandes células B (Jerusalem *et al*, 1999; Spaepen *et al*, 2001; Cheson *et al*, 2007, 2014; Ramalingam *et al*, 2013; Barrington *et al*, 2014). A introdução da PET resultou numa avaliação mais precisa da resposta ao tratamento e contribui para distinguir a doença persistente residual da cicatriz tecidual (Juweid *et al*, 2005).

Em 2005, a *British Columbia Cancer Agency* aprovou um algoritmo de tratamento guiado por PET pelo qual os doentes com massas residuais que

permaneceram PET positivos após tratamento com R-CHOP receberam radioterapia de consolidação, sempre que possível, enquanto os doentes com uma PET de varrimento negativa foram apenas mantidos em vigilância. Os doentes com PET positiva, em locais passíveis de serem irradiados, apresentaram um desfecho favorável comparável aos doentes com PET negativa, o que sugere um possível benefício do uso seletivo de radioterapia de consolidação. Na maioria dos doentes em que a PET foi negativa, não existiu exposição desnecessária à radiação (Sehn & Gascoyne, 2014).

Estudos aleatórios em curso avaliam a viabilidade de uma abordagem guiada por PET, para os doentes com linfoma difuso de grandes células B em estágio avançado, com o propósito de evitar exposição desnecessária à radiação, de modo a minimizar toxicidades tardias (Sehn & Gascoyne, 2014).

A radioterapia de consolidação em doentes com linfoma difuso de grandes células B em estágio inicial, estádios I e II, parece ter um benefício no controlo local e sobrevivência livre de progressão (Miller *et al*, 1998; Kamath *et al*, 1999; Horning *et al*, 2004; Reyes *et al*, 2005). A importância da radioterapia no tratamento do linfoma difuso de grandes células B em estágio inicial tem sido objeto de debate entre os especialistas. Existe algum desacordo quanto à relação entre o controlo local e a sobrevivência global em doentes em estágio inicial de linfoma difuso de grandes células B. No entanto, a revisão da literatura apoia o princípio de que a melhoria no controlo local e na sobrevivência livre de progressão são suscetíveis de se traduzir numa melhoria da sobrevivência global (Bindra & Yahalom, 2011).

Os defensores da radioterapia de consolidação argumentam que a melhoria do controlo local, obtido a partir da adição da radioterapia, é suscetível de ser associado a melhoria da sobrevivência livre de doença, da sobrevivência livre de progressão e da sobrevivência global. O estudo 1484 foi um estudo prospetivo aleatório realizado pelo *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) na era pré-rituximab e pré-PET (Horning *et al*, 2004). Dos doentes incluídos, 68% apresentavam-se no estágio II, 31% encontravam-se com doença *bulky* e 47% apresentavam doença extraganglionar. Os prognósticos desfavoráveis eram comuns neste grupo de doentes mas todos receberam oito ciclos de quimioterapia segundo o esquema CHOP. Os doentes que obtiveram resposta completa foram

aleatoriamente selecionados ou para radioterapia de consolidação com doses de 30 Gy ou para nenhuma radioterapia enquanto os doentes com resposta parcial realizaram radioterapia de consolidação com doses de 40 Gy. O objetivo principal deste estudo foi a avaliação da sobrevivência livre de doença e os resultados revelaram, aos 6 anos, um benefício significativo em favor da radioterapia de consolidação (69% vs. 53%, $p=0,04$) (Horning *et al*, 2004). As recidivas ocorreram nos locais de envolvimento pré-quimioterapia, sendo de 18% no grupo de doentes tratados com radioterapia de consolidação, em comparação com os 48% de recidivas no grupo de doentes que não receberam radioterapia ($p=0,06$). O tempo de progressão da doença e a sobrevivência global foram igualmente melhores com a adição da radioterapia, mas os resultados não foram estatisticamente significativos (Habermann *et al*, 2006).

O recurso a menor número de ciclos de quimioterapia no tratamento tem-se mostrado particularmente benéfico em doentes com prognósticos mais favoráveis, estádios I e II do Índice Internacional de Prognóstico modificado. Nestes grupos de prognósticos mais favoráveis, os doentes beneficiam de altas taxas de cura e menor risco de morbidades induzidas pela quimioterapia (Miller *et al*, 1998; Shenker *et al*, 2002).

O estudo randomizado em 401 doentes, realizado pelo *Southwest Oncology Group* (SWOG-8736), comparou o tratamento composto por três ciclos de quimioterapia CHOP associado a radioterapia de consolidação com a quimioterapia de curso prolongado, composto por oito ciclos de quimioterapia CHOP (Miller *et al*, 1998). Todos os doentes se encontravam no estágio I ou II não *bulky*, 50% tinham 60 ou mais anos de idade e 37% apresentavam doença extraganglionar (Sehn & Gascoyne, 2014). Aos 5 anos, verificaram-se melhorias relevantes na sobrevivência livre de progressão, nas taxas de sobrevivência global e na redução da toxicidade nos doentes tratados com menor número de ciclos de quimioterapia associados a radioterapia de consolidação. A sobrevivência livre de progressão foi de 77% *versus* 64%, com taxa de risco de 1,5 ($p=0,03$) e sobrevivência global foi de 82% *versus* 72%, com taxa de risco de 1,7 ($p=0,02$). Após um maior período de tempo de acompanhamento, verificou-se que a sobrevivência livre de progressão foi de 7 anos e a sobrevivência global foi de 9 anos, o que confirma as vantagens da quimioterapia

R-CHOP com menor número de ciclos associada à radioterapia de consolidação (Sehn & Gascoyne, 2014). Além disto, verificou-se uma toxicidade significativamente maior no grupo que recebeu quimioterapia de longo curso devido ao aumento dos índices de toxicidade: 2% *versus* 13%, $p < 0,01$ (Miller *et al*, 1998).

Resposta ao tratamento no linfoma difuso de grandes células B

Os exames radiológicos alterados no início do estudo deverão ser repetidos após três a quatro ciclos de tratamento bem como no fim do último ciclo de tratamento. O aspirado de medula óssea e as biópsias deverão ser apenas repetidos no final do tratamento e quando se verifique envolvimento inicial (Cheson *et al*, 2007). A PET é altamente recomendada para a avaliação após tratamento para ajudar na definição da remissão completa de acordo com critérios de resposta revistos (Cheson *et al*, 2007). A avaliação da resposta ao tratamento deve ser realizada com recurso à PET com ^{18}F -FDG, utilizando a escala de 5 pontos, designada por *Deauville five point scale*, apesar de não ser ainda amplamente utilizada na clínica (Awan *et al*, 2013; Cheson *et al*, 2014).

A confirmação histológica do resultado obtido por uma PET positiva é altamente recomendável. Os resultados são contraditórios em relação ao valor preditivo da PET realizada após 1 a 4 ciclos de tratamento. Alguns estudos demonstram que é preditiva da evolução clínica, mas outros não demonstram essa correlação (Tilly *et al*, 2012).

De acordo com as últimas recomendações, emitidas em 2014 por um grupo de especialistas (hematologistas, oncologistas, radiologistas e nuclearistas) de centros de estudo do cancro, a PET com ^{18}F -FDG e a CT devem ser formalmente incorporadas no estadiamento para os linfomas difusos de grandes células B (Barrington *et al*, 2014).

**CAPITULO 3 – SISTEMA
IMUNOLÓGICO E RADIOTERAPIA**

O sistema imunológico, constituído por tecido linfoide, inclui uma variedade de células e múltiplos fatores solúveis. A maior parte das respostas imunológicas são orquestradas nos órgãos linfoides e estabelecem um eficiente mecanismo capaz de proteger o organismo contra invasores do exterior ou contra células próprias alteradas, participando de forma crucial no equilíbrio homeostático desse organismo. A Figura 9 ilustra os diversos componentes que constituem o sistema imunitário (Dranoff, 2004).

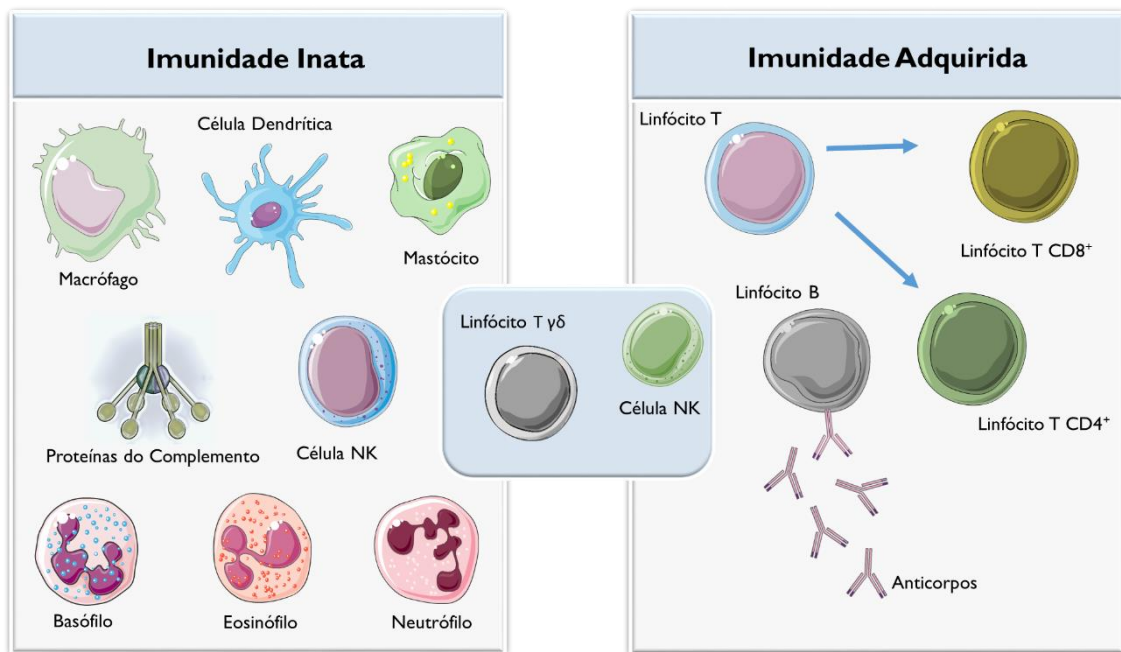


Figura 9: A resposta imune inata representa a primeira linha de defesa contra infecções. É constituída por fatores solúveis, tais como as proteínas do complemento, e por diversos tipos celulares, como granulócitos basófilos, eosinófilos e neutrófilos, mastócitos, macrófagos, células dendríticas e células *Natural Killer*. A resposta imune adaptativa é mais lenta, mas manifesta-se com aumento da especificidade antigénica e de memória. É constituída também por um componente solúvel, os anticorpos, e por um componente celular que inclui células B, células T CD4⁺ e células T CD8⁺. As células *Natural Killer* e as células Tγδ são linfócitos citotóxicos que estabelecem comunicação na interface da imunidade inata e adaptativa. Adaptado de Dranoff 2004.

O sistema imunológico conceptualmente tem sido dividido em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata caracteriza-se pela rápida resposta à agressão, independente do estímulo prévio, constitui a primeira linha de defesa do organismo e atua em conjunto com a imunidade adaptativa. Esta depende da ativação de linfócitos e das moléculas solúveis por eles produzidas, tais como as citocinas, as quimiocinas e os anticorpos (Medzhitov & Janeway, 2000; Mesquita Júnior *et al*, 2010). Os mecanismos adaptativos apresentam especificidade,

diversidade de reconhecimento, memória, resposta específica bem como autolimitação e tolerância às células do próprio organismo. As principais células envolvidas neste tipo de resposta imune são os linfócitos, dos quais as células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês antigen presenting cells) têm um papel essencial na sua ativação, apresentando antígenos associados a moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC, do inglês major histocompatibility complex) para as células T (Delves & Roitt, 2000; Mesquita Júnior et al, 2010).

Sistema imunológico e cancro

A função de imunovigilância por parte do sistema imunológico representa um mecanismo supressor tumoral eficaz, no entanto, no contexto da doença oncológica pode contribuir para a incidência e para a evolução do cancro (Dunn et al, 2002; Jeremic, 2005; Kim et al, 2007; Schreiber et al, 2011). Sabe-se que o cancro poderá ter maior incidência quando, concomitantemente, ocorre uma redução na resposta do sistema imunológico. Está descrito que em condições de imunossupressão, como no caso dos doentes transplantados, poderá existir risco aumentado de desenvolvimento tumoral, quer seja devido à replicação viral quer devido a uma redução da vigilância do sistema imune (Burnet, 1957; Ashman, 1987; Parkin et al, 1999; Ramalingam et al, 2011; Schreiber et al, 2011; American Cancer Society et al, 2015). Vários estudos em modelos animais comprovaram que o sistema imunológico pode, com eficácia, proteger ratinhos do desenvolvimento de vários tipos de tumores primários bem como de tumores transplantados (Kim et al, 2007).

A incidência de neoplasias espontâneas no envelhecimento e a suscetibilidade a sarcomas induzidos por carcinogêneos é mais proeminente em ratinhos que não expressam interferão (IFN)- γ do que em ratinhos imunodeficientes com ausência de células T e de células B, células Natural Killer (NK) e células NKT (células CD3⁺CD56⁺CD8⁺). Quando o sistema imunológico, na sua função de vigilância, identifica células alteradas inicia um processo de ativação que pode culminar em quatro resultados distintos, a tumorigénese, a eliminação do tumor, o equilíbrio entre o sistema imune e o próprio tumor (edição tumoral) e a exaustão e posterior escape (Dighe et al, 1994; Engel et al, 1996, 1997; Kaplan et al, 1998; Smyth et al, 2000a,

2000b; Girardi *et al*, 2001; Shankaran *et al*, 2001; Gao *et al*, 2003; Dunn *et al*, 2005; Swann *et al*, 2007; Smyth, 2008; Vesely *et al*, 2011; Verdeil *et al*, 2015; Mendes *et al*, 2016).

O sistema imunológico, virtualmente, tem a capacidade de eliminar as células tumorais, no entanto, por vezes não é suficiente para a eliminação total das células tumorais. As células tumorais que escapam ao seu controlo são capazes de alterar a sua expressão imunogénica e tornam-se variantes das anteriores (edição imunológica, do inglês *immuno edition*), o que determina a denominada fase de equilíbrio. Nesta fase, as células tumorais apresentam-se num estado de dormência funcional que faz com que não sejam detetadas clinicamente (Ross, 1999; Bernier *et al*, 2004; Formenti & Demaria, 2009). Durante a fase de equilíbrio, as células do sistema imune adaptativo, as células T CD4⁺, as células T CD8⁺, bem como as moléculas efetoras, como o interferão- γ , ou a interleucina (IL)-12 são os principais responsáveis pela prevenção e pela inibição do desenvolvimento do tumor (Ross, 1999). Sob a pressão seletiva do sistema imune, algumas células tumorais podem adquirir mutações adicionais, apresentando assim um fenótipo diferente, mais resistente à destruição imunitária e, portanto, capaz de escapar à vigilância imunológica como está representado no esquema da Figura 10 (Schreiber *et al*, 2011; Verdeil *et al*, 2015; Mendes *et al*, 2016). As células T apesar de serem recrutadas para o tumor dificilmente controlam o crescimento tumoral. A imunoterapia com base nestas não tem sido totalmente bem-sucedida e encontra-se atualmente em franco desenvolvimento.

O cancro pode ser considerado uma doença crónica e em termos imunológicos constitui um mecanismo similar às infeções virais crónicas, em que as células T são estimuladas cronicamente (Rezaei, 2015; Mendes *et al*, 2016). Em doentes com cancro não tratado, as células T podem tornar-se disfuncionais e permanecem num estado denominado de célula T "exausta". Contudo, muitas vezes estas células T mantêm um elevado potencial de defesa contra o tumor, o que indica que não se trata de um processo irreversível (Verdeil *et al*, 2015; Mendes *et al*, 2016).

Os hábitos tabágicos, a dieta não equilibrada e/ou os alimentos

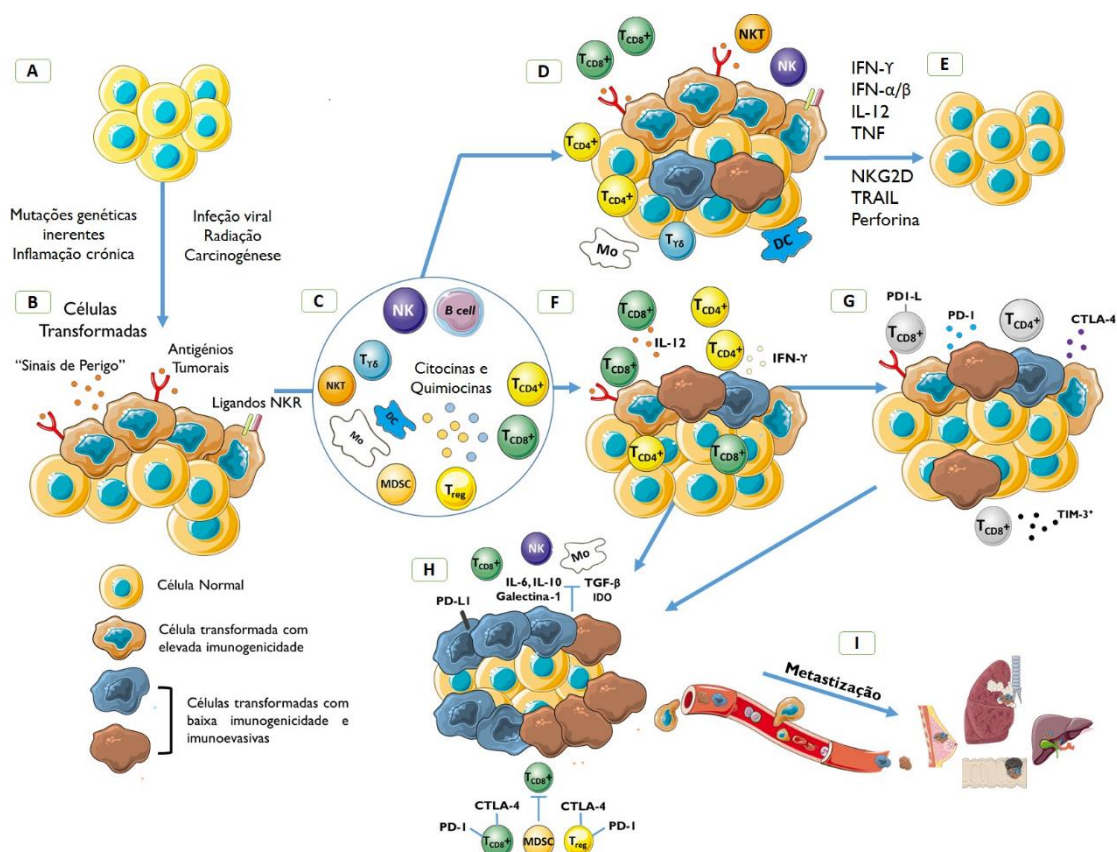


Figura 10: A edição imunológica no cancro consiste em quatro fases sequenciais: eliminação, estacionário (equilíbrio), exaustão e escape. A – Tecido normal; B – tecido transformado devido a várias causas, com produção de “sinais de perigo”, antígenos tumorais; C – Ativação do sistema imunitário e resposta à transformação celular, com *cross-talk* entre a resposta imunitária inata e adquirida; D – Eliminação das células transformadas pelas células do sistema imunitário e produção de citocinas e quimiocinas; E – Tecido normal restaurado; F – inibição da proliferação das células transformadas, com equilíbrio entre a resposta do sistema imunitário e células transformadas, com proliferação seletiva das células transformadas “protegidas” pelo sistema imunitário, existindo acumulação de mutações nestas células, com ganho de capacidade de prevenir a sua destruição pelo sistema imunitário em condições de stresse; G – Exaustão do sistema imunitário, permitindo a rápida proliferação das células tumorais e sua fuga ao sistema imunitário (células TC D4+ e T CD8+ a cinza); H – Rápida proliferação clonal das células transformadas “protegidas”, com polarização da resposta imunitária do tipo Th2, inibição de células imunitárias citotóxicas e metástases; I – Metastatização para os pulmões, fígado, colon e mama. Retirado de (Mendes *et al*, 2016).

contaminados, as infeções, a obesidade, a radioterapia e a poluição ambiental são alguns dos estímulos que poderão induzir e promover o desenvolvimento do cancro.

Os indutores da inflamação poderão ser exógenos como os agentes patogénicos, os alérgenos, os irritantes, ou os compostos tóxicos ou endógenos como o stresse oxidativo e as próprias células lesadas. O processo inflamatório constitui um mecanismo comum a todos os fatores anteriormente mencionados (Medzhitov, 2008; Aggarwal *et al*, 2009; Grivennikov *et al*, 2010).

Vários autores postulam que a inflamação crónica e persistente contribui

fortemente para a iniciação de um tumor, pois gera stresse genotóxico e induz proliferação celular, progressão tumoral para além de promover a angiogénese e a invasão de tecidos. Desta forma o sistema imunológico pode proporcionar um microambiente tumoral favorável. A ligação causal entre a inflamação e o cancro tem sido descrita por vários autores (Balkwill & Mantovani, 2001; Medzhitov, 2008; Ostrand-Rosenberg, 2008; Aggarwal et al, 2009).

Aproximadamente 20% de todas as neoplasias estão associadas a processos inflamatórios persistentes e não resolvidos, sendo que a maioria, se não quase todos os tumores sólidos, apresentam infiltrados inflamatórios (Grivennikov & Karin, 2011). A inflamação, as citocinas e o transdutor e ativador da transcrição do sinal 3 (STAT3, do inglês signal transducer and activator of transcription 3) foram identificados como os três principais constituintes do microambiente facilitadores da tumorigénese. Nos cancros do pulmão, do ovário, e gastro esofágico foram quantificados níveis elevados de IL-6, de IL-8 e de IL-13 na ascite, no lavado broncoalveolar, no soro sanguíneo e nos tecidos do tumor. De realçar que estas interleucinas correlacionam-se habitualmente com um mau prognóstico (Deans et al, 2006; Aggarwal et al, 2009; Li et al, 2011). De modo complementar, demonstrou-se que a carcinogénese quimicamente induzida em modelo animal requer o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias e de sinalização, tais como a IL-10, a IL-13, a IL-23 e o gene de MYD88 (Vesely et al, 2011).

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α , do inglês tumor necrosis factor α) revelou-se uma importante citocina inflamatória com capacidade de induzir necrose hemorrágica e rápida eliminação do tumor; de forma paradoxal desempenha também o papel de promotor tumoral, através da ativação de oncogenes, da promoção da invasão de células tumorais nos tecidos próximos, da angiogénese e da indução de resistência à quimioterapia (Szlosarek et al, 2006; Balkwill, 2009).

Alguns estudos observaram o mau prognóstico de doentes oncológicos com valores de TNF- α aumentados. Sabe-se que a STAT3 atua como um ponto de convergência de várias vias de sinalização oncogénicas, estando ativada constitutivamente, quer em células do sistema imunológico e em células tumorais quer no microambiente tumoral. A ativação da STAT3 induz a regulação positiva de vários genes envolvidos na proliferação e na sobrevivência celular como o C-Myc, a

survivina e a *ciclina 01/02*, promove ainda a inflamação pro-oncogénica através da IL-6, do VEGF, da metaloproteinases da matriz (MMP, do inglês *matrix metalloproteinase*)-2, MMP-9 e do fator indutor de hipoxia-1 α (HIF-1 α , do inglês *hypoxia-inducible factors-1 α*). Associadamente, a resposta pro-inflamatória do tipo TH1, mediada pela IL-12, por quimiocinas motivo de C-X-C ligando 10 (CXCL10, do inglês *C-X-C motif chemokine ligand 10*) e por interferão- γ , em conjunto com a expressão de STAT1 e de NF- κ B, está associada à supressão da resposta do sistema imune através da IL-10 e do TGF-13 (Ferrajoli *et al*, 2002; Yoshida *et al*, 2002; Bozcuk *et al*, 2004; Yu *et al*, 2007, 2009; Kortylewski & Yu, 2008).

Adicionalmente observou-se que o microambiente produz vários fatores com impacto sistémico e efeito anti-inflamatório que, para além de dessensibilizarem a inflamação local, se encontram associados com a incapacidade para induzir reações inflamatórias em locais diferentes do tumor (Balkwill & Mantovani, 2001).

Os tumores sólidos não são apenas compostos por clones heterogéneos de células tumorais. Em certa medida, a formação de um tumor revela-se muito similar com os processos de remodelação do tecido e de desenvolvimento de órgãos. Assim, os tumores sólidos são constituídos por células tumorais, por fibroblastos, por células endoteliais, por vasos sanguíneos, por vasos linfáticos, por células do sistema imunológico e ainda por fatores como as citocinas, as quimiocinas e por produtos do metabolismo celular e da matriz extracelular. Os infiltrados de células imunes no microambiente tumoral revelam-se componentes importantes, uma vez que determinam interações celulares e moleculares complexas, que influenciam a capacidade dos tumores para a progressão e a metastização (Finn, 2008; Egeblad *et al*, 2010).

Num estudo demonstrou-se que o tipo, a densidade, o estado de ativação e a localização dos infiltrados linfocitários no tumor poderão influenciar não só o tratamento do doente como o resultado final. Assim, uma elevada contagem de células T CD8⁺ e baixa de células T CD4⁺FoxP3⁺ no infiltrado tumoral após quimioterapia neoadjuvante foi associada a uma melhoria significativa da sobrevivência livre de doença e da sobrevivência global (Ladoire *et al*, 2011). Adicionalmente, os tumores com infiltrados de células T CD3⁺, células T CD8⁺, granzima B⁺ e células CD45RO⁺ no centro ou na margem invasiva estão associados a

melhor prognóstico e a sobrevivência prolongada (Pagès *et al*, 2005; Galon *et al*, 2006).

A expressão coordenada de genes específicos de resposta imunológica do tipo Th1 em conjunto com marcadores citotóxicos, mas não com a expressão de genes da resposta imunitária do tipo Th2, ou genes relacionados com a angiogênese e a imunossupressão foram associados a elevada densidade de células de memória CD45RO⁺. A elevada contagem das células T CD8⁺ e das células CD45RO⁺ parece ser um critério imunológico útil para a previsão de baixa recorrência do tumor e de sobrevivência a longo prazo, como ocorre em doentes com cancro colorretal em estádios iniciais (Pages *et al*, 2009). Neste tipo de tumores observou-se uma correlação positiva significativa com a presença de células T citotóxicas, de memória efetora, do sistema imune inato e de células T efectoras, sugerindo que será necessária uma reação imunológica coordenada para concentrar os efetores mais eficazes no local do tumor (Camus *et al*, 2009).

Em alguns estudos realizados em doentes com cancro colorretal, os resultados observados postulam que em tumores primários os infiltrados de células T memória, nomeadamente do tipo Th1 e citotóxicas, são um forte fator de prognóstico em termos de sobrevivência livre de recidiva (DFS, do inglês *recurrence-free survival*) e de sobrevivência global. Este tipo de informação poderia contribuir para a tomada de decisão sobre a aplicação de terapias neoadjuvantes em cancros sólidos em estádios iniciais, nomeadamente I e II (Bindea *et al*, 2010; Pagès *et al*, 2010). Outro estudo observou que no cancro da mama a presença de linfócitos associados a tumores (TALs, do inglês *tumor-associated lymphocytes*) poderão ser um preditor independente da resposta ao tratamento com quimioterapia neoadjuvante com antraciclinas e taxanos (Shiao & Coussens, 2010).

Em geral, um intenso infiltrado de linfócitos significa bom prognóstico, mas o próprio tumor poderá recrutar outras células do sistema imune com efeito oposto, como é o caso das células T reguladoras, que se encontram presentes em muitos tumores (Waldhauer & Steinle, 2008; Pittet, 2009).

As células B presentes em infiltrados tumorais, parecem ter uma expansão oligoclonal, com maturação *in situ*, representando assim uma resposta humoral específica para o tumor. Alguns estudos mostram que a presença de células B e de

células *Natural Killer* no cancro do ovário metastizado se correlacionam com uma baixa sobrevivência global dos doentes (Hansen *et al*, 2001; Coronella *et al*, 2002; Dong *et al*, 2006). Outros estudos mostram que os anticorpos secretados pelas células B parecem depositar-se no estroma do tumor, ativar localmente a sinalização mediada no FcRY (do inglês *IgY's neonatal Fc receptor*) para as células mieloides residentes ou recrutadas e, assim, promover a progressão para a malignidade. A IL-10, derivada das células B, parece induzir uma polarização do tipo M2 nos macrófagos associados a tumores (TAM, do inglês *tumor-associated macrophages*) (Andreu *et al*, 2010; Wong *et al*, 2010). De acordo com o perfil de citocinas, Th1 ou Th2, bem como das moléculas coestimulatórias presentes no meio, as células NKT podem melhorar ou suprimir a resposta antitumor (Smith & Dale I. Godfrey, 2000; Smyth *et al*, 2002; Crowe *et al*, 2005).

Adicionalmente, as células do sistema imunitário podem ativar vias de sinalização da regulação do sistema imunológico e, desta forma, adquirir resistência à resposta imunológica. Alguns estudos demonstram que um microambiente tumoral com elevado número de células T reguladoras, originam uma diminuição ou uma supressão da resposta imune contra o tumor (Zou, 2006; Cao, 2009). O elevado número de células T reguladoras no microambiente tumoral, no sangue periférico e nos agregados linfoides, parece contribuir para diminuir a resposta do sistema imunológico contra o tumor e, assim, afetar negativamente o curso da doença. A inibição da sua função ou a depleção deste tipo de células parece contribuir para uma resposta antitumoral com melhorias a nível do efeito terapêutico (Woo *et al*, 2001; Yaqub *et al*, 2007; Darrasse-Jèze *et al*, 2009; Menetrier-Caux *et al*, 2009; Sugihara *et al*, 2009; Klages *et al*, 2010; Li *et al*, 2010; Mougiakakos *et al*, 2010).

A população de células T reguladoras com expressão de *Forkhead box P3* (FOXP3+) é heterogénea, tem várias origens possíveis, tanto do timo como periféricamente, e apresenta vários perfis funcionais periféricos. As células T reguladoras periféricas são classificadas em centrais, em efetoras e em residentes no tecido. As células T reguladoras centrais constituem a maioria das células T reguladoras presentes em circulação e nos órgãos linfoides secundários. Esta população pode também ser referida como células T reguladoras em repouso ou *naïve* e partilha algumas características fenotípicas, como marcadores de ativação e

padrões de circulação, com células T *naïve* e de memória convencionais. Estas células não estão quiescentes, uma vez que apresentam uma função supressora basal e um historial de exposição a antigénios. Alguns estudos realizados usando células T reguladoras CD62L^{hi}CCR7⁺ (*CC-chemokine receptor 7-positive*) ou CD45RA^{hi}CD25^{low} consideraram esta população como a principal população de células T reguladoras centrais. A dominância desta população foi também demonstrada em estudos envolvendo a recolha de células T reguladoras de órgãos linfoides secundários (Liston & Gray, 2014).

As células T reguladoras efetoras constituem uma fração minoritária das células T reguladoras em circulação e nos órgãos linfoides secundários, sendo também denominadas de células T reguladoras ativadas. Esta população partilha algumas características fenotípicas com células T ativadas convencionais e muitas são definidas com células CD62L^{low}CCR7^{low}CD44^{hi}KLRG1⁺ (*killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1-positive*) CD103⁺ ou CD45RA^{low}CD25^{hi}. As células T reguladoras com este perfil tiveram contacto com antigénios mais recentemente que as células T reguladoras centrais e uma migração potenciada através dos tecidos linfoides. Ainda não é totalmente claro se as células T reguladoras efetoras são diferenciadas de modo terminal ou se têm a capacidade de voltar a um estado de célula T reguladora central (Liston & Gray, 2014).

As células T reguladoras residentes no tecido são as que possuem uma residência de longo prazo em tecidos não linfoides, em oposição com a migração de curto prazo em tecidos não linfoides observada em células T reguladoras efetoras. Potencialmente, cada órgão pode abrigar uma população distinta de células T reguladoras, que podem adotar funções para além da regulação da inflamação local. Atualmente, são considerados como melhores exemplos de células T reguladoras residentes no tecido as do tecido adiposo, que são caracterizadas por expressão de *peroxisome proliferator-activated receptor-γ* e as do intestino, caracterizadas pela expressão de *free fatty acid receptor 2 receptor* (Liston & Gray, 2014).

As células supressoras derivadas de mielóides (MDSC, do inglês *myeloid-derived suppressor cells*) provavelmente atuam como reguladoras do sistema imunológico, e pode facilitar o escape do tumor (Nagaraj & Gabrilovich, 2008; Gabrilovich & Nagaraj, 2009; Ostrand-Rosenberg & Sinha, 2009; Peranzoni *et al*, 2010).

As células neoplásicas parecem ser capazes de instruir as células imunes a sofrer alterações que promovam a malignidade, e bloquear a função efetora das células imunes e das células *Natural Killer* através de secreção de ligandos solúveis de *natural-killer group 2, member D* (NKG2D). As células neoplásicas podem produzir TGF-13, que contribui para a transformação do fenótipo das células T efetoras em células T reguladores que, por sua vez, irão suprimir outras células T efetoras infiltradas no tumor. Outros fatores ainda não identificados na sua totalidade, parecem induzir uma regulação positiva dos receptores de limpeza dos macrófagos 1 (MSR1, do inglês *macrophage scavenger receptor 1*) em células dendríticas, o que resulta na absorção excessiva de lípidos extracelulares, reduzindo assim a sua capacidade para processar antígenos (Groh *et al*, 2002; Herber *et al*, 2010; Teng *et al*, 2010).

As células de cancro da mama produzem linfopietina estromal tímica (TSLP, do inglês *thymic stromal lymphopoietin*) o que poderá contribuir para uma polarização do sistema imune para uma resposta do tipo TH2 com a produção de IL-13 e TNF- α , que favorece o seu desenvolvimento, através da indução da expressão do ligando OX40 em células dendríticas. Em modelos animais, verificou-se que o *fator estimulador de colónias de granulócitos* (G-CSF, do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*) pode ser secretado por células tumorais e promover a expressão de *bombina variagata peptide 8* (Bv8) na medula óssea de células CD11b⁺Gr1⁺ e facilitar a mobilização de células mielóides, nomeadamente dos neutrófilos, bem como promover a angiogénese tumoral e o crescimento do tumor. As células tumorais poderão ainda produzir a proteína do estroma da medula óssea 2 (BST2, do inglês *bone marrow stromal protein 2*) que determina a alteração do fenótipo das células dendríticas plasmacitoides (pDC, do inglês *plasmacytoid dendritic cells*), através da via de sinalização *immunoglobulin-like transcript 7* (ILT7). Com este processo as células dendríticas plasmacitoides deixam de responder aos sinais de perigo do tipo 1 com produção de interferão. O pré-tratamento com o IFN- γ e TNF- α aumentou significativamente a secreção da proteína do estroma de medula óssea 2, o que sugere que o estado inflamatório do microambiente tumoral contribui para um estado de imunorregulação (Shojaei *et al*, 2007; Cao *et al*, 2009; Pedroza-Gonzalez *et al*, 2011).

Sistema imunológico e a radioterapia

A radioterapia pode desencadear uma resposta imune. O tumor pode evoluir para um equilíbrio único em termos imunes, dado a sua origem autóloga, com um processo de imunoeedição e microambiente único. A morte celular fisiológica, que ocorre como um subproduto da contínua renovação celular, é um processo não imunogénico mas antes tolerogénico. Embora a morte celular em massa induzida pela quimioterapia e pela radioterapia contribuam para que o processo de apoptose seja superado pela necrose, surge a inflamação aguda e o estímulo para a imunidade antitumoral. A imunização através da preparação de vacinas com células do tumor irradiadas, enriquecidas com fator estimulante de colónias de granulócitos e de macrófagos (GM-CSF, do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) parece recrutar células dendríticas, plasmócitos, células NKT, células T CD4⁺ e células T CD8⁺ reativas contra o tumor, tanto em ratinhos como em doentes com cancro metastático, o que confirma imunidade antitumoral potente, específica e duradoura (Rubinstein *et al*, 2004; Jinushi *et al*, 2008; Perez *et al*, 2010).

Para além de causar imunidade protetora antitumoral, a quimioterapia e a radioterapia podem igualmente desencadear uma resposta inflamatória, ao provocar necrose e estimular a regeneração do tecido tumoral bem com o estabelecimento de resistências às terapêuticas (Grivennikov *et al*, 2010). Um dos momentos críticos no estabelecimento de resistências à terapêutica ocorre quando as células tumorais respondem a uma agressão consequente à terapêutica. A expressão de genes da família da *resistência a múltiplos fármacos* (MDR, do inglês *multidrug resistance*), assim como alteração na expressão dos genes *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Mcl-1* e *TP53*, que regulam as vias anti-apoptóticas, pode explicar o desenvolvimentos da quimio e da radio resistência. (Kepp *et al*, 2011; Ma *et al*, 2011c).

Num contexto em que a quimioterapia ou a radioterapia induzem morte das células tumorais, esta poderá estar associada a "sinais de perigo" que são libertados por estas células e que desencadeiam um processo inflamatório. A libertação destes sinais quimiotáticos positivos e negativos em conjunto com uma mudança na expressão de estruturas da superfície celular, influencia a seleção dos fagócitos, a

ativação, a diferenciação e, posteriormente, a iniciação da imunidade adaptativa (Green *et al*, 2009; Zitvogel *et al*, 2010).

A radiação ultravioleta C bem como as antraciclinas e a oxaliplatina parecem induzir a translocação pré-apoptótica da calreticulina (CRT) e da *disulfide isomerase ERp57* para a membrana externa das células tumorais, o que constitui um sinal para que as células dendríticas iniciem a fagocitose.

Vários estudos demonstraram que a exposição da calreticulina e a exposição de *ERp57* contribuem para a imunogenicidade da morte celular (Obeid *et al*, 2007; Panaretakis *et al*, 2008; Zitvogel *et al*, 2010). A proteína do grupo de alta mobilidade B1 (HMGB1, do inglês *high mobility group box 1 protein*) é um fator de transcrição nuclear e uma proteína abundante que é secretada para o meio pelas células em apoptose e constitui um sinal de alerta e de recrutamento de células inflamatórias, tais como células dendríticas imaturas, neutrófilos e monócitos (Yang *et al*, 2006; Orlova *et al*, 2007).

A ligação da HMGB1 ao *tool like receptor 4* (TLR4) parece facilitar a apresentação cruzada dos antígenos tumorais pelas células dendríticas e, desta forma, regular negativamente a função imunossupressora das células T reguladoras (Apetoh *et al*, 2007; Zhu *et al*, 2011). O papel imuno-estimulatório da HMGB1 pode ser modificado após-transcrição. A ativação das caspases durante a apoptose pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, com oxidação da HMGB1 e indução de tolerância imunológica. Sabe-se que a HMGB1 oxidada aumenta a citotoxicidade dos agentes de quimioterapia ou da radiação ionizante, e regula a apoptose através da via das proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock protein*) que, por norma, se encontram sobre expressas no cancro. Estas proteínas parecem ter um papel de proteção celular (Chalmin *et al*, 2010). Algumas HSP, como a HSP27, a HSP70 e a HSP90 são secretadas aquando do tratamento com fármacos anti-cancro, situações de stresse oxidativo e após a irradiação. A expressão membranar destas proteínas nas células tumorais e nas células em morte pode ser potencialmente imuno-estimulante, devido à sua capacidade de interagir com alguns recetores nas células apresentadoras de antígenos, tais como o CD91, o da lectina do tipo *lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1* (LOX-1) e o CD40, o que facilita a maturação das células dendríticas e a respetiva apresentação

de antígenos tumorais. Além disso, as HSP parecem ainda ativar as células *Natural Killer* (Basu *et al*, 2001; Delneste *et al*, 2002; Chan *et al*, 2007; Spisek & Dhodapkar, 2007; Elsner *et al*, 2010; Murshid *et al*, 2010).

Acessoriamente, observou-se que as células CD11b⁺ presentes no estroma tumoral apresentavam a capacidade de capturar o antígeno tumoral de células cancerígenas vizinhas e eliminar as variantes de perda de antígeno tumoral, de forma dependente da presença de IFN- γ e de TNF- α . Durante todo este processo, a cooperação entre as células T CD4⁺ e as células T CD8⁺ é fundamental uma vez que as primeiras são necessárias não só para a ativação das segundas, mas também para a fase efetora. As interações entre as células NKT, as células T, as células *Natural Killer* e as células dendríticas são fundamentais para a maturação destas últimas bem como para a ativação das células T (Spiotto *et al*, 2004; Zhang *et al*, 2008a, 2008b; Ma *et al*, 2011a).

As células vivas apresentam sensibilidades diferentes à radiação ionizante, mas em geral, podemos afirmar que as células que se dividem mais frequentemente são as mais radiosensíveis. Esse comportamento reflete a Lei de Bergonie-Tribondeau, a qual diz que a radiosensibilidade de uma célula, tecido ou órgão aumenta com a sua capacidade reprodutiva e diminui com o seu grau de diferenciação. As células tumorais dividem-se frequentemente por isso são mais sensíveis aos efeitos da radiação do que as células normais que as rodeiam, facto que corrobora o uso de radiação ionizante para eliminar eficazmente essas células. Os precursores das células sanguíneas que estão em constante regeneração são igualmente eliminados, um dano colateral que está na base da leucopenia (Jeremic, 2005; Formenti & Demaria, 2009).

Os linfócitos são conhecidos pela sua vulnerabilidade à radiação, devido à apoptose induzida nas células T e nas células B maduras, o que diminui os seus níveis no sangue periférico. Os efeitos da radiação ionizante podem também ser detetados na medula óssea, onde as lesões provocadas nos precursores dos granulócitos e dos monócitos, bem como nas células *Natural Killer*, comprometem a imunidade inata do doente (Schumacher *et al*, 2001; Nakakubo *et al*, 2003; Hiraoka *et al*, 2006).

Alguns estudos demonstraram que as subpopulações de células T CD4⁺ e de

células T CD8⁺ tendem a diminuir após a radioterapia. Doentes com baixa contagem destas células estão associados a um pior prognóstico, enquanto se houver um número normal de células T CD4⁺ e de células T CD8⁺ a taxa de sobrevivência aos cinco anos é superior (Hiraoka *et al*, 2006; Hald *et al*, 2013; Maehata *et al*, 2013).

Após a radioterapia ocorre uma sequência de reações como resultados da lesão das células oncogénicas, que envolve vários mecanismos do sistema imunológico que podem aumentar positivamente e realimentar a resposta imune contra o tumor. Em primeiro lugar, as células de tecido tumoral respondem aos fotões ionizantes pela regulação positiva de proteínas de fase aguda, tais como o TNF- α , a IL-1 e a IL-6. As moléculas do MHC I e de adesão, tais como a *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), a *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), ou a E-selectina são igualmente reguladas positivamente nas células endoteliais, contribuindo assim para o recrutamento de leucócitos através das barreiras endoteliais próximas do tumor (Shiao & Coussens, 2010; Durante *et al*, 2013). Assim a ligação entre a radioterapia e o sistema imunológico é perceptível. As células T, os macrófagos, as células *Natural Killer* entre outras células do sistema imune, parecem ter um papel chave no controlo do tumor.

CAPÍTULO 4 – OBJETIVOS

O cancro do pulmão e o linfoma difuso de grandes células B são neoplasias de elevada incidência e agressividade, representativas de tumores sólidos e de tumores líquidos, respetivamente, em que a radioterapia está incluída nos esquemas terapêuticos. No entanto, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ação anticancerígena da radioterapia, assim como as repercussões no sistema imune, não se encontram totalmente clarificados. Perante esta constatação constituiu objetivo deste trabalho a caracterização, do ponto de vista celular e molecular, dos efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante em linhas celulares dos referidos tipos de cancro. Assim, pretendeu-se avaliar a sobrevivência e a proliferação celular, os tipos de morte celular induzidos, os parametros de stresse oxidativo, traduzidos por produção intracelular de espécies reativas de oxigénio e as respetivas defesas antioxidantes e, ainda, contribuir para caracterizar alguns mecanismos moleculares envolvidos nestes processos após irradiação com raios X em doses num intervalo entre 0,5 Gy e 60 Gy.

O sistema imunitário desempenha uma função primordial na vigilância, na homeostasia e na distinção do próprio do não próprio. A imunovigilância contribui inicialmente para a eliminação das células transformadas, no entanto, numa fase posterior, pode contribuir para uma melhoria dos resultados terapêuticos ou, pelo contrário, favorecer o escape e o processo de metastização. O sistema imunitário pode ainda influenciar o resultado final do tratamento e da resolução da patologia e, por outro lado, ser influenciado pela terapêutica. Assim, paralelamente, constituiu objetivo desta tese contribuir para o esclarecimento do efeito da radioterapia no sistema imunitário de doentes com cancro pulmão e de doentes com linfoma difuso de grandes células B. Para tal, pretendeu-se caracterizar o reflexo periférico da radioterapia no sistema imunitário através da identificação das diferentes populações celulares do sistema imune e da determinação de mediadores de sinalização celular, nomeadamente, os níveis de citocinas e de quimiocinas relacionando-os com a resposta imunitária.

PARTE II – ESTUDO EXPERIMENTAL

CAPITULO 5 – ESTUDO EM LINHAS CELULARES

MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos *in vitro* permitiram avaliar a resposta à irradiação das células tumorais de cancro do pulmão e das células de linfoma difuso de grandes células B. Estes estudos permitiram, para cada linha celular, estabelecer o fator de sobrevivência e avaliar a viabilidade e a proliferação celulares. Associadamente, por forma a avaliar e caracterizar o tipo de morte celular induzido, recorreu-se à microscopia ótica e à citometria de fluxo. No que respeita à citometria de fluxo utilizou-se a dupla marcação com anexina V e com iodeto de propídeo, anticorpos específicos para avaliar a expressão de proteínas reguladoras da apoptose, nomeadamente a BAX e a BCL-2 assim como sondas específicas que permitiram estudar o potencial de membrana mitocondrial, a produção intracelular de espécies reativas de oxigénio e a glutatona reduzida. Além destes estudos avaliou-se a influência da irradiação na expressão da proteína P53, assim como a genotoxicidade, marcadores fundamentais no progresso da morte celular.

Culturas celulares

O estabelecimento de culturas celulares baseia-se no princípio da criação de um sistema *in vitro* para a manutenção de células e tecidos viáveis, em ambiente controlado e favorável, ou seja num meio que proporcione os nutrientes indispensáveis à sua sobrevivência, crescimento e multiplicação. Assim, torna-se necessário garantir as condições ambientais propícias, tais como o pH entre 6,8 e 7,4, a temperatura a 37°C e a concentração de CO₂ a 5%.

Para a realização dos estudos *in vitro* recorreu-se a linhas celulares de cancro do pulmão e a uma linha de linfoma. As linhas celulares de cancro do pulmão foram três, uma linha celular de cancro do pulmão de pequenas células designada por NCI-H69 (ATCC® HTB-119™) e duas linhas celulares de cancro do pulmão de não pequenas células designadas por A549 (ATCC® CCL-185™) e por NCI-H1299 (ATCC® CRL-5803™). A linha celular de linfoma é de difuso de grandes células B, designada

por Farage (ATCC® CRL-2630™). Estas linhas celulares foram adquiridas à *American Type Culture Collection (ATCC®)* e mantidas em cultura de acordo com as suas recomendações. O meio *Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Sigma Aldrich® R-4130, St. Louis, EUA)* foi utilizado para a cultura das linhas celulares NCI-H69, A549 e Farage e o *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Aldrich® D-5648, St. Louis, EUA)* foi utilizado na cultura da linha celular H1299.

A linha celular de cancro do pulmão de pequenas células NCI-H69, designada por H69, foi estabelecida a partir de tecido de um doente do género masculino, de 55 anos de idade, caucasiano e apresenta amplificação do gene *MYCN* e expressão de mRNA de *c-Myb*, de *v-Fes*, de *v-Fms*, de *c-Raf 1*, de *c-H-ras* e de *N-Ras* (Little *et al*).

A linha celular A549 é uma linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células do tipo II que representa as células basais do epitélio alveolar. São células escamosas que apresentam positividade por imunoperoxidase para a queratina e que sintetizam lecitina com percentagem elevada de ácidos gordos, através da via da difosfocolina citidina. Esta linha celular foi estabelecida a partir de tecido carcinomatoso de um doente caucasiano, do género masculino, de 58 anos (Giard *et al*, 1973).

A linha celular NCI-H1299, designada por H1299, é uma linha de células epiteliais de cancro do pulmão de não pequenas células, que foram obtidas a partir de tecido isolado de um gânglio linfático de um doente do género masculino de 43 anos de idade, caucasiano. Esta linha celular é capaz de sintetizar o peptídeo neuromedina B (do inglês *peptide neuromedin B*) (NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line supplement., 1996).

A linha celular Farage é uma linha celular de linfoma difuso de grandes células B, estabelecida em 1990, a partir de uma biópsia ganglionar de uma doente caucasiana. Estas células caracterizam-se por não expressarem imunoglobulina de superfície ou citoplasmática e pela expressão do gene da *TdT* (do inglês *deoxynucleotydyl transferase gene*) e pela ausência dos genes *RAG* (do inglês *recombination activating genes*) -1 e -2, marcadores conhecidos da fase de pré-células B (Baruch *et al*, 1996).

As linhas celulares H69 e Farage crescem em suspensão enquanto as linhas celulares A549 e H1299 crescem em monocamada aderente.

A composição dos meios de cultura foi completada conforme recomendado. Assim, ao meio DMEM foi adicionado soro fetal bovino (FBS, do inglês fetal bovine serum: Sigma F-7524, St. Louis, EUA) de modo a perfazer a concentração de 10%, piruvato de sódio (GIBCO 11360, Paisley, RU) de modo a perfazer a concentração de 100 mM e antibiótico (100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina; GIBCO 15240, Paisley, RU) de modo a perfazer a concentração de 1%. Ao meio de cultura RPMI foi adicionado FBS de modo a perfazer a concentração de 10%, piruvato de sódio de modo a perfazer a concentração de 400 mM e antibiótico de modo a perfazer a concentração de 1%.

Radiação ionizante

A irradiação das culturas celulares foi realizada no acelerador linear de raios X, descrito abaixo. Para a irradiação prepararam-se suspensões celulares das linhas celulares H69, A549, H1299 e Farage na densidade de $0,5 \times 10^6$ células/mL, no volume necessário para realizar todas as experiências pretendidas.

As suspensões celulares foram transferidas para tubos do tipo falcon com um volume de 10 mL, devidamente identificados para cada condição, sempre com o cuidado de o volume da suspensão celular perfazer o volume máximo do tubo, de modo a não conter ar aquando da irradiação. As doses de radiação usadas foram de 2 Gy, de 5 Gy, de 8 Gy, de 12 Gy, de 15 Gy, de 30 Gy e de 60 Gy para o ensaio clonogénico e de 0,5 Gy, de 15 Gy, de 30 Gy e de 60 Gy para os estudos subsequentes. Foram realizados controlos em todos os ensaios, ou seja, células que passaram por todos os procedimentos da experiência com exceção da irradiação (0 Gy). Foi também realizada a irradiação de tubos falcon só com os meios de cultura, RPMI e DMEM.

De forma a garantir uma irradiação reprodutível, fiável e com deposição homogénea de dose em todo o volume, recorreu-se a um fantoma de acrílico com paredes de 1 cm de espessura, com dimensões e referências para o posicionamento gravadas em relevo e em tudo compatíveis com as condições habituais de operação do acelerador linear e para as quais se encontra certificada. Assim, foi possível garantir condições de posicionamento e de acondicionamento

reprodutíveis, bem como a homogeneidade da dose depositada como se pode verificar na Figura 11, na Figura 12 e na Figura 13. A caixa de irradiação foi concebida e construída no Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, e foi realizado o estudo dosimétrico, através de imagens de tomografia computadorizada da mesma, equivalente ao efetuado aos doentes submetidos a tratamento por radioterapia.

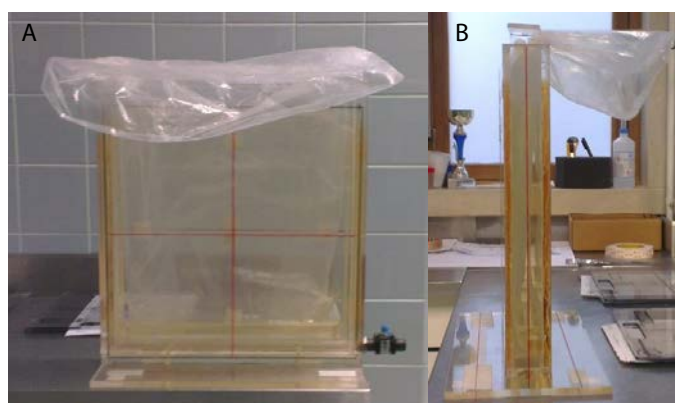


Figura 11: Fotografias da caixa de irradiação, construída em acrílico, utilizada para a irradiação das células. Representação dos planos sagital (B) e frontal (A).

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

Para assegurar a homogeneidade de dose recebida pelas células, os tubos falcon foram submersos em água, à temperatura de aproximadamente 37°C, e a caixa de irradiação foi posicionada com o seu eixo longitudinal paralelo ao eixo central do feixe. Preparada a caixa com as amostras iniciou-se a sessão. A deposição da dose fez-se em duas fases, uma com a gantry posicionada a 90° e outra com a gantry posicionada a 270°, de modo que a dose total fosse de 0,5 Gy. Após esta irradiação, retiram-se da caixa os tubos falcon correspondentes a 0,5 Gy e os restantes permaneceram para nova irradiação. Este procedimento foi repetido de forma

sucessiva até completar todas as doses estudadas.

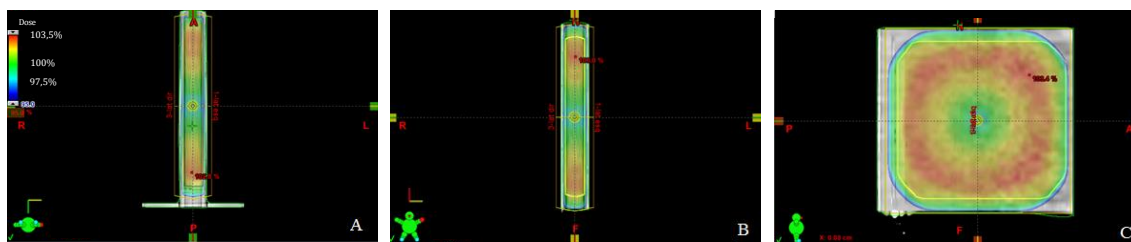


Figura 12: Representação da distribuição da dose na caixa de irradiação. Representação dos planos transversal (A), frontal (B) e sagital (C) da caixa de irradiação, com a distribuição de dose sendo o mínimo 95% a azul e o máximo 106% a vermelho, determinado por tomografia computadorizada.

As doses administradas estão descritas na Tabela 5 e a Figura 14 demonstra que a dose administrada nas diferentes posições corresponde à pretendida. Para cada sessão de irradiação o acelerador foi disponibilizado por cerca de 20 a 30 minutos, com período efetivo de feixe de 20 minutos.

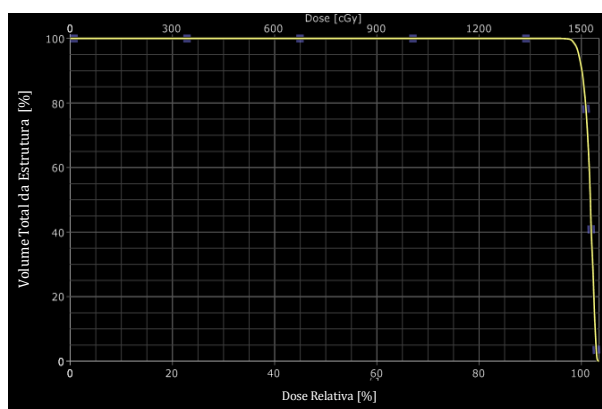


Figura 13: Histograma de volume de dose da caixa de irradiação. O gráfico representa a relação entre a taxa de volume estrutural total e a dose relativa.

Tabela 5: Doses administradas às amostras, na caixa de irradiação. Unidades de motor (MU, do inglês *monitor units*; 1MU=0,022 Gy).

Dose	0,5 Gy	2 Gy (0,5+1,5)	5 Gy (2+3)	8 Gy (5+3)	12 Gy (8+4)	15 Gy (12+3)	30 Gy (15+15)	60 Gy (30+30)
Lado direito	23 MU	67 MU	133 MU	133 MU	178 MU	133 MU	669 MU	1387 MU
Lado esquerdo	23 MU	67 MU	134 MU	134 MU	179 MU	134 MU	669 MU	1387 MU

Finalizada a irradiação, procedeu-se então à realização dos ensaios laboratoriais, descritos de seguida.

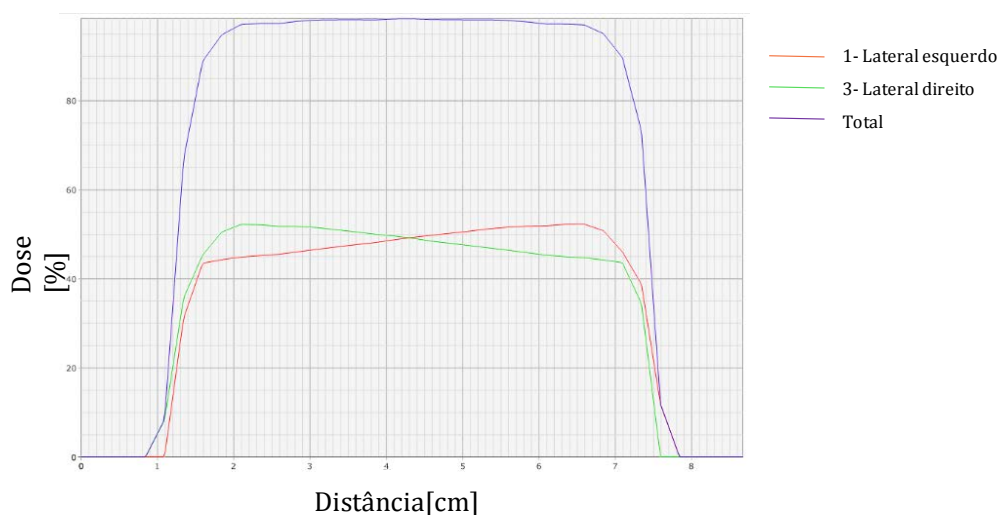


Figura 14: Perfil de dose. As curvas da dose depositada em cada um dos lados da caixa de irradiação estão representadas a verde e a vermelho. A curva em azul mostra a soma das duas doses, que reflete a dose total depositada.

Ensaio clonogénico

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

Para a exposição a radiação todas as linhas celulares foram irradiadas em tubos *falcon*, pelo que foi necessário apenas homogeneizar as culturas e retirar o número de células pretendidas para cada linha celular e distribuir por placas de 6 poços (Starstedt AG & Co, Alemanha, Nümbrecht).

No caso da linha celular Farage e H69 adicionou-se um número conhecido de células tratadas com cada dose de radiação (número de células semeadas) conforme descrito na Tabela 6 e fez-se com meio de cultura enriquecido com metilcelulose (M7027, Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) na concentração de 1%, até perfazer o volume de 3 mL. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, durante sete dias, momento em que se realizou a coloração com uma solução de violeta de cristal (C3886, Sigma-Aldrich®, China) na concentração de 0,5% em solução de metanol (32213, Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) e posterior contagem das

colónias formadas.

No que diz respeito às linhas celulares aderentes, A549 e H1299 adicionou-se um número conhecido de células tratadas com cada dose de radiação (número de células semeadas) conforme descrito na Tabela 6 e per fez-se cada poço com 3 mL do meio de cultura apropriado a cada linha celular. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, durante 12 dias. Nestas culturas celulares, para se efetuar a contagem das colónias, descartou-se o meio das placas, lavou-se cada poço com 2 mL de tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*) constituído por NaCl (Sigma, S7653) na concentração de 137 mM, KCl (Sigma, P9333) na concentração de 2,7 mM, NaH₂PO₄ (Sigma, S5011) na concentração de 10 mM e KH₂PO₄ (Sigma, P0662) na concentração de 1,8 mM, com pH ajustado a 7,4. Após a lavagem, adicionaram-se 2 mL de metanol a cada poço e deixou-se fixar durante cinco minutos. Após este período de tempo, descartou-se o metanol, deixou-se secar e repetiu-se o procedimento. De seguida, adicionaram-se 2 mL de uma solução de violeta de cristal em metanol na concentração de 0,5% e deixou-se por mais cinco minutos, após os quais o corante foi aspirado e as placas lavadas em água tépida, agitando suavemente.

Deixaram-se as placas secar e procedeu-se à contagem das colónias com mais de 50 células. Com este procedimento foi possível calcular a eficiência da placa (PE, do inglês *plate efficiency*) e o fator de sobrevivência (SF, do inglês *surviving factor*) de acordo com a Equação 5 e com a Equação 6, respetivamente (Franken et al, 2006; Balça-Silva et al, 2012).

Tabela 6: Número de células plaqueadas após irradiação, por dose e por linha celular.

	Control o	0,5 Gy	2 Gy	5Gy	8Gy	12Gy	15 Gy	30 Gy	60Gy
H69	7x10 ⁴	8x10 ⁴	8x10 ⁴	1x10 ⁵	1x10 ⁵	1x10 ⁵	1,4x10 ⁶	1,5x10 ⁶	3x10 ⁶
A549	1x10 ³	1x10 ³	1,5x10 ³	1,5x10 ³	1,5x10 ³	1,5x10 ³	2x10 ³	2x10 ³	2,5x10 ³
H1299	1x10 ⁴	8x10 ⁴	8x10 ⁴	1x10 ⁵	1x10 ⁵	1x10 ⁵	1,4x10 ⁸	1,5x10 ⁸	3x10 ⁸
Farage	4x10 ⁵	4x10 ⁵	6x10 ⁵	6x10 ⁵	6x10 ⁵	8x10 ⁵	8x10 ⁵	8x10 ⁵	1x10 ⁶

$$\text{Eficiência da Placa (\%)} = \frac{\text{Número de colónias contadas}}{\text{Número de células semeadas}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

$$\text{Fator de Sobrevivência(\%)} = \frac{\text{PE das amostras tratadas}}{\text{PE das amostras de controlo}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Através dos resultados obtidos foi possível estabelecer curvas de dose-resposta, que relacionam a dose de radiação com o fator de sobrevivência celular para cada linha celular. Os resultados experimentais obtidos com os ensaios clonogénicos foram ajustados a um modelo linear-quadrático de acordo com a Equação 7,

$$\text{Fator de Sobrevivência} = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad \text{Equação 7}$$

onde D corresponde à dose de radiação e α e β correspondem, respetivamente, aos parâmetros linear e quadrático do ajuste.

Em algumas situações, o ajuste aos dados experimentais pôde ser otimizado quando $\beta = 0$, sendo a resposta determinada apenas pela componente linear da equação. Nestes casos, o modelo de ajuste correspondeu ao modelo de um só alvo e um só toque, de acordo com a Equação 8,

$$\text{Fator de Sobrevivência} = e^{-\frac{D}{D_0}} \quad \text{Equação 8}$$

onde D representa a dose de radiação e D_0 , a dose letal média. Neste modelo, $D_0 = \frac{1}{\alpha}$ com $\beta = 0$.

Viabilidade e proliferação celular

A viabilidade celular poderá ser monitorizada por diferentes métodos, nomeadamente, através da avaliação da integridade da membrana plasmática, da

quantificação da atividade enzimática, do conteúdo de DNA, da ocorrência ou não de síntese de DNA, da presença de trifosfato de adenosina, bem como através das condições redutoras das células. Estas metodologias são conhecidas e frequentemente utilizados como indicadores de viabilidade e de morte celular.

Ensaio do azul de tripano

A viabilidade das células das diferentes linhas celulares determinou-se com recurso ao método de exclusão do azul de tripano (GIBCO®, Paisley, RU) (Weisenthal *et al*, 1983). Este método baseia-se no princípio de que as células viáveis, uma vez que possuem a membrana celular intata, são impermeáveis ao azul de tripano, pelo que se mantêm claras e/ou brilhantes. Quando as células não são viáveis, as propriedades de barreira da sua membrana estão alteradas, pelo que se torna permeável ao azul de tripano, corando-as de azul (Gonçalves *et al*, 2013a, 2013b).

Para a realização deste ensaio homogeneizaram-se volumes iguais de cada suspensão celular e de solução de azul de tripano numa concentração de 0,02% e contaram-se as células brancas e as azuis observadas na esquadria da câmara de *neubauer*. A contagem das células realizou-se num microscópio ótico invertido *Motic AE31* com ampliação 100x (*Motic*®, Wetzlar, Alemanha) e com recurso a um hemocitómetro (BOECO and Co. Hamburgo, Alemanha). Os estudos foram realizados 24, 48, 72 e 96 horas após a irradiação. A viabilidade celular foi determinada de acordo com a Equação 9 e a proliferação celular de acordo com a Equação 10, em que L representa o número de células contadas em cada um dos quatro campos do hemocitómetro.

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{células vivas}}{\text{células vivas} + \text{células mortas}} \quad \text{Equação 9}$$

$$\text{Proliferação celular} \left(\frac{\text{cél}}{\text{mL}} \right) = \frac{L1 + L2 + L3 + L4}{4} \times 2 \times 10.000 \quad \text{Equação 10}$$

Este ensaio permitiu estabelecer curvas de dose-resposta.

Ensaio do Alamar Blue®

A avaliação dos efeitos da radiação na proliferação das linhas celulares de cancro do pulmão de não pequenas células H1299 e A549 realizou-se com recurso a um teste colorimétrico denominado por Alamar Blue®, um teste simples, reprodutível, de baixo custo e não tóxico, que utiliza a resazurina, um corante solúvel em PBS.

Este ensaio baseia-se na incorporação de resazurina pelas células, um corante azul (na forma oxidada), a qual atua nas células como um aceitador intermediário de eletrões da cadeia respiratória mitocondrial a nível do complexo IV (Perrot et al, 2003). Como resultado da reação de oxidação-redução, na presença de enzimas mitocondriais, a resazurina vai dar origem a resuforina, um complexo de cor rosa fluorescente, que representa a forma reduzida do composto. A alteração de cor pode ser posteriormente quantificada por espectrofotometria (absorvância).

Para a realização deste ensaio, adicionou-se aos poços das placas de experiência o reagente Alamar Blue®, de modo a obter uma concentração de 10% e incubou-se a 37°C até se verificar uma alteração significativa da cor do corante. O conteúdo dos poços foi transferido para placas de 96 poços (VWR 734-2327) o qual foi posteriormente lido num espectrofotómetro de microplacas. Neste método analisam-se as absorvâncias nos comprimentos de onda de 570nm, que corresponde à forma oxidada (azul) e de 600nm, que corresponde à forma reduzida (rosa). A diferença entre as absorvâncias dos dois comprimentos de onda considerados é proporcional ao número de células viáveis (Invitrogen Corporation, 1996; Nakayama *et al*, 1997; Gloeckner *et al*, 2001; Al-Nasiry *et al*, 2007; Dal, 2008; Balça-Silva *et al*, 2012; Alves *et al*, 2015).

Os estudos foram realizados 24, 48, 72 e 96 horas após a irradiação. A atividade metabólica celular foi determinada pela Equação 11.

Equação 11

$$\text{Percentagem de Proliferação (\%)} = \frac{(\text{abs570} - \text{abs600})_{\text{condição}}}{(\text{abs570} - \text{abs600})_{\text{controlo}}} \times 100$$

Este resultado deverá ter sempre em conta a subtração dos valores das absorvâncias dos poços brancos (poços apenas com meio de cultura com 10% de

reagente Alamar Blue®). Os dados resultantes são expressos como a percentagem de inibição de proliferação em relação às culturas de controlo, normalizadas para 100%. Este ensaio permitiu estabelecer curvas de dose-resposta.

Microscopia ótica e morfologia celular

A avaliação do tipo de morte celular foi analisada pelas características morfológicas com recurso à microscopia ótica após coloração das células com meio *May-Grünwald Giemsa*. Esta coloração constitui uma modificação à coloração de *Romanowsky*, uma coloração metacromática que demonstra a arquitetura geral celular, de forma rápida e fácil. Os corantes utilizados conferem propriedades cromáticas às células onde os núcleos aparecem corados de vermelho a violeta e o citoplasma de rosa a azul.

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

As fotografias foram obtidas a partir da câmara *AxioCam 1Cc3* (Zeiss, Munich, Alemanha) acoplada ao microscópio e, posteriormente, as imagens foram analisadas com recurso ao *software AxioVision* (Zeiss, Munich, Alemanha) para *Windows* da *Microsoft*. Os estudos foram realizados 48 horas após a irradiação.

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo permite contar, examinar e classificar células ou outras partículas microscópicas suspensas em meio líquido. Esta técnica permite analisar de forma rápida, várias características físicas e químicas de células em suspensão

através de um equipamento de deteção ótico-eletrónico.

No dia da irradiação, foram preparadas placas de 12 poços (Starstedt AG & Co, Nümbrecht, Alemanha), uma placa para cada linha celular, nas quais foram colocadas 10^6 células em cada poço, para cada condição, isto é, controlo (0 Gy), 0,5 Gy, 15 Gy, 30 Gy e 60 Gy. Para estes estudos, as linhas celulares em suspensão, Farage e H69, foram transferidas para tubos *falcon* correspondentes a cada linha celular e para cada dose de radiação, previamente identificados. No caso das linhas celulares aderentes, A549 e H1299, aspirou-se e reservou-se o meio de cultura de cada poço num tubo *falcon* identificado.

Quarenta e oito horas após a irradiação lavaram-se os poços com PBS, após o que foi aspirado e reservou-se no falcon correspondente. Adicionou-se a tripsina-EDTA e colocaram-se as placas a incubar durante cinco minutos a 37°C, de modo a destacar as células. Posteriormente confirmou-se ao microscópio o destacamento celular, inibiu-se a atuação da tripsina com o meio de cultura e colocou-se a suspensão no tubo *falcon* respetivo.

Todas as suspensões celulares obtidas foram centrifugadas a 500xG durante 5 minutos, suspendeu-se o sedimento em 1 mL de PBS e transferiu-se para tubos de citometria (BD Falcon™ 352054). Centrifugou-se novamente a suspensão celular a 500xG durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Os sedimentos ficaram prontos para ser submetidos às marcações de interesse, descritas de seguida.

Para todos os estudos de citometria de fluxo o número de eventos considerado foi igual a 10.000, obtidos através do programa *CellQuest™* (Spectroncorp, Washington, EUA). Para a análise e a quantificação da informação, utilizou-se o programa específico *Paint-a-Gate 3.02*, *Machintosh Software* (BD Biosciences, Franklin Lakes, EUA) que corre em computador dedicado.

Tipos de morte celular

Para caracterizar o tipo de morte celular recorreu-se à dupla marcação com anexina V (AV) e iodeto de propídeo (IP) (*FITC Annexin V Apoptosis Detection kit I*, *BD Pharmingen*, E.U.A.). A anexina V permite identificar células que se encontram em apoptose, uma vez que esta proteína se liga especificamente à fosfatidilserina,

um fosfolípido do folheto interno da bicamada lipídica que, nas células em apoptose, é translocada para o folheto externo da membrana celular. O iodeto de propídeo é um corante que se intercala no DNA das células e emite fluorescência, que assinala os núcleos das células que se encontram em apoptose tardia ou em necrose. Esta abordagem permite caracterizar quatro grupos celulares: o grupo das células viáveis, duplamente negativas para a anexina V e para o iodeto de propídeo, o grupo das células em apoptose inicial, apenas positivas para a anexina V, o grupo das células em apoptose tardia ou necrose, duplamente positivas para a anexina V e para o iodeto de propídeo e o grupo das células em necrose, positivas apenas para o iodeto de propídeo.

Após suspensão do sedimento celular obtido, tal como descrito, em 100 μ L de tampão de ligação, constituído por HEPES (Sigma H7523) na concentração de 0,01 M, NaCl (Sigma S7653) na concentração 0,14 M, CaCl₂ (Sigma C4901) na concentração de 0,25 mM, adicionaram-se 5 μ L de anexina V marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês fluorescein isothiocyanate) e 2 μ L de iodeto de propídeo e incubou-se durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Posteriormente adicionaram-se 400 μ L de tampão de ligação e procedeu-se à análise no citómetro *FACSCalibur* (BD Biosciences, California, EUA) utilizando os comprimentos de onda de excitação de 494 nm e de emissão de 519 nm para a anexina-V-FITC e os comprimentos de onda de excitação de 351 nm e de emissão de 617 nm para o iodeto de propídeo.

Os resultados foram apresentados sob a forma de percentagem de células em cada grupo (Gonçalves *et al*, 2013a, 2013b; Laranjo *et al*, 2013; Santos *et al*, 2014).

Expressão de moléculas pró e anti-apoptóticas

Para a avaliação da relação entre a expressão de BAX e de BCL-2, as células foram preparadas como descrito anteriormente. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 100 μ L de solução de fixação (*Immunostep, Intracell Kit*) e incubou-se durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente.

Posteriormente adicionaram-se 2 mL de PBS, centrifugou-se novamente a 500xG durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. De seguida,

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

Potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado com recurso à sonda fluorescente *5,5',6,6'-tetrachloro-1,18,3,3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide* (JC1). O JC1 é um catião lipofílico que se pode apresentar sob duas formas, em monómeros (M) ou em agregados (A), consoante o estado de polarização ou de despolarização da membrana mitocondrial, o que determina a emissão de fluorescência com comprimentos de onda diferentes. Quando o potencial de membrana é elevado, formam-se agregados que emitem fluorescência vermelha com comprimento de onda da ordem dos 590 nm. Contudo, à medida que o potencial de membrana mitocondrial diminui, ou em casos em que a membrana mitocondrial se encontra despolarizada, o JC1 é excluído da mitocôndria pelo que se mantém no citoplasma sob a forma de monómeros, que emitem fluorescência verde com comprimento de onda da ordem dos 529 nm.

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

Para a realização destes estudos, uma solução de cerca de 10⁶ células em PBS foram centrifugadas durante 5 minutos a 500xG e, posteriormente, suspensas num

1 mL do mesmo tampão. As suspensões celulares foram incubadas durante 15 minutos à temperatura de 37°C e ao abrigo da luz com 1 µL de JC1 (Sigma T4069), preparado na concentração de 5 mg/mL em dimetilsulfóxido. De seguida, realizou-se nova lavagem com PBS com recurso a centrifugação e suspenderam-se as células em 400 µL do mesmo tampão. A deteção foi efetuada no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences).

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

Stresse oxidativo - peróxidos, anião superóxido e glutathiona reduzida

O stresse oxidativo foi avaliado pelos níveis de espécies reativas de oxigénio e da defesa antioxidante GSH. A sonda 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH₂-DA) permite a deteção de peróxidos intracelulares, uma vez que a sua concentração é diretamente proporcional à intensidade da fluorescência emitida pela sonda. Esta sonda emite uma cor verde detetada no comprimento de onda de 530 nm quando é oxidada e no comprimento de onda de 488 nm quando se encontra excitada. A molécula DCFH₂-DA é constituída por grupos acetato e, por esse motivo, consegue facilmente atravessar a membrana citoplasmática e dispersar-se no meio intracelular. Após a entrada no citosol sofre remoção do grupo DA por parte de esterases, formando-se DCFH₂. Esta molécula é oxidada pelos peróxidos com formação de DCF, que é fluorescente.

As suspensões celulares foram centrifugadas a 500xG durante 5 minutos, recuperado o sedimento, ao qual se adicionou 1 mL de PBS. A esta suspensão foi adicionado 1 µL da sonda DCFH₂-DA (Molecular Probes, Invitrogen), na concentração de 5 mM diluída em dimetilformamida. A incubação foi realizada durante 45 minutos, na ausência de luz e à temperatura de 37 °C (Laranjo, 2010). Após o período de incubação, realizou-se uma lavagem com PBS com recurso a centrifugação a 500xG durante 5 minutos após o que o sedimento foi suspenso em 400 µL de PBS. Após agitação em vortéx, analisou-se no citómetro utilizando os

comprimentos de onda de excitação 494 nm e de emissão de 519 nm. Os resultados são apresentados em média de intensidade de fluorescência normalizados relativamente ao controlo (Gonçalves *et al*, 2013a; Laranjo *et al*, 2013).

O dihidroetídio (DHE) é uma sonda utilizada para a deteção de espécies reativas de oxigénio, visto que, após oxidação pelo radical superóxido e da sua intercalação no DNA, emite uma fluorescência na zona do vermelho. O DHE é oxidado com formação de etídio, sendo esta a porção que se intercala no DNA. Para esta avaliação as suspensões celulares foram centrifugadas a 500xG durante 5 minutos e o sedimento foi suspenso em 1 mL de PBS. Posteriormente, a suspensão foi incubada com a sonda DHE (Sigma-Aldrich) na concentração de 5 µM em dimetilsulfóxido, a 37°C, na ausência de luz, durante 15 minutos. De seguida a suspensão foi lavada com centrifugação a 500xG durante 5 minutos. A análise foi realizada no citómetro com um comprimento de onda de excitação de 496 nm e de emissão de 578 nm (Gonçalves *et al*, 2013a; Laranjo *et al*, 2013). Os resultados apresentam-se expressos em média de intensidade de fluorescência normalizados relativamente ao controlo.

A glutationa reduzida (GSH) é um nucleófilo forte que confere proteção das células contra lesão induzida por radicais livres, oxidantes e eletrófilos. A modulação das concentrações de GSH pode influenciar a sensibilidade das células à radioterapia, bem como o efeito citotóxico de diferentes agentes quimioterapêuticos (Rice *et al*, 1986). O método para a quantificação de GSH baseia-se no uso de um composto denominado alaranjado de mercúrio. Este composto liga-se aos grupos sulfidril das proteínas, sendo que a sua cinética de ligação ao GSH é superior à da sua ligação aos grupos sulfidril referidos anteriormente.

Para a deteção, as suspensões celulares com aproximadamente 3×10^6 células foram centrifugadas a 500xG, durante 5 minutos e suspendeu-se o sedimento num 1 mL de PBS. Adicionou-se o alaranjado de mercúrio (Sigma, EUA) de modo a obter uma concentração de 40 µM e incubou-se à temperatura de 37°C, na ausência de luz, durante 15 minutos. Após a marcação, as células foram lavadas com centrifugação a 500xG, durante 5 minutos e suspendeu-se o sedimento em 400 µL de PBS. A deteção foi efetuada com o comprimento de onda de excitação de 496nm e de emissão de 578 nm (Gonçalves *et al*, 2013b). Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência e posteriormente normalizados relativamente ao

controlo.

Ciclo celular

Para determinar o efeito antiproliferativo da radiação, avaliou-se o ciclo celular por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo. O iodeto de propídeo intercala-se na dupla cadeia de DNA, pelo que a quantidade de corante ligado é proporcional à quantidade de DNA presente no núcleo. Este corante também se liga ao RNA, sendo necessário proceder à sua remoção com recurso ao tratamento com nucleases (RNases). A quantificação do conteúdo de DNA permite conhecer a distribuição de uma população de células ao longo das diferentes fases do ciclo celular: fase G₀/G₁, fase S e fase G₂/M. Para além do previamente mencionado, esta técnica pode ainda permitir a identificação de um pico pré-G₀/G₁, que corresponde às células que se encontram em apoptose. A avaliação foi feita através de *PI/RNase solution* (PI/RNase, *Immunostep*, S.L., Salamanca, Espanha).

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

Genotoxicidade

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

ensaio, ao ser aplicada uma diferença de potencial, as células viáveis e sem lesão ou alteração do DNA formam uma esfera densa e compacta sem qualquer arrastamento de fragmentos, enquanto as células cujo DNA apresenta quebras ao longo das cadeias formam uma cauda menos intensa que o núcleo (mimetizando a cauda de um cometa, dando assim origem à designação do ensaio). Neste ensaio, o tamanho e forma da cauda re letem a extensão da lesão induzida no DNA.

Uma das variantes do ensaio cometa original, a alcalina, permite detetar lesões em apenas uma das cadeias do DNA, lesões em ambas as cadeias e detetar locais lábeis a pH alcalino, que são o resultado de lesões causadas pela alquilação de bases ou dos seus grupos fosfato. Este método permite pois visualizar todos os tipos de lesões que um composto ou a radiação podem causar no DNA. Este ensaio permite ainda considerar a eventual heterogeneidade de uma amostra e verificar a existência de células resistentes ao tratamento, pois ao analisar uma amostra de grandes dimensões é possível distinguir se esta é afetada de igual modo ou não pelo tratamento. No caso da presença de células resistentes, observam-se células com o DNA intato numa amostra onde se encontram igualmente células com DNA danificado. Os estudos foram realizados 48 horas após a irradiação.

Para as linhas celulares aderentes A549 e H1299, retirou-se o meio de cultura para tubos devidamente identificados, procedeu-se a uma lavagem com PBS, o qual depois de recolhido foi adicionado aos tubos respetivos. Adicionou-se às células uma solução de tripsina-EDTA que proporcionou a sua separação do substrato. A tripsina foi inativada com meio de cultura e as células foram adicionadas aos meios de cultura e tampão de fosfato anteriormente reservados. A suspensão celular foi centrifugada a 300xG durante 5 minutos e depois suspensa em PBS, tendo sido ajustada a concentração celular para 50.000 células/mL.

As linhas celulares não aderentes H69 e Farage foram transferidas para falcons devidamente identificados e suspensas de modo a obter uma concentração de 50.000 células/mL.

O controlo positivo foi preparado a partir da cultura celular controlo (0 Gy). As células foram expostas a peróxido de hidrogénio numa concentração de 20 nM, durante 15 minutos a 4°C. Após esse período, as células foram centrifugadas a 500xG por 5 minutos e suspensas em PBS, de forma a manter a concentração celular de

50.000 células/mL.

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

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

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

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

A análise e aquisição de imagens foram efetuadas num microscópio de fluorescência *Motic AE31* (Motic®, Wetzlar, Alemanha), equipado com um filtro de excitação de 546 nm e com uma lâmpada de mercúrio de 100W. A emissão de fluorescência foi monitorizada no comprimento de onda de 580 nm no refletor com um filtro de 590 nm (Olive & Banáth, 2006). A observação foi realizada com uma ampliação de 250X e a aquisição de imagem foi realizada no *software Motic Images*

versão 2.0 (*Microscope World*, EUA). A análise dos cometas foi feita com recurso ao software *TritekCometScore™ Freeware* v.1.5 (Tritekcorp, Virginia, EUA).

Expressão da P53 e de P53 fosforilada

A avaliação da expressão e da ativação da P53, uma proteína importante na resposta à radioterapia, foi realizada por *western blot*. Este método permite detetar proteínas específicas numa determinada amostra de homogeneizado de tecido ou num extrato celular. As proteínas de uma amostra são inicialmente separadas por eletroforese em gel, separação feita com base no ponto isoelétrico, no peso molecular, na carga elétrica ou numa combinação destas características. Para isto são utilizados géis de poliacrilamida e soluções desnaturantes com dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*). Esta substância é um detergente capaz de conferir carga negativa às proteínas, o que permite a sua separação mediante o seu peso molecular através do eléctrodo positivo do gel de poliacrilamida. Quando se aplica uma diferença de potencial no gel, as proteínas migram ao longo deste com diferentes velocidades.

Após a migração das proteínas, faz-se a sua transferência para uma membrana de nitrocelulose ou de difluoreto de polivinilideno (PVDF), onde são analisadas e detetadas, com recurso a anticorpos específicos para a proteína alvo, neste caso a proteína P53. Durante esta etapa, é introduzido na amostra um anticorpo primário, com o objetivo de marcar as proteínas como antigénios. Uma vez marcadas as proteínas, estas podem ser facilmente identificadas com recurso a um anticorpo secundário, que se irá ligar especificamente ao anticorpo primário.

Para esta avaliação foi necessário a preparação de extratos de proteína total das quatro linhas celulares, (H69, A549, H1299 e Farage), cultivadas durante 48 horas após irradiação com 0,5 Gy, com 15 Gy ou com 30 Gy.

Para este fim utilizaram-se frascos de cultura de 75 cm² de células das quatro linhas celulares. No fim do período de incubação, o meio de cultura foi descartado e, em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS frio. A cada frasco de cultura com células aderentes (linhas celulares A549 e H1299) foram adicionados 350 µL de tampão de lise para radioimunoprecipitação (RIPA, do inglês

radio-immunoprecipitation assay buffer), constituído por NaCl na concentração de 150 mM, Tris na concentração de 50 mM, ácido tetracético etileno glicol (EGTA, do inglês *ethylene glycol tetraacetic acid*) na concentração de 5 mM, Triton na concentração de 1%, desoxicolato de sódio na concentração de 0,5% e SDS na concentração de 1%, suplementado no momento de uso com uma mistura de inibidores de proteases, *cOmplete Mini* na concentração recomendada (Roche 11836153001) e com ditioneitol (DTT, do inglês *dithiothreitol*) na concentração de 1 μ M. Para a preparação dos extratos para a quantificação da proteína P53 fosforilada à solução previamente mencionada adicionou-se *PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail* na concentração recomendada (Roche 04906837001). Com o auxílio de raspadores, foi possível soltar as células da superfície do frasco e facilitar a lise.

No caso das duas linhas celulares não aderentes (H69 e Farage), após homogeneização das mesmas nos frascos de cultura, estas foram transferidas para *falcons* de 50 mL e centrifugadas a 1000xG durante 5 minutos. Após centrifugação, descartou-se o meio e adicionou-se o respetivo tampão de lise, com a composição descrita.

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

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

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

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

Terminado o período de eletroforese, os géis foram colocados em contacto direto com as membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês *polyvinylidene fluoride*; Bio-Rad, EUA), previamente ativadas com metanol. A eletrotransferência realizou-se em tampão de ácido N-ciclo-hexil-3-aminopropanossulfónico (CAPS, do inglês *N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid*, Sigma) na concentração de 100 mM, com pH=11, e de metanol na concentração de 10%, com uma diferença de potencial de 100 V, durante uma hora.

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

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

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

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

Análise estatística

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

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

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

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

IConf 95% não englobasse o valor 1.

As curvas de dose-resposta para os estudos de citotoxicidade foram obtidas através do ajuste dos dados experimentais a uma curva sigmoideal, com recurso ao *software OriginPro* utilizando o modelo “DoseResp”. As curvas referentes aos ensaios clonogénicos foram obtidas considerando os seguintes modelos: linear quadrático ($SF = e^{-\alpha D - \beta D^2}$) e o modelo linear de agressão celular ($SF = e^{-\frac{D}{D_0}}$), com recurso ao mesmo *software*.

Foi considerado um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Sobrevivência e viabilidade celular

A radiação ionizante, de um modo geral, induziu uma diminuição da viabilidade e da sobrevivência em todas as linhas celulares. Esta diminuição da viabilidade e da sobrevivência celulares é dependente da dose de radiação, do tempo decorrido após a exposição à radiação, bem como da linha celular em estudo.

A Figura 15 representa as curvas de sobrevivência da linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69, das linhas celulares de cancro do pulmão de não pequenas células A549 e H1299 e da linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage após exposição a doses de radiação até 12 Gy.

As curvas de sobrevivência celular foram estabelecidas de acordo com o modelo linear para a linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69 e para a linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549 e com o modelo linear-quadrático para a linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299 e para a linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage. Com estas curvas foi possível determinar as doses letais médias (DL_{50}) para as linhas celulares, conforme descrito na Tabela 7.

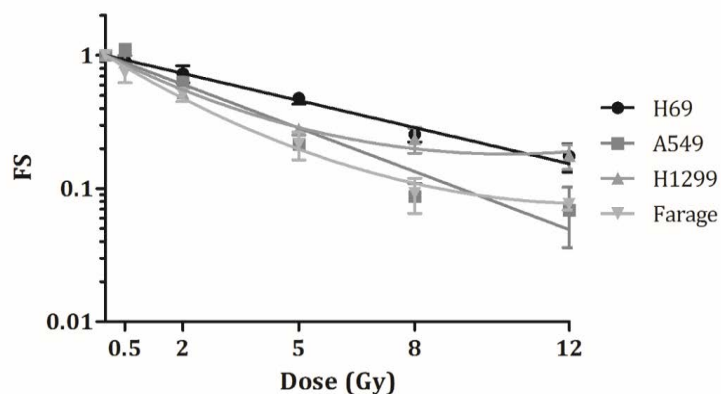


Figura 15: Curvas de sobrevivência celular obtidas em resposta à irradiação das linhas celulares de cancro do pulmão de pequenas células H69, de cancro do pulmão de não pequenas células H1299 e A549 e de linfoma difuso de grandes células B Farage. A sobrevivência celular foi obtida através do ensaio clonogénico. Os pontos experimentais correspondem à média e ao erro padrão de pelo menos 5 ensaios independentes. A curva representa o ajuste à melhor função.

A linha celular de cancro de pulmão de pequenas células H69 é a mais radorresistente, com um DL_{50} de 4,46 Gy, enquanto a linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage é a mais radiosensível, com um DL_{50} de 1,73 Gy. No que respeita às linhas celulares de cancro do pulmão de não pequenas células obteve-se um DL_{50} de 1,95 Gy para a linha celular A549 e um DL_{50} de 2,77 Gy para a linha celular H1299.

Tabela 7: Modelos de agressão celular e doses letais médias calculados após exposição das linhas celulares à radiação com doses de 0,5 Gy, de 2 Gy, de 5 Gy, de 8 Gy e de 12 Gy.

Linha Celular	P	V±EP	R ² ±EP	α/β±EP	DL ₅₀ ±EP (Gy)	MAC
H69	α	0,159±0,02	0,98±0,02	---	4,46±0,32	Linear
	β	---				
A549	α	0,259±0,027	0,94±0,04	---	2,77±0,13**	Linear
	β	---				
H1299	α	0,332±0,016	0,99±0,01	20,90±1,17	1,95±0,13***	Linear Quadrático
	β	0,016±0,003				
Farage	α	0,412±0,118	0,98±0,01	61,37±37,82	1,73±0,27***#	Linear Quadrático
	β	0,016±0,011				

Legenda: P, parâmetro; V, valor; EP, erro padrão; R², coeficiente de determinação; DL₅₀, dose letal média; MAC, modelo de agressão celular. As diferenças significativas entre a linha celular H69 e as restantes linhas celulares estão representadas com ** para p<0,01 e com *** para p<0,001 e as diferenças significativas entre a linha celular A549 e a linha celular Farage estão representadas com # para p<0,05.

A dose letal média da linha celular de cancro de pulmão de pequenas células H69 foi significativamente superior à das linhas celulares de cancro de pulmão de não pequenas células A549 ($p=0,001$) e H1299 ($p<0,001$) e à da linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage ($p<0,001$).

A dose letal média da linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549 é significativamente superior à da linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage ($p=0,038$), a qual apresenta o valor mais baixo.

No que respeita à resposta às doses de radiação mais elevadas, nomeadamente, com as doses de 15 Gy, de 30 Gy e de 60 Gy, também se observou diminuição das sobrevivências celulares com o aumento das doses de radiação nas quatro linhas celulares, como podemos ver na Figura 16.

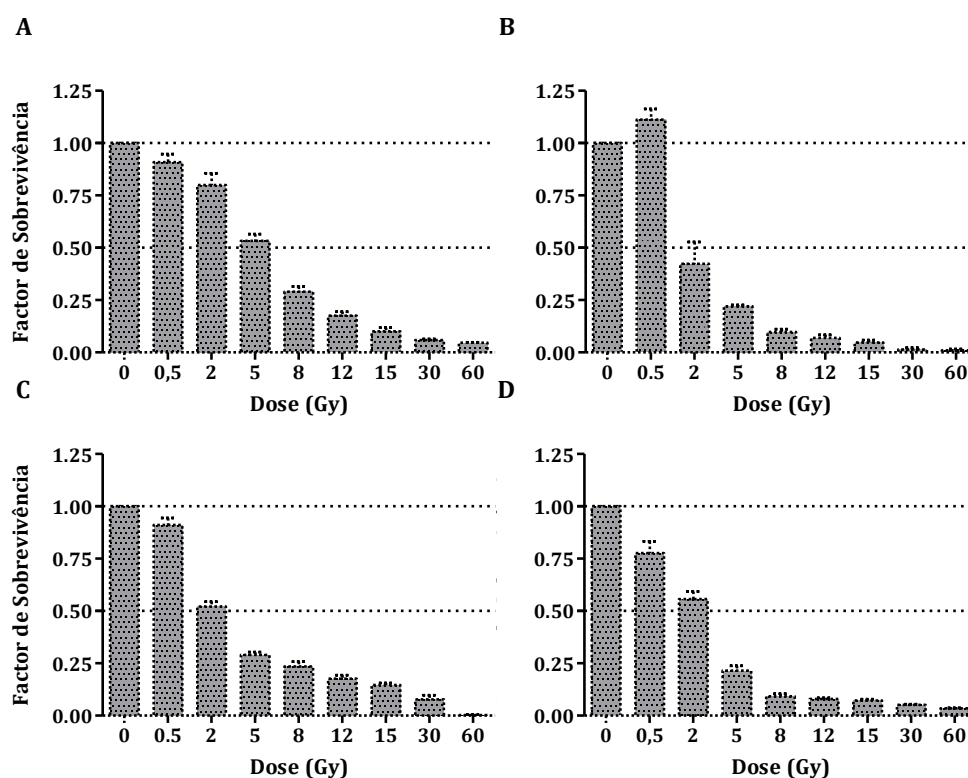


Figura 16: Sobrevivência celular da linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69 (A), das linhas celulares de cancro do pulmão de não pequenas células A549 (B) e H1299 (C) e da linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage (D), após irradiação com doses até 60 Gy. A sobrevivência celular foi obtida através do ensaio clonogénico. Os gráficos representam a média e ao erro padrão de pelo menos 5 ensaios independentes.

A Figura 17 e a Figura 18 representam as viabilidades das linhas celulares de cancro do pulmão de não pequenas células A549 e H1299, que crescem em

monocamada aderente, após exposição à radiação. Verificou-se uma diminuição significativa da viabilidade celular de forma dependente da dose e do tempo após irradiação, em relação às culturas celulares controlo.

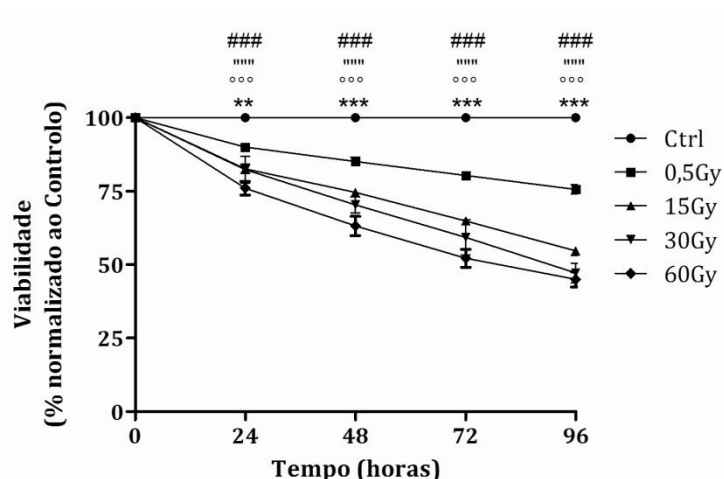


Figura 17: Curvas de dose-resposta obtidas para a linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549 24h, 48h, 72h e 96h após exposição à radiação ionizante. A viabilidade das células aderentes foi obtida através do ensaio de Alamar Blue®. Os resultados são apresentados na forma de percentagem, normalizados em relação ao controlo. Os pontos experimentais representam a média e o erro padrão de pelo menos seis ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com * para 0,5 Gy, em que ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$, com ° para 15 Gy, em que °° significa $p < 0,01$ e °°° significa $p < 0,001$, com " para 30 Gy, em que "" significa $p < 0,01$ e """" significa $p < 0,001$ e com # para 60 Gy, em que ## significa $p < 0,01$ e ### significa $p < 0,001$.

Detalhadamente, para a linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549, como representado na Figura 17, 24 horas após a exposição a radiação, obtiveram-se viabilidades celulares de $82,67 \pm 1,54\%$ com a dose de 15 Gy ($p < 0,001$), de $82,33 \pm 1,86\%$ com a dose de 30 Gy ($p < 0,001$) e de $76,00 \pm 0,93\%$ com a dose de 60 Gy ($p < 0,001$), significativamente inferiores à do controlo. Quarenta e oito horas após a irradiação obtiveram-se viabilidades celulares de $85,17 \pm 1,45\%$ com a dose de 0,5 Gy ($p = 0,008$), de $74,67 \pm 1,17\%$ com a dose de 15 Gy ($p < 0,001$), de $70,33 \pm 1,12\%$ com a dose de 30 Gy ($p < 0,001$) e de $63,17 \pm 1,31\%$ com a dose de 60 Gy ($p < 0,001$), significativamente inferiores à do controlo. Setenta e duas horas após a irradiação obtiveram-se viabilidades celulares de $80,33 \pm 1,05\%$ com a dose de 0,5 Gy ($p = 0,008$), de $64,83 \pm 1,40\%$ com a dose de 15 Gy ($p < 0,001$), de $59,33 \pm 2,24\%$ com a dose de 30 Gy ($p < 0,001$) e de $52,17 \pm 1,25\%$ com a dose de 60 Gy ($p < 0,001$), significativamente inferiores à do controlo. Finalmente, 96 horas após a irradiação

obtiveram-se viabilidades celulares de $75,67 \pm 1,65\%$ com a dose de 0,5 Gy ($p=0,002$), de $54,67 \pm 1,50\%$ com a dose de 15 Gy ($p<0,001$), de $47,17 \pm 1,38\%$ com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e de $45,00 \pm 1,06\%$ com a dose de 60 Gy ($p<0,001$), significativamente inferiores à do controlo.

Quando a avaliação da viabilidade celular foi realizada 24 horas após a irradiação, obtiveram-se valores de $90,00 \pm 0,93\%$ para a dose de 0,5 Gy, que foi significativamente superior aos obtidos com a dose de 30 Gy ($p=0,001$) e com a dose de 60 Gy ($p<0,001$). Quarenta e oito horas após a irradiação, verificou-se que as viabilidades foram menores com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e com a dose de 60 Gy ($p<0,001$) do que com a dose de 0,5 Gy. As viabilidades obtidas, 72 horas após a irradiação, com a dose de 0,5 Gy foi significativamente superior à obtida com 15 Gy ($p<0,001$), com 30 Gy ($p<0,001$) e com 60 Gy ($p<0,001$) e a obtida com a dose de 15 Gy também foi significativamente superior à de 60 Gy ($p=0,011$). Por fim, 96 horas após a irradiação, verificou-se que a viabilidade obtida para a dose de 0,5 Gy foi superior à obtida com a dose de 30 Gy ($p=0,001$) e com a dose de 60 Gy ($p<0,001$). Para este tempo, a viabilidade após irradiação com 60 Gy foi ainda significativamente inferior à exposição à dose de 15 Gy ($p=0,005$).

Em relação à linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299, como representado na Figura 18, 24 horas após a irradiação, obtiveram-se viabilidades celulares de $93,00 \pm 2,05\%$ com a dose de 0,5 Gy ($p<0,001$), de $82,00 \pm 2,00\%$ com a dose de 15 Gy ($p<0,001$), de $79,33 \pm 1,17\%$ com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e de $76,33 \pm 1,89\%$ com a dose de 60 Gy ($p<0,001$), significativamente inferiores à do controlo. Quarenta e oito horas após a irradiação obtiveram-se viabilidades celulares de $90,50 \pm 0,72\%$ com a dose de 0,5 Gy ($p=0,002$), de $76,17 \pm 1,45\%$ com a dose de 15 Gy ($p<0,001$), de $74,83 \pm 1,35\%$ com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e de $71,17 \pm 1,92\%$ com a dose de 60 Gy ($p<0,001$), significativamente inferiores à do controlo. Setenta e duas horas após a irradiação obtiveram-se viabilidades celulares de $89,50 \pm 1,45\%$ com a dose de 15 Gy ($p<0,001$), de $71,00 \pm 1,57\%$ com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e de $69,50 \pm 2,43\%$ com a dose de 60 Gy ($p<0,001$), significativamente inferiores à do controlo. Finalmente, 96 horas após a irradiação obtiveram-se viabilidades celulares de $70,83 \pm 1,58\%$ com a dose de 15 Gy ($p<0,001$), de $68,17 \pm 1,72\%$ com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e de $65,67 \pm 2,20\%$ com

a dose de 60 Gy ($p < 0,001$), significativamente inferiores à do controlo.

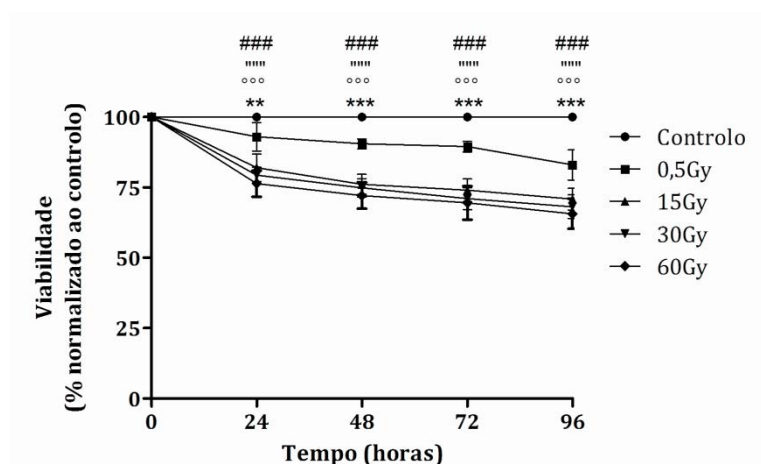


Figura 18: Curvas de dose-resposta obtidas para a linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299 às 24h, 48h, 72h e 96h após exposição à radiação ionizante. A viabilidade das células aderentes foi obtida através do ensaio de Alamar Blue®. Os resultados são apresentados na forma de percentagem, normalizados em relação ao controlo. Os pontos experimentais representam a média e o erro padrão de pelo menos seis ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com * para 0,5 Gy, em que ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$, com ° para 15 Gy, em que °° significa $p < 0,01$ e °°° significa $p < 0,001$, com “ para 30 Gy, em que “” significa $p < 0,01$ e “”” significa $p < 0,001$ e com # para 60 Gy, em que ## significa $p < 0,01$ e ### significa $p < 0,001$.

Quando a avaliação da viabilidade celular foi realizada 24 horas após a irradiação, verificou-se que com a dose de 0,5 Gy foi significativamente superior à obtida com a dose de 15 Gy ($p = 0,012$), com a dose de 30 Gy ($p = 0,005$) e com a dose de 60 Gy ($p = 0,001$). Quarenta e oito horas após a irradiação, verificou-se que as viabilidades foram menores com a dose de 30 Gy ($p < 0,001$) e com a dose de 60 Gy ($p < 0,001$) do que com a dose de 0,5 Gy. As viabilidades obtidas, 72 horas após a irradiação, com a dose de 0,5 Gy foi de $80,33 \pm 1,05$, valor significativamente superior ao obtido com 15 Gy ($p = 0,014$), com 30 Gy ($p < 0,001$) e com 60 Gy ($p < 0,001$). Por fim, noventa e seis horas após a exposição a radiação, verificou-se que a viabilidade obtida com a dose de 0,5 Gy foi de $83,00 \pm 2,21\%$, valor superior ao obtido com a dose de 30 Gy ($p = 0,001$) e com a dose de 60 Gy ($p < 0,001$).

A comparação dos resultados obtidos para as linhas celulares de cancro do pulmão de não pequenas células, para cada dose utilizada e para cada tempo em estudo indicou que, de um modo geral, a linha celular A549 apresentou viabilidade inferior à obtida na linha celular H1299, tal como se pode confirmar na Tabela 8. Em

Tabela 8: Viabilidades das linhas celulares A549 e H1299, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, após exposição à radiação.

Dose	Linha celular	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
		Média±EP	Média±EP	Média±EP	Média±EP
0,5 Gy	A549	90,00±0,93	85,17±1,45	80,33±1,05	75,67±1,65
	H1299	93,00±2,05	90,50±0,72 **	89,50±0,76 ***	83,00±2,21 *
15 Gy	A549	82,67±1,54	74,67±1,17	64,83±1,40	54,67±1,50
	H1299	82,00±2,00	76,17±1,45	74,00±1,65 **	70,83±1,58 ***
30 Gy	A549	82,33±1,86	70,33±1,12	59,33±2,42	47,17±1,38
	H1299	79,33±1,17	74,83±1,35 *	71,00±1,57 **	68,17±1,72 ***
60 Gy	A549	76,00±0,93	63,17±1,35	52,17±1,25	45,00±1,06
	H1299	76,33±1,89	72,17±1,92 **	69,50±2,43 ***	65,67±2,20 ***

Legenda: EP= Erro Padrão. Os resultados foram expressos na forma de percentagem em relação a culturas celulares controlo não tratadas (controlo igual a 100%). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos nove ensaios independentes. As diferenças significativas entre linhas celulares, para a mesma dose e para o mesmo tempo, estão representadas com * para $p<0,05$, com ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$.

detalhe, a viabilidade das células A549 foi inferior à das células H1299, 48 horas 0,5 Gy; 72 horas ($p=0,002$) e 96 horas ($p<0,001$) após a irradiação com 15 Gy; 48 horas ($p=0,028$), 72 horas ($p=0,002$) e 96 horas ($p<0,001$) após a irradiação com 30 Gy; e 48 horas ($p=0,003$), 72 horas ($p<0,001$) e 96 horas ($p<0,001$) após a irradiação com 60 Gy.

A Figura 19 e a Figura 20 representam a viabilidade celular das linhas celulares de cancro do pulmão de pequenas células H69 e de linfoma difuso de grandes células B Farage, respetivamente, ambas mantidas em cultura em suspensão, após exposição à radiação. Verificou-se, em ambas as linhas celulares, uma diminuição significativa da viabilidade celular de forma dependente da dose e do tempo após irradiação, em relação às culturas celulares controlo. Detalhadamente para a linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69, como representado na Figura 19, 24 horas após a irradiação, obteve-se uma viabilidade celular de $88,83\pm 3,38\%$ com a dose de 0,5 Gy ($p<0,001$), $75,17\pm 5,20\%$ com a dose de 15 Gy ($p<0,001$), de $66,00\pm 5,63\%$ com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e de $63,50\pm 1,80\%$ com a dose de 60 Gy ($p<0,001$), significativamente inferiores ao controlo. Quarenta e oito horas após a irradiação obteve-se uma viabilidade celular de $79,83\pm 1,54\%$ com a dose de 0,5 Gy ($p=0,008$), de $63,33\pm 2,92\%$ com a dose de 15 Gy ($p<0,001$), de $50,17\pm 3,68\%$ com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e de $47,67\pm 2,49\%$ com a dose de 60 Gy ($p<0,001$),

significativamente inferiores ao controlo. Setenta e duas horas após a irradiação obteve-se uma viabilidade celular de $82,00 \pm 4,39\%$ com a dose de 0,5 Gy ($p=0,001$), de $51,60 \pm 1,44\%$ com a dose de 15 Gy ($p<0,001$), de $39,33 \pm 1,02\%$ com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e de $30,83 \pm 2,96\%$ com a dose de 60 Gy ($p<0,001$), significativamente inferiores ao controlo. Finalmente, 96 horas após a irradiação obtiveram-se viabilidades celulares de $68,17 \pm 4,22\%$ com a dose de 0,5 Gy ($p=0,011$), de $51,67 \pm 2,22\%$ com a dose de 15 Gy ($p<0,001$), de $35,50 \pm 1,02\%$ com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e de $23,67 \pm 0,42\%$ com a dose de 60 Gy ($p<0,001$), significativamente inferiores ao controlo.

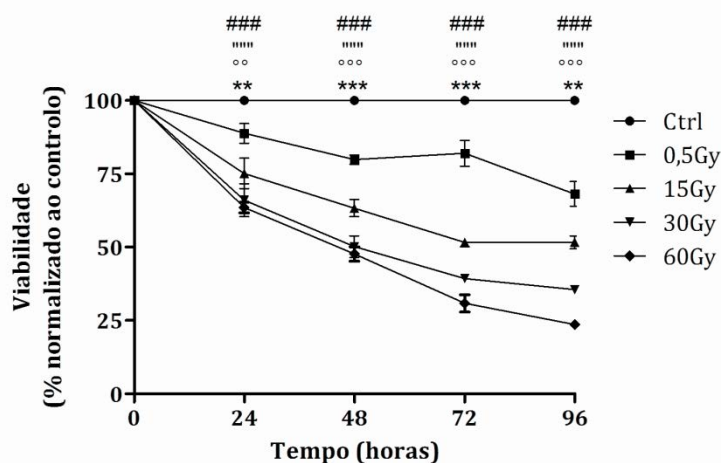


Figura 19: Curvas de dose resposta obtidas para a linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69 24h, 48h, 72h e 96h após exposição à radiação ionizante. A viabilidade das células mantidas em suspensão foi obtida através do ensaio de exclusão do azul de tripano. O resultados são apresentados na forma de percentagem, normalizados em relação ao controlo. Os pontos experimentais representam a média e o erro padrão de pelo menos seis ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com * para 0,5 Gy, em que ** significa $p<0,01$ e *** significa $p<0,001$, com ° para 15 Gy, em que °°° significa $p<0,001$, com “ para 30 Gy, em que “” significa $p<0,01$ e “”” significa $p<0,001$ e com # para 60 Gy, em que ## significa $p<0,01$ e ###significa $p<0,001$.

Adicionalmente, 24 horas após a irradiação, verificou-se que a viabilidade obtida com a dose de 0,5 Gy foi significativamente superior às obtidas com as doses de 15 Gy ($p=0,008$), de 30 Gy ($p=0,01$) e de 60 Gy ($p<0,001$). Quarenta e oito horas após a irradiação, verificou-se que a viabilidade obtida com a dose de 0,5 Gy foi significativamente superior às obtidas com as doses de 15 Gy ($p=0,05$), de 30 Gy ($p<0,001$) e de 60 Gy ($p<0,001$). A viabilidade obtida 72 horas após a irradiação com a dose de 0,5 Gy foi significativamente superior às obtidas com 15 Gy ($p<0,001$), com

30 Gy ($p<0,001$) e com 60 Gy ($p<0,001$) e a obtida com a dose de 15 Gy também foi significativamente superior à com 60 Gy ($p=0,011$). Por fim, 96 horas após a irradiação, verificou-se que a viabilidade obtida com a dose de 0,5 Gy foi superior às obtidas com as doses de 15 Gy ($p=0,001$), de 30 Gy ($p=0,001$) e de 60 Gy ($p<0,001$).

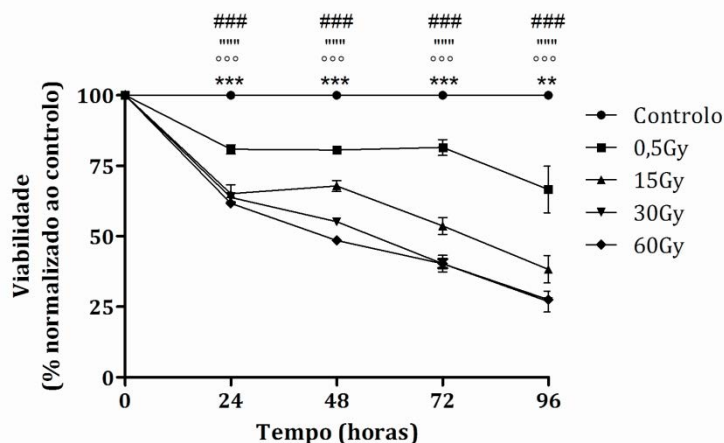


Figura 20: Curvas de dose resposta obtidas para a linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage 24h, 48h, 72h e 96h após exposição à radiação ionizante. A viabilidade das células mantidas em suspensão foi obtida através do ensaio de exclusão do azul de tripano. O resultados são apresentados na forma de percentagem, normalizados em relação ao controlo. Os pontos experimentais representam a média e o erro padrão de pelo menos seis ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com * para 0,5 Gy, em que ** significa $p<0,01$ e *** significa $p<0,001$, com ° para 15 Gy, em que °°° significa $p<0,001$, com “ para 30 Gy, em que “” significa $p<0,01$ e “”” significa $p<0,001$ e com # para 60 Gy, em que ## significa $p<0,01$ e ### significa $p<0,001$.

A Figura 20 representa a viabilidade da linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage após exposição à radiação. Vinte e quatro horas após a irradiação verificou-se que as culturas celulares submetidas a uma dose de 0,5 Gy apresentaram uma viabilidade de $80,83 \pm 1,66\%$, significativamente superior à de $65,17 \pm 3,15\%$ obtida com a dose de 15 Gy ($p=0,012$), à de $63,83 \pm 1,62\%$ obtida com a dose de 30 Gy ($p=0,005$) e à de $61,67 \pm 1,09\%$ obtida com a dose de 60 Gy ($p=0,001$). Quarenta e oito horas após a irradiação obteve-se uma viabilidade de $80,67 \pm 1,23\%$ para as culturas celulares irradiadas com 0,5 Gy, valor significativamente superior ao de $55,17 \pm 1,40\%$ obtido para as culturas irradiadas com 30 Gy ($p<0,001$) e ao de $48,50 \pm 1,09\%$ obtido para as culturas celulares irradiadas com 60 Gy ($p<0,001$). Setenta e duas horas após a irradiação obteve-se uma viabilidade de $81,50 \pm 2,77\%$ para as culturas celulares expostas a 0,5 Gy, valor significativamente superior ao de $53,67 \pm 3,00\%$ obtido para as culturas celulares irradiadas com 15 Gy ($p=0,014$), ao

de $40,33 \pm 2,95\%$ obtido para as culturas celulares irradiadas com 30 Gy ($p < 0,001$) e ao de $40,33 \pm 1,61\%$ obtido para as culturas celulares irradiadas com 60 Gy ($p < 0,001$). Noventa e seis horas após a irradiação observou-se uma da viabilidade celular de $66,0 \pm 8,25\%$ para as culturas celulares expostas a 0,5 Gy, valor significativamente superior ao de $26,83 \pm 3,72\%$ obtido para as culturas celulares irradiadas com 30 Gy ($p = 0,001$) e ao de $27,5 \pm 0,56\%$ obtido para as culturas celulares irradiadas com 60 Gy ($p < 0,001$). Ainda, 96 horas após a irradiação verificou-se que a linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69 quando submetida a uma dose de 15 Gy apresentou uma viabilidade de $51,67 \pm 2,22\%$, superior à da linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage que apresentou um valor de $38,33 \pm 4,84\%$ ($p = 0,031$). Com a dose de 30 Gy observou-se a mesma relação uma vez que a linha celular H69 apresentou uma viabilidade de $35,50 \pm 1,02\%$, superior à de $26,83 \pm 3,72\%$ da linha celular Farage ($p = 0,026$). Por outro lado, 72 horas após a irradiação com 60 Gy, a linha celular H69 apresentou uma viabilidade celular de $30,83 \pm 2,96\%$ significativamente inferior à da linha celular Farage que apresentou um valor de $40,33 \pm 1,61\%$ ($p = 0,018$). Para a mesma dose, 96 horas após a irradiação, a linha celular H69 também apresentou uma viabilidade de $23,67 \pm 0,42\%$ significativamente inferior à da linha celular Farage, que apresentou um valor de $27,50 \pm 0,56\%$ ($p < 0,001$). Os resultados obtidos para a viabilidade das linhas celulares H69 e Farage encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9: Viabilidade das linhas celulares H69 e Farage, 24h, 48h, 72h e 96h após exposição à irradiação.

Dose	Linha celular	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
		Média±EP	Média±EP	Média±EP	Média±EP
0,5 Gy	H69	88,83±3,38	79,83±1,54	82,00±4,39	68,17±4,22
	Farage	80,83±1,66	80,67±1,23	81,50±2,77	66,60±8,25
15 Gy	H69	75,17±5,20	63,33±2,92	51,60±1,44	51,67±2,22 *
	Farage	65,17±3,15	67,83±1,99	53,67±3,00	38,33±4,84
30 Gy	H69	66,00±5,63	50,17±3,68	39,33±1,02	35,50±1,02 *
	Farage	63,83±1,62	55,17±1,40	40,33±2,95	26,83±3,72
60 Gy	H69	63,50±1,80	47,67±2,49	30,83±2,96 *	23,67±0,42 ***
	Farage	61,67±1,09	48,50±1,09	40,33±1,61	27,50±0,56

Legenda: EP= Erro Padrão. Os resultados foram expressos na forma de percentagem em relação a culturas celulares controlo não tratadas (controlo igual a 100%). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos nove ensaios independentes. As diferenças significativas entre as linhas celulares para a mesma dose e para o mesmo tempo estão representadas com * para $p < 0,05$, com ** para $p < 0,01$, e com *** para $p < 0,001$.

Tipos de morte celular

A radiação ionizante induziu uma diminuição da população de células viáveis e um aumento do número de células em morte celular. Estas alterações foram dependentes não só da dose de radiação, bem como da linha celular em estudo, nomeadamente no que diz respeito ao tipo de morte celular predominante.

No que respeita à linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69, como representado na Figura 21 observou-se, 48 horas após a irradiação, uma diminuição significativa da viabilidade das culturas celulares irradiadas com a dose de 0,5 Gy que apresentaram um valor de $69,83 \pm 1,25\%$ ($p=0,037$), com a dose de 15 Gy que apresentaram um valor de $61,00 \pm 1,22\%$ ($p<0,001$), com a dose de 30 Gy que apresentaram um valor de $54,75 \pm 1,44\%$ ($p<0,001$) e com a dose de 60 Gy, que apresentaram um valor de $52,25 \pm 1,31\%$ ($p<0,001$), em relação às culturas celulares controlo, as quais apresentaram um valor de $75,33 \pm 1,15\%$. De forma concomitante, verificou-se que a morte por apoptose inicial é o principal tipo de morte, que aumentou significativamente nas culturas celulares irradiadas com a dose de 15 Gy onde se obteve um valor de $20,00 \pm 1,08\%$ ($p=0,001$), com a dose de 30 Gy onde se obteve um valor de $26,50 \pm 3,86\%$ ($p<0,001$) e com a dose de 60 Gy onde se obteve um valor $36,00 \pm 3,19\%$ ($p<0,001$), em relação ao controlo no qual o valor médio foi de $9,83 \pm 1,08\%$. Não se observaram diferenças significativas nas populações celulares em morte por apoptose tardia/necrose ou por necrose.

Ainda no que respeita à linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69 (Figura 21), verificou-se que a viabilidade das células irradiadas com a dose de 0,5 Gy foi significativamente superior à das células irradiadas com a dose de 15 Gy ($p=0,021$), com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e com a dose de 60 Gy ($p<0,001$). Associadamente, a viabilidade das culturas celulares irradiadas com a dose de 60 Gy foi significativamente inferior à das irradiadas com a dose de 15 Gy ($p=0,021$). Observou-se também que a morte por apoptose inicial observada com a dose de 30 Gy ($p=0,005$) e com a dose de 60 Gy ($p<0,001$) foi significativamente superior à das culturas celulares irradiadas com a dose de 0,5 Gy, que apresentaram um valor de $13,83 \pm 1,47\%$.

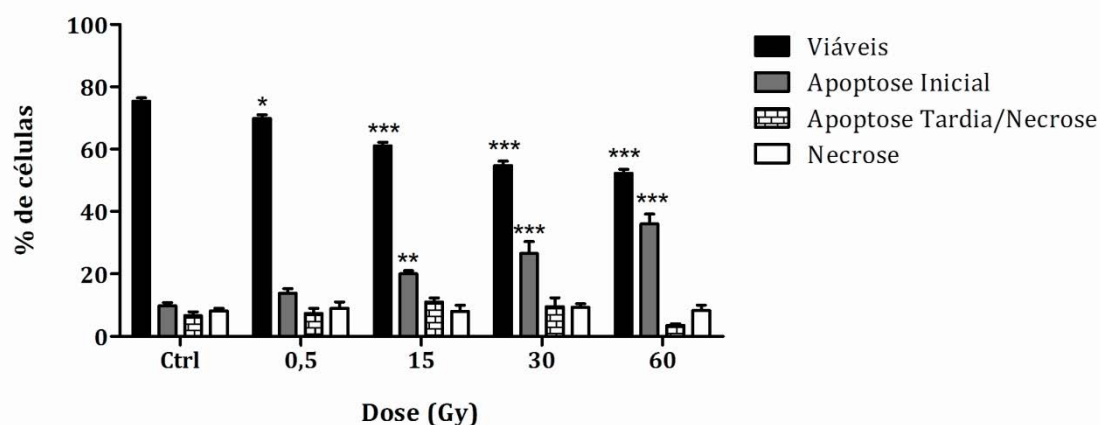


Figura 21: Tipos de morte celular da linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69 48 horas após a irradiação. A avaliação dos tipos de morte celular foi realizada por citometria de fluxo com recurso à dupla marcação com anexina V e com iodeto de propídeo. Os gráficos representam a percentagem de células viáveis em apoptose inicial, em apoptose tardia/necrose e em necrose. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com * para $p < 0,05$; com ** para $p < 0,01$ e com *** para $p < 0,001$. As comparações entre doses são descritas ao longo do texto.

No que respeita à linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549 observou-se uma diminuição da viabilidade que se pode confirmar na Figura 22. Nas culturas celulares controlo o valor médio de viabilidade foi de $84,75 \pm 0,95\%$, significativamente superior ao das culturas celulares irradiadas com a dose de 0,5 Gy que foi de $77,25 \pm 0,63\%$ ($p = 0,019$), com a dose de 15 Gy que foi de $63,75 \pm 1,18\%$ ($p < 0,001$), com a dose de 30 Gy que foi de $56,50 \pm 2,06\%$ ($p < 0,001$) e com a dose de 60 Gy que foi de $41,25 \pm 1,75\%$ ($p < 0,001$). Simultaneamente, verificou-se que a morte por apoptose inicial foi o principal tipo de morte induzido pela radiação, sendo superior com a dose de 15 Gy para a qual apresentou um valor de $14,75 \pm 0,95\%$ ($p = 0,046$), com a dose de 30 Gy para a qual apresentou um valor de $23,00 \pm 4,38\%$ ($p < 0,001$) e com a dose de 60 Gy para a qual apresentou um valor de $34,00 \pm 2,45\%$ ($p < 0,001$), do que nas culturas celulares controlo que apresentaram um valor de $3,75 \pm 0,63\%$.

Ainda, na linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549 (Figura 22) observou-se que a viabilidade foi significativamente inferior nas culturas celulares irradiadas com a dose de 15 Gy ($p < 0,001$), com a dose de 30 Gy ($p < 0,001$) e com a dose de 60 Gy ($p < 0,001$), do que nas irradiadas com a dose de 0,5 Gy. A viabilidade celular das culturas celulares irradiadas com 30 Gy ($p = 0,025$) e com 60 Gy ($p < 0,001$) foi significativamente inferior às das irradiadas com 15 Gy,

enquanto a das irradiadas com 60 Gy foi inferior à das irradiadas com 30 Gy ($p<0,001$). Associadamente, verificou-se que população de células em morte celular por apoptose inicial foi superior após irradiação com a dose de 60 Gy que apresentou um valor de $11,50\pm0,96\%$ ($p<0,001$), com a dose de 15 Gy ($p<0,001$) e com a dose de 30 Gy ($p=0,046$) do que com a dose de 0,5 Gy. A morte celular por apoptose tardia/necrose foi menor nas células irradiadas com a dose de 0,5 Gy ($1,00\pm0,00\%$) do que nas irradiadas com a dose de 15 Gy ($3,50\pm0,50\%$; $p<0,001$), com a dose de 30 Gy ($5,75\pm0,48\%$; $p<0,001$) e com a dose de 60 Gy ($8,00\pm0,71\%$; $p<0,001$); e foi menor nas células irradiadas com a dose de 15 Gy do que nas irradiadas com a dose de 60 Gy ($p<0,001$). Não se observaram diferenças significativas na morte celular por necrose.

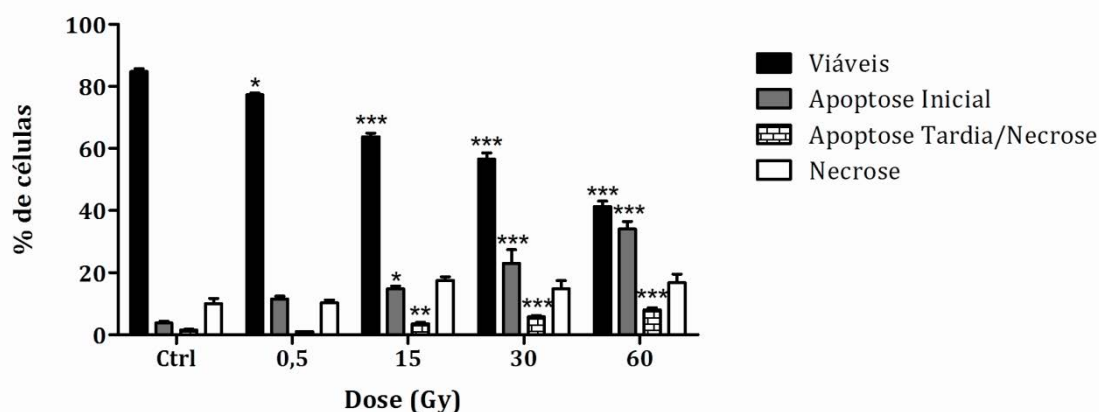


Figura 22: Tipos de morte celular da linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549 48 horas após a irradiação. A avaliação dos tipos de morte celular foi realizada por citometria de fluxo com recurso à dupla marcação com anexina V e com iodeto de propídeo. Os gráficos representam a percentagem de células viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia/necrose e em necrose. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com * para $p<0,05$; com ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$. As comparações entre doses são descritas ao longo do texto.

Na linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299, conforme representado na Figura 23, observou-se uma diminuição significativa da viabilidade celular após irradiação com a dose de 15 Gy que apresentou um valor de $74,60\pm1,44\%$ ($p<0,001$), com dose de 30 Gy que apresentou um valor de $73,50\pm0,65\%$ ($p<0,001$) e com a dose de 60 Gy que teve um valor de $65,00\pm3,19\%$ ($p<0,001$) em relação ao controlo, o qual apresentou um valor médio de células viáveis de $92,00\pm0,71\%$. De forma concomitante verificou-se um aumento

da percentagem de células em apoptose tardia/necrose nas culturas celulares irradiadas com a dose de 15 Gy, com um valor médio de $8,40 \pm 1,03\%$ ($p=0,001$), do que nas culturas celulares controlo que apresentaram um valor médio de $1,80 \pm 0,49\%$. Paralelamente, observou-se um aumento significativo da morte celular por necrose nas culturas celulares irradiadas com a dose de 30 Gy, que apresentaram um valor de $15,00 \pm 2,04\%$ ($p=0,003$) e com a dose de 60 Gy, que apresentaram um valor de $21,25 \pm 2,06\%$ ($p<0,001$), em relação às culturas celulares controlo as quais apresentaram um valor de $2,60 \pm 0,24\%$.

Na linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299 (Figura 23), a viabilidade celular foi maior após irradiação com a dose de 0,5 Gy, que apresentou um valor de $85,40 \pm 1,99\%$ do que com as doses de 15 Gy ($p<0,003$), de 30 Gy ($p<0,002$) e de 60 Gy ($p<0,001$). A apoptose tardia/necrose foi maior com a doses de 15 Gy do que com a dose de 60 Gy, que apresentou um valor de $2,50 \pm 0,29\%$ ($p=0,010$). A morte celular por necrose foi significativamente menor nas células tratadas com a dose de 0,5 Gy, que apresentaram um valor de $4,20 \pm 1,02\%$ do que nas irradiadas com as doses de 30 Gy ($p=0,014$) e de 60 Gy ($p=0,001$). Este tipo de morte celular foi menor após irradiação com a dose 15 Gy, que apresentou um valor de $7,00 \pm 2,26\%$, do que com as doses de 30 Gy ($p=0,038$) e de 60 Gy ($p=0,003$).

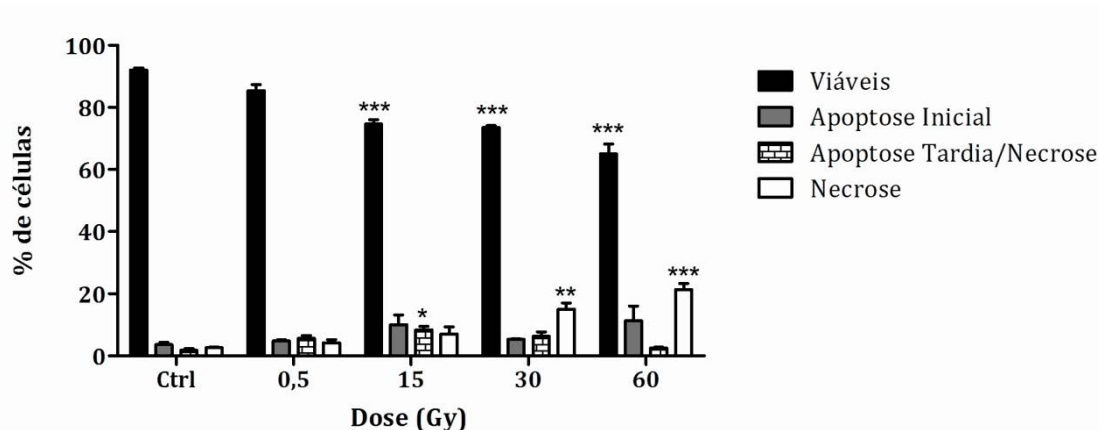


Figura 23: Tipos de morte celular da linha celular cancro do pulmão de não pequenas células H1299 48 horas após a irradiação. A avaliação dos tipos de morte celular foi realizada por citometria de fluxo com recurso à dupla marcação com anexina V e com iodeto de propídeo. Os gráficos representam a percentagem de células viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia/necrose e em necrose. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com * para $p<0,05$; com ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$. As comparações entre doses são descritas ao longo do texto.

No que respeita à linha celular de linfoma de grandes células B Farage a viabilidade também diminuiu como consequência da irradiação, como se pode verificar na Figura 24. As culturas celulares controlo apresentaram uma viabilidade de $85,80 \pm 0,92\%$, superior à das culturas celulares irradiadas com a dose de 0,5 Gy que apresentam um valor de $66,50 \pm 1,73\%$ ($p < 0,001$), com a dose de 15 Gy que apresentaram um valor de $55,40 \pm 2,14\%$ ($p < 0,001$), com a dose 30 Gy que apresentaram um valor de $49,20 \pm 3,09\%$ ($p < 0,001$) e com a dose de 60 Gy que apresentaram um valor de $41,60 \pm 2,16\%$ ($p < 0,001$).

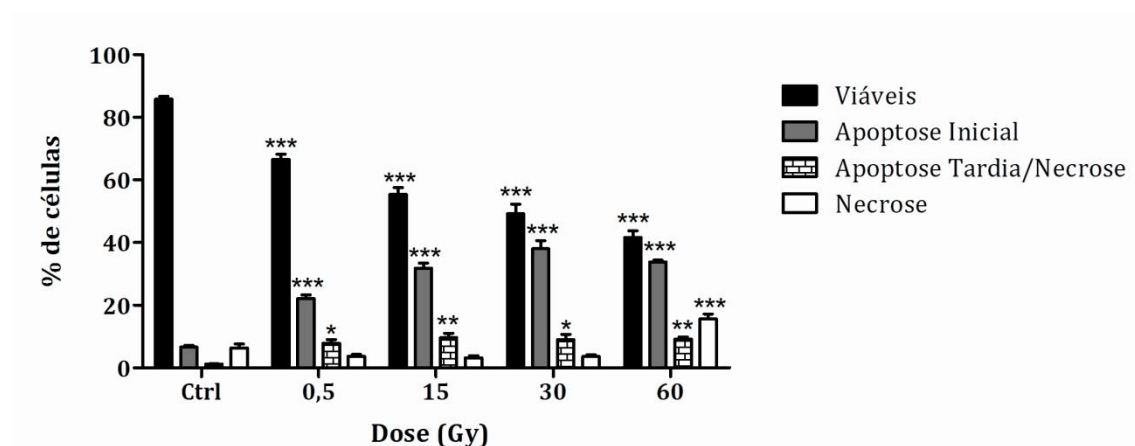


Figura 24: Tipos de morte celular da linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage 48 horas após a irradiação. A avaliação dos tipos de morte celular foi realizada por citometria de fluxo com recurso à dupla marcação com anexina V e com iodeto de propídeo. Os gráficos representam a percentagem de células viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia/necrose e em necrose. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com * para $p < 0,05$; com ** para $p < 0,01$ e com *** para $p < 0,001$. As comparações entre doses são descritas ao longo do texto.

A morte celular por apoptose inicial aumentou após irradiação com a dose de 0,5 Gy com um valor de $22,17 \pm 1,14\%$ ($p < 0,001$), com a dose de 15 Gy com um valor de $31,80 \pm 1,66\%$ ($p < 0,001$), com a dose de 30 Gy com um valor de $38,00 \pm 2,65\%$ ($p < 0,001$) e com a dose de 60 Gy com um valor de $33,80 \pm 0,58\%$ ($p < 0,001$), em relação ao controlo, que apresentou um valor de $6,60 \pm 0,51\%$. Verificou-se também um aumento da apoptose tardia/necrose nas culturas celulares irradiadas com a dose de 0,5 Gy que apresentaram um valor de $7,83 \pm 1,19\%$ ($p = 0,038$), com a dose de 15 Gy que apresentaram um valor de $9,60 \pm 1,44\%$ ($p = 0,009$), com a dose de 30 Gy que apresentaram um valor de $9,00 \pm 1,70\%$ ($p = 0,029$) e com a dose de 60 Gy que apresentaram um valor de $9,20 \pm 0,66\%$ ($p = 0,013$), em relação às culturas celulares

controlo, que apresentaram um valor de $1,20 \pm 0,20\%$. A morte celular por necrose também aumentou significativamente após irradiação com a dose de 60 Gy, que apresentou um valor de $15,60 \pm 1,63\%$ ($p < 0,001$), em relação às culturas controlo cujo valor médio foi de $6,40 \pm 1,21\%$.

A viabilidade da linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage (Figura 24) foi maior após irradiação com a dose de 0,5 Gy ($p = 0,01$) do que com as doses de 15 Gy ($p = 0,01$), de 30 Gy ($p < 0,001$) e de 60 Gy ($p < 0,001$). A viabilidade foi também maior após irradiação com a dose de 15 Gy do que com a dose de 60 Gy ($p = 0,002$). A apoptose inicial foi menor após irradiação com a dose de 0,5 Gy do que com as doses de 15 Gy ($p = 0,001$), de 30 Gy ($p < 0,001$) e de 60 Gy ($p < 0,001$). Associadamente, a população em necrose foi inferior após irradiação com a dose de 0,5 Gy do que com a dose de 60 Gy ($p < 0,001$). Foi igualmente inferior após irradiação com a dose de 15 Gy que apresentou um valor de $3,20 \pm 0,66\%$, do que com a dose de 60 Gy ($p < 0,001$) assim como foi inferior após irradiação com a dose de 30 Gy que apresentou um valor de $3,60 \pm 0,60\%$ do que com a dose de 60 Gy ($p < 0,001$). Os resultados obtidos para a caracterização dos tipos de morte celular após irradiação encontram-se sintetizados na Tabela 10.

Os resultados de citomorfologia demonstraram que, de forma geral, a radiação ionizante induz um aumento do número de células em morte celular com o aumento da dose, o que se pode verificar na Figura 25, pelas características morfológicas de morte celular associadas a estes eventos.

As células não irradiadas (controlo) da linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69 (Figura 25A) apresentaram-se dispostas em aglomerados, com cromatina condensada principalmente junto à membrana nuclear, membrana citoplasmática intacta e elevado número de células em mitose. Com o aumento da dose de radiação verificou-se um aumento do número de células com características morfológicas de apoptose. Destas, podemos salientar que os organelos celulares mantiveram a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias que apresentaram rutura da membrana externa. A membrana celular apresentou prolongamentos, habitualmente designados por *blebs* e o núcleo celular apresentou fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Com as doses de irradiação maiores

Tabela 10: Tipos de morte das linhas celulares H69, A549, H1299 e Farage, 48h após a irradiação.

Dose	Linha celular	Viáveis	Apoptose Inicial	Apoptose Tardia /Necrose	Necrose
		Média±EP	Média±EP	Média±EP	Média±EP
Ctrl	H69	75,33±1.15	9,83±1,08	6,67±1,23	8,17±0,79
	A549	84,75±0,95***	3,75±0,63**	1,50±0,29	10,00±1,68
	H1299	92,00±0,71****°	3,60±0,68***	1,80±0,49*	2,60±0,24
	Farage	85,80±0,92****°	6,60±0,51	1,20±0,20*	6,40±1,21
0,5 Gy	H69	69,83±1,25	13,83±1,47	7,33±1,61	9,00±2,08°
	A549	77,25±0,63*	11,50±0,96	1,00±0,00*	10,25±0,95
	H1299	85,40±1,99****°	4,80±0,37****°	5,60±0,98	4,20±1,02°
	Farage	66,50±1,73°	22,17±1,14****°	7,83±1,19°	3,67±0,61°
15 Gy	H69	61,00±1,22	20,00±1,08	11,00±1,29	8,00±1,96
	A549	63,75±1,18	14,75±0,95	3,50±0,50***	17,50±1,19**
	H1299	74,60±1,44****°	10,00±3,18**	8,40±1,03	7,00±2,26°
	Farage	55,40±2,14°	31,80±1,66****°	9,60±1,44°	3,20±0,66°
30 Gy	H69	54,75±1,44	26,50±3,86	9,50±2,87	9,25±1,18
	A549	56,50±2,06	23,00±4,38	5,75±0,48	14,75±2,72
	H1299	73,50±0,65****°	5,25±0,25****°	6,25±1,49	15,00±2,04
	Farage	49,20±3,09°	38,00±2,65°	9,00±1,70°	3,60±0,60°
60 Gy	H69	52,25±1,31	36,00±3,19	3,50±0,50	8,25±1,80
	A549	41,25±1,75*	34,00±2,45	8,00±0,71**	16,75±2,75
	H1299	65,00±3,19****°	11,25±4,80****°	2,50±0,29	21,25±2,06
	Farage	41,60±2,16°	33,80±0,58°	9,20±0,66**°	15,60±1,63

Legenda: Ctrl=Controlo; EP=Erro padrão. Os resultados representam a percentagem de células viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia/necrose e em necrose. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes.

os prolongamentos da membrana celular apresentaram maior número e maior tamanho, por vezes apresentaram-se com descontinuidades e observaram-se corpos apoptóticos, como se pode constatar na Figura 25B, C, D e E.

As células não irradiadas (controlo) da linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549 apresentam morfologia arredondada com elevada relação entre o núcleo e o citoplasma, como se pode observar na Figura 26A. Com o aumento da dose de radiação verificou-se um aumento do número de células com *blebs*, facto particularmente evidente nas células irradiadas com as doses mais elevadas (Figura 26D e Figura 26E), em que nalguns casos a membrana celular se apresentou

descontínua.

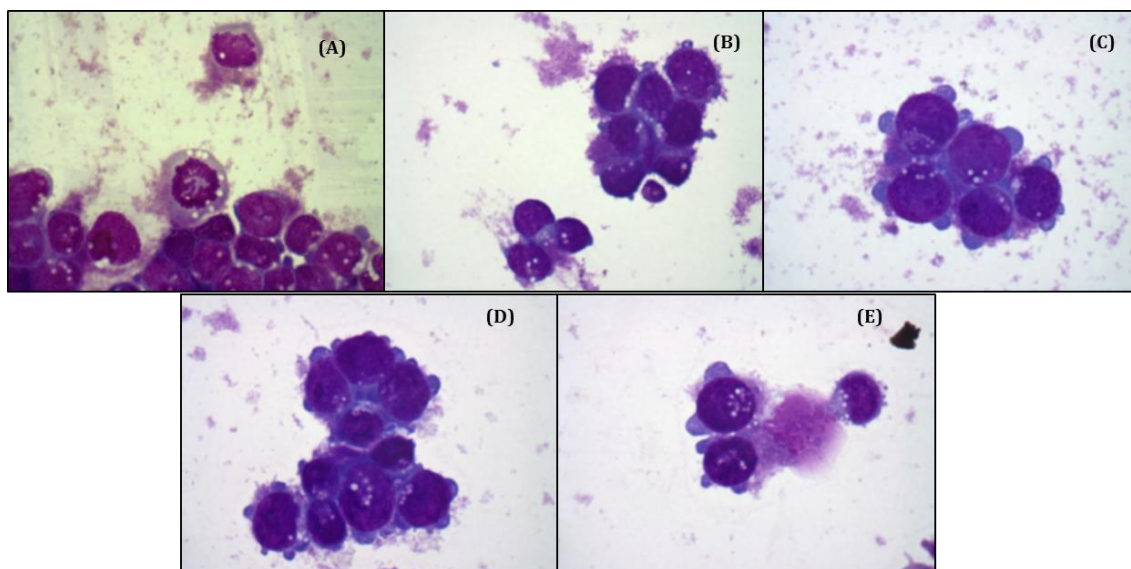


Figura 25: Avaliação das características morfológicas da linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69, 48 horas após exposição à radiação. Imagens representativas de esfregaços corados com May-Grünwald Giemsa. A imagem (A) representa as células controlo não irradiadas, a imagem (B) representa as células irradiadas com 0,5 Gy, a imagem (C) representa as células irradiadas com 15 Gy, a imagem (D) representa as células irradiadas com 30 Gy e a imagem (E) representa as células irradiadas com 60 Gy. As imagens foram obtidas com uma ampliação 400x.

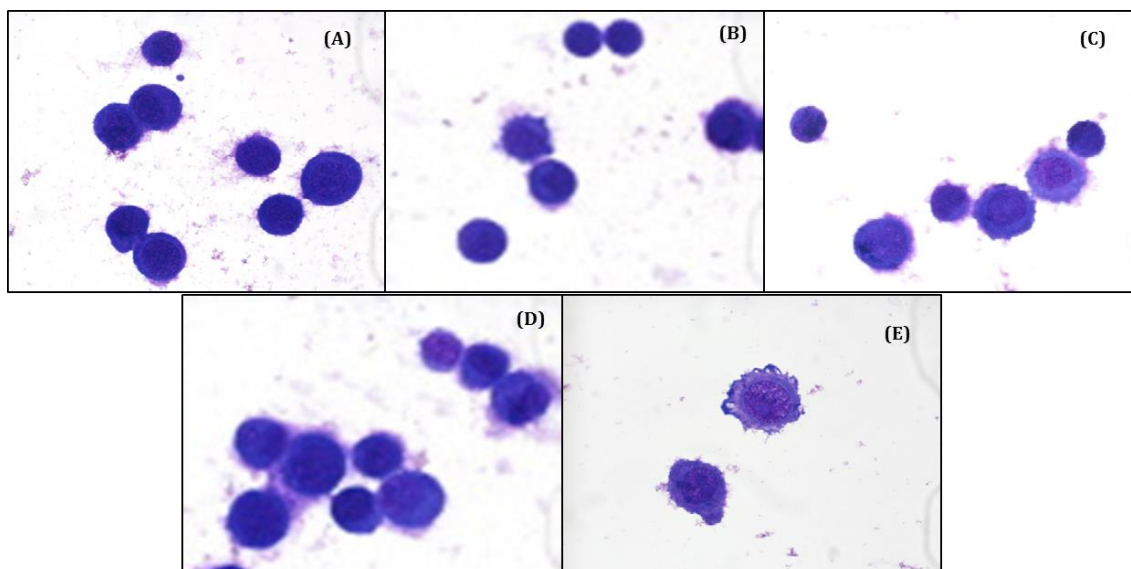


Figura 26: Avaliação das características morfológicas da linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549, 48 horas após exposição à radiação. Imagens representativas de esfregaços corados com May-Grünwald Giemsa. A imagem (A) representa as células controlo não irradiadas, a imagem (B) representa as células irradiadas com 0,5 Gy, a imagem (C) representa as células irradiadas com 15 Gy, a imagem (D) representa as células irradiadas com 30 Gy e a imagem (E) representa as células irradiadas com 60 Gy. As imagens foram obtidas com uma ampliação 400x.

As células de cancro do pulmão de não pequenas células H1299 não irradiadas (controlo) apresentaram-se em agregados celulares, com uma elevada relação entre o núcleo e o citoplasma e apresentaram numerosos vacúolos no citoplasma (Figura 27A). Com o aumento da dose de radiação observaram-se algumas células com características morfológicas de apoptose (Figura 27B, Figura 27C, Figura 27D). Após irradiação com as doses mais elevadas, de 30 Gy e de 60 Gy, observaram-se algumas células cuja alteração morfológica é compatível com a morte por necrose (Figura 27E).

A citomorfologia da linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage está representada na Figura 28. Verificou-se, no controlo, a presença de células em mitose e alguma vacuolização citoplasmática, como se pode constatar na Figura 28A. Nas células expostas a 0,5 Gy observou-se a presença de células com características de apoptose, maior quantidade e tamanho dos vacúolos citoplasmáticos, maior retração celular, formação de *blebbings*, e presença de mitoses residuais (Figura 28B). Com as doses de 15 Gy e de 30 Gy observou-se uma quantidade aumentada de células com *blebbings*, a formação de corpos apoptóticos e aumento da relação entre o núcleo e o citoplasma (Figura 28C, D e E).

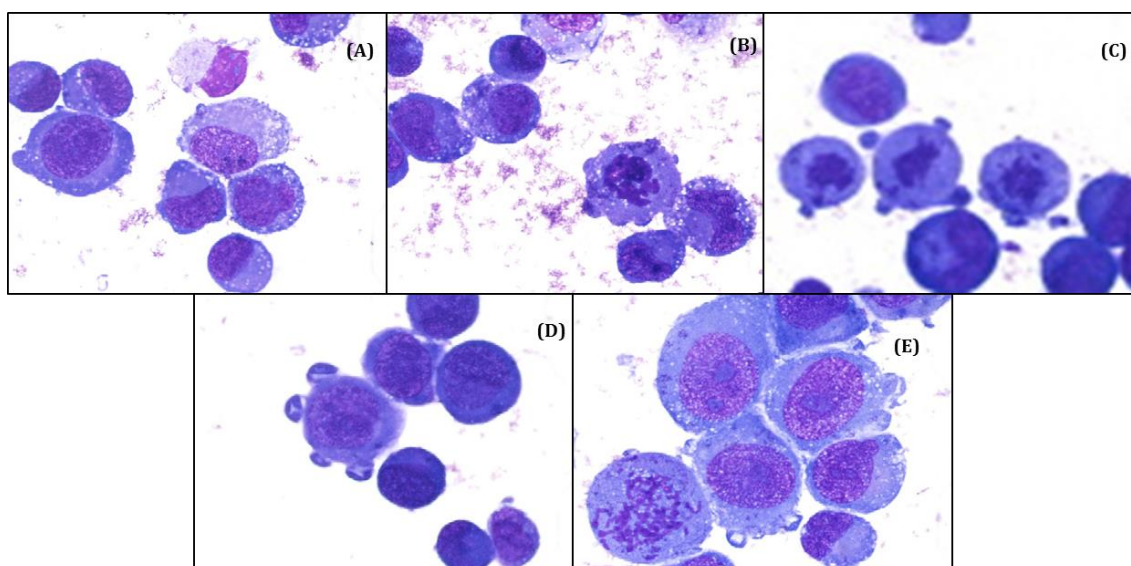


Figura 27: Avaliação das características morfológicas da linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299, 48 horas após exposição à radiação. Imagens representativas de esfregaços corados com May-Grünwald Giemsa. A imagem (A) representa as células controlo não irradiadas, a imagem (B) representa as células irradiadas com 0,5 Gy, a imagem (C) representa as células irradiadas com 15 Gy, a imagem (D) representa as células irradiadas com 30 Gy e a imagem (E) representa as células irradiadas com 60 Gy. As imagens foram obtidas com uma ampliação 400x.

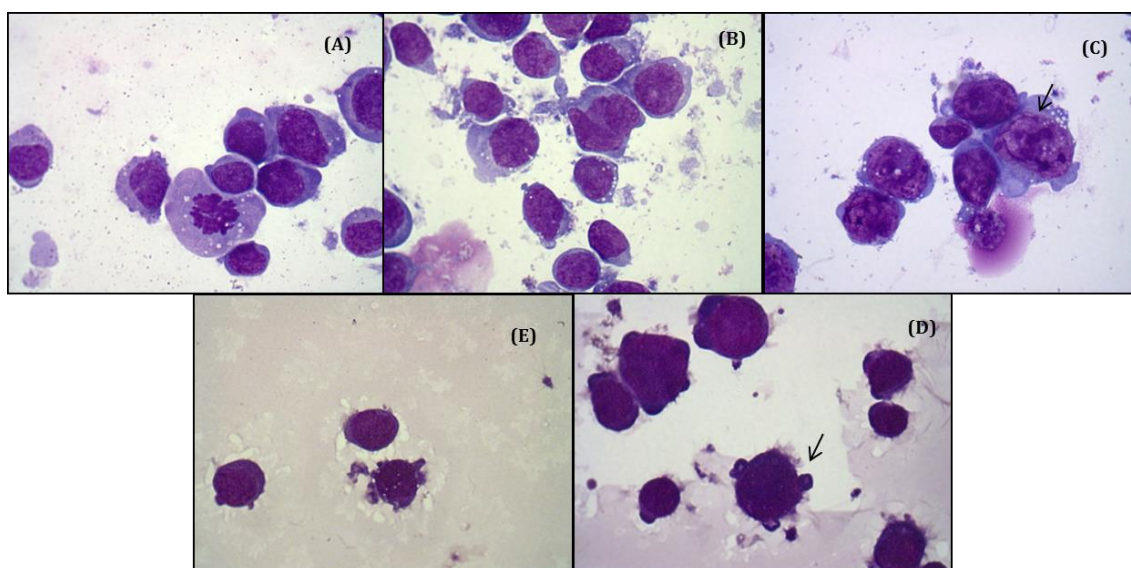


Figura 28: Avaliação das características morfológicas da linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage, 48 horas após exposição à radiação. Imagens representativas de esfregaços corados com May-Grünwald Giemsa. A imagem (A) representa as células controlo não irradiadas, a imagem (B) representa as células irradiadas com 0,5 Gy, a imagem (C) representa as células irradiadas com 15 Gy, a imagem (D) representa as células irradiadas com 30 Gy e a imagem (E) representa as células irradiadas com 60 Gy (a seta identifica um *bleb*). As imagens foram obtidas com uma ampliação 400x.

Após caracterização do tipo de morte e tendo-se verificado que o principal tipo de morte induzido pela radiação ionizante foi a apoptose, foram estudadas as proteínas pró- e anti-apoptóticas BAX e BCL-2, respetivamente.

Como se pode observar na Figura 29, as células da linha celular H69 são as que evidenciam níveis mais elevados de BAX, com uma MIF de $41,5 \pm 2,25$, significativamente superior às da linha celular A549 que apresentaram uma MIF de $19,40 \pm 13,18$ ($p < 0,001$) e às Farage que apresentaram uma MIF de $20,20 \pm 0,73$ ($p < 0,001$). Associadamente a expressão de BAX das células da linha celular A549 foi significativamente inferior às da linha celular H1299 que apresentaram uma MIF de $48,50 \pm 1,25$ ($p < 0,001$). Por outro lado, a expressão de BAX das células H1299 foi significativamente superior à expressão das células da linha celular Farage ($p = 0,002$).

No que respeita à proteína anti-apoptótica BCL-2, as células H69 apresentaram uma MIF de $39,66 \pm 2,40$ que corresponde a uma expressão significativamente superior à das células A549, que apresentaram uma MIF de $20,57 \pm 0,84$ ($p = 0,001$), à das células H1299, que apresentaram uma MIF de $21,57 \pm 0,84$ ($p < 0,001$) e à das células Farage, que apresentaram uma MIF de $30,00 \pm 2,12$ ($p = 0,015$). Finalmente, verificou-se que a expressão de BCL-2 das células H1299 foi inferior à da linha

celular Farage ($p=0,01$).

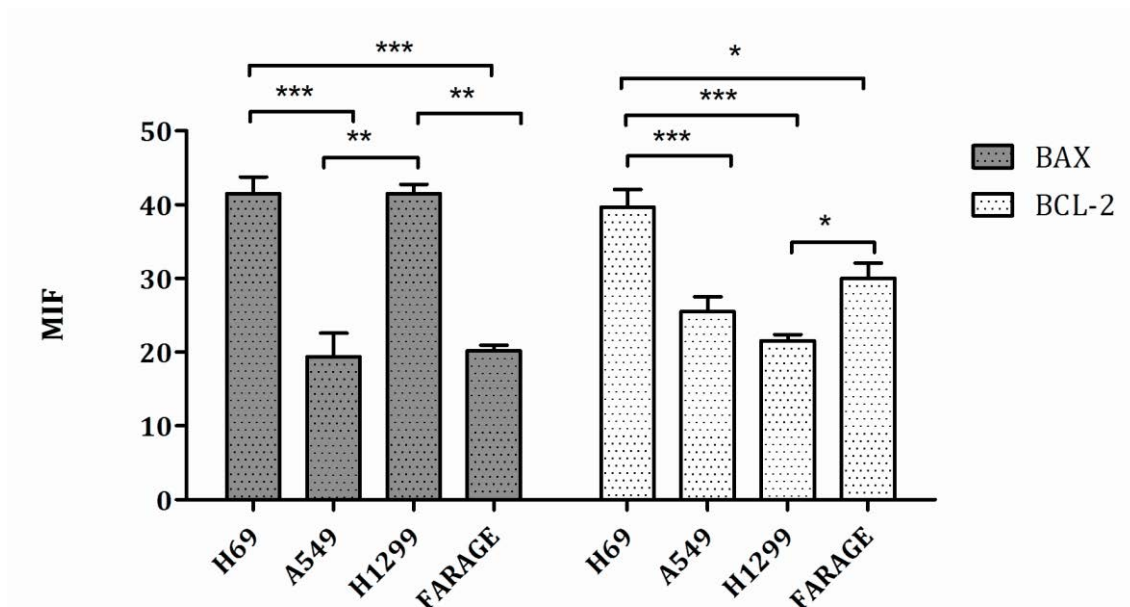


Figura 29: Determinação dos níveis basais das proteínas pró- e anti-apoptóticas BAX e BCL-2 na linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69, nas linhas celulares de não pequenas células A549 e H1299 e na linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage. A expressão de BAX e de BCL-2 foi avaliada por citometria de fluxo, recorrendo à marcação com anticorpos monoclonais. Os resultados são apresentados na forma de média de intensidade de fluorescência (MIF). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p<0,05$; com ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$.

De uma forma geral, a radiação ionizante induziu um aumento da razão BAX/BCL-2 com o aumento da dose. Na linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69, como representado na Figura 30, obteve-se uma razão BAX/BCL-2 de $0,87\pm 0,01$, após irradiação com a dose de 0,5 Gy, valor significativamente inferior ao controlo ($p=0,001$). Com as doses de 15 Gy, de 30 Gy e de 60 Gy obtiveram-se razões de $1,09\pm 0,03$ ($p=0,014$), de $1,34\pm 0,07$ ($p=0,001$) e de $1,72\pm 0,06$ ($p=0,005$), respetivamente, valores significativamente superiores aos do controlo. Ainda se verificou que com a dose de 0,5 Gy a razão BAX/BCL-2 foi estatisticamente inferior à das células irradiadas com as doses de 15 Gy ($p=0,001$), de 30 Gy ($p<0,001$) e de 60 Gy ($p<0,001$) e que com a dose de 15 Gy a razão BAX/BCL-2 foi igualmente estatisticamente inferior à das células irradiadas com as doses de 30 Gy ($p=0,025$) e de 60 Gy ($p<0,001$).

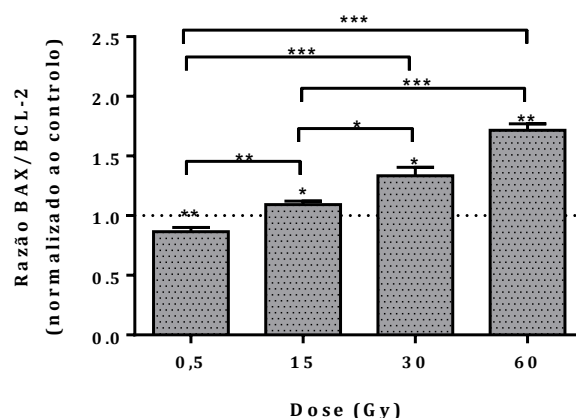


Figura 30: Razão BAX/BCL-2 da linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69. A expressão de BAX e de BCL-2 foi avaliada por citometria de fluxo, recorrendo à marcação com anticorpos monoclonais, 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizada ao controlo (razão BAX/BCL-2 igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$; com ** para $p < 0,01$ e com *** para $p < 0,001$.

Na linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549, como representado na Figura 31, obteve-se uma razão BAX/BCL-2 de $1,11 \pm 0,04$ ($p = 0,03$), de $1,17 \pm 0,05$ ($p = 0,01$), de $1,28 \pm 0,09$ ($p = 0,06$) e de $1,38 \pm 0,04$ ($p = 0,02$) após irradiação com as doses de 0,5 Gy, de 15 Gy, de 30 Gy e de 60 Gy, respetivamente, valores significativamente aumentados em relação ao controlo.

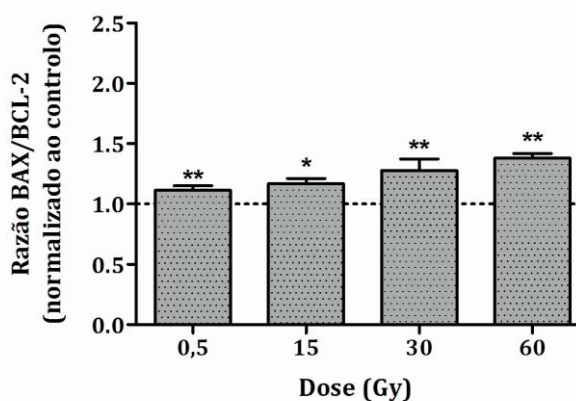


Figura 31: Razão BAX/BCL-2 da linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549. A expressão de BAX e de BCL-2 foi avaliada por citometria de fluxo, recorrendo à marcação com anticorpos monoclonais, 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizada ao controlo (razão BAX/BCL-2 igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$ e com ** para $p < 0,01$.

Na linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299, como

representado na Figura 32, obteve-se uma razão BAX/BCL-2 de $1,40 \pm 0,08$ ($p=0,009$) e de $1,40 \pm 0,08$ ($p=0,03$) após irradiação com as doses de 15 Gy e de 30 Gy, respetivamente, valores significativamente aumentados em relação ao controlo. Após irradiação com a dose de 0,5 Gy obteve-se uma razão BAX/BCL-2 de $1,06 \pm 0,06$, significativamente inferior à das células irradiadas com 15 Gy ($p=0,01$) e com 30 Gy (0,013). Após irradiação com a dose de 60 Gy obteve-se uma razão BAX/BCL-2 de $1,10 \pm 0,05$, valor significativamente inferior à das células irradiadas com 15 Gy ($p=0,038$) e com 30 Gy (0,046).

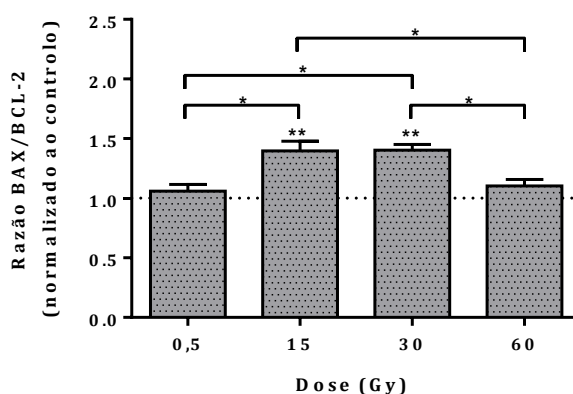


Figura 32: Razão BAX/BCL-2 da linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299. A expressão de BAX e de BCL-2 foi avaliada por citometria de fluxo, recorrendo à marcação com anticorpos monoclonais, 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizada ao controlo (razão BAX/BCL-2 igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$ e com ** para $p < 0,01$.

Na linha celular de cancro do pulmão de linfoma difuso de grandes células B Farage, como representado na Figura 33, obteve-se uma razão BAX/BCL-2 de $1,24 \pm 0,06$ ($p=0,014$), de $1,57 \pm 0,07$ ($p=0,001$), de $1,75 \pm 0,05$ ($p=0,01$) e de $1,90 \pm 0,12$ ($p=0,005$) após irradiação com as doses de 0,5 Gy, de 15 Gy, de 30 Gy e de 60 Gy, relativamente, valores significativamente aumentados em relação ao controlo. Após irradiação com a dose de 0,5 Gy obteve-se uma razão BAX/BCL-2 significativamente inferior à das células irradiadas com 15 Gy ($p=0,04$), com 30 Gy ($p=0,013$) e com 60 Gy ($p < 0,001$). Após irradiação com a dose de 15 Gy obteve-se uma razão BAX/BCL-2 significativamente inferior à das células irradiadas com 60 Gy ($p=0,046$). Os resultados obtidos para a razão BAX/BCL-2 após irradiação com as diferentes doses encontram-se sintetizados Tabela 11.

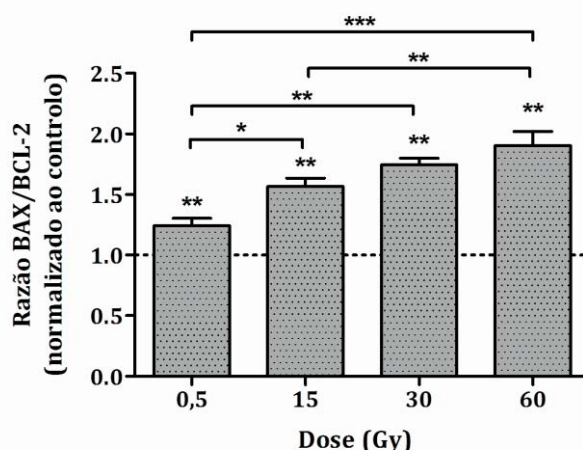


Figura 33: Razão BAX/BCL-2 da linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage. A expressão de BAX e de BCL-2 foi avaliada por citometria de fluxo, recorrendo à marcação com anticorpos monoclonais, 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizada ao controlo (razão BAX/BCL-2 igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p<0,05$; com ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$.

Tabela 11: Razão de BAX/BCL-2 das linhas celulares H69, A549, H1299 e Farage 48 horas após a irradiação.

Dose	Linha celular	Média± Erro Padrão
0,5Gy	H69	0,87±0,04
	A549	1,11±0,04 **
	H1299	1,06±0,08 *
	Farage	1,24±0,06 *** ""
15Gy	H69	1,09±0,03
	A549	1,17±0,05
	H1299	1,40±0,05 °
	Farage	1,57±0,07
30Gy	H69	1,34±0,07
	A549	1,28±0,09 **
	H1299	1,40±0,05 *
	Farage	1,75±0,05 *
60Gy	H69	1,72±0,06
	A549	1,38±0,04 *
	H1299	1,10±0,05 **
	Farage	1,90±0,12

Legenda: Os resultados estão representados em MIF, normalizada ao controlo (razão BAX/BCL-2 igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas entre a linha celular H69 e as restantes linhas celulares estão representadas com * para $p<0,05$, ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$; as diferenças significativas entre a linha celular A549 e as restantes linhas celulares estão representadas com ° para $p<0,05$; as diferenças significativas entre a linha celular H1299 e as restantes linhas celulares estão representadas com "" para $p<0,01$.

A mitocôndria constitui um organelo central na morte celular, principalmente na apoptose. A disrupção do potencial de membrana mitocondrial constitui uma característica distintiva da apoptose que resulta no desacoplamento da cadeia respiratória e na libertação do citocromo C. Neste estudo utilizou-se o indicador de potencial de membrana mitocondrial JC1 que traduz a despolarização da membrana pela razão M/A.

Na linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69, como representado na Figura 34, obteve-se uma razão M/A de $1,24 \pm 0,06$ ($p=0,029$), de $1,38 \pm 0,09$ ($p=0,023$), e de $1,69 \pm 0,16$ ($p=0,022$) após irradiação com as doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy, respetivamente, valores significativamente aumentados em relação ao controlo.

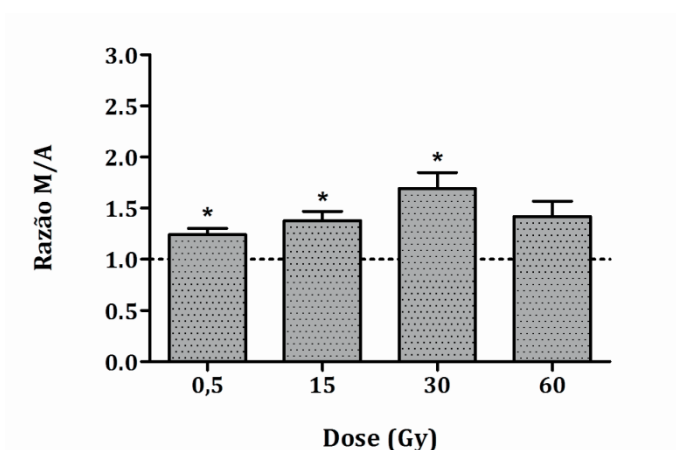


Figura 34: Razão M/A linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69. O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado por citometria de fluxo através do indicado JC1 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizada ao controlo (razão M/A igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$.

Na linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549, como podemos ver na Figura 35 as razões M/A foram de $1,25 \pm 0,03$ ($p < 0,001$), de $1,69 \pm 0,17$ ($p=0,026$), de $1,90 \pm 0,07$ ($p=0,001$), e de $2,43 \pm 0,12$ ($p < 0,001$) após irradiação com as doses de 0,5 Gy, de 15 Gy, de 30 Gy e de 60 Gy, respetivamente, valores significativamente aumentados em relação ao controlo. Ainda se verificou que com a dose de 0,5 Gy a razão M/A foi inferior à das células irradiadas com as doses de 15 Gy ($p=0,01$), de 30 Gy ($p < 0,001$) e de 60 Gy ($p < 0,001$); com a dose de 15 Gy a razão M/A foi inferior à das células irradiadas com a dose de 60 Gy

($p=0,001$); e com a dose de 30 Gy a razão M/A foi inferior à das células irradiadas com a dose de 60 Gy ($p=0,012$).

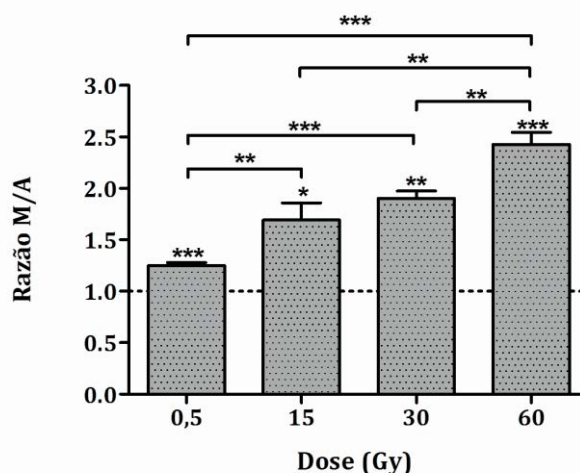


Figura 35: Razão M/A linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549. O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado por citometria de fluxo através do indicado JC1 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizada ao controlo (razão M/A igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p<0,05$; com ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$.

Na linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H1299, como representado na Figura 36, obteve-se uma razão M/A de $0,87\pm 0,05$ ($p=0,029$) após irradiação com a dose de 0,5 Gy que é inferior à do controlo e razões M/A de $1,81\pm 0,02$ ($p<0,001$) e de $1,73\pm 0,08$ ($p=0,021$) após irradiação com as doses de 15 Gy e de 30 Gy, respetivamente, valores significativamente maiores do que os do controlo. Ainda se verificou que com a dose de 0,5 Gy a razão M/A foi inferior à das células irradiadas com as doses de 15 Gy ($p<0,001$), com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e com a dose 60 Gy, em que se obteve um valor de $1,37\pm 0,08$ ($p<0,015$); e, com a dose de 15 Gy a razão foi inferior à das células irradiadas com a dose de 60 Gy ($p=0,044$).

Na linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage, como representado na Figura 37, obteve-se uma razão M/A de $1,07\pm 0,02$ ($p=0,045$), de $1,39\pm 0,04$ ($p=0,02$), de $1,59\pm 0,04$ ($p=0,01$) e de $1,71\pm 0,10$ ($p=0,06$) após irradiação com as doses de 0,5 Gy, de 15 Gy, de 30 Gy e de 60 Gy, respetivamente, valores significativamente maiores do que os do controlo. Ainda se verificou que com a dose de 0,5 Gy a razão M/A foi inferior à das células irradiadas com as doses de 15 Gy

($p=0,016$), com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e com a dose 60 Gy ($p<0,001$); e, com a dose de 15 Gy a razão M/A foi inferior à das células irradiadas com a dose de 60 Gy ($p=0,012$).

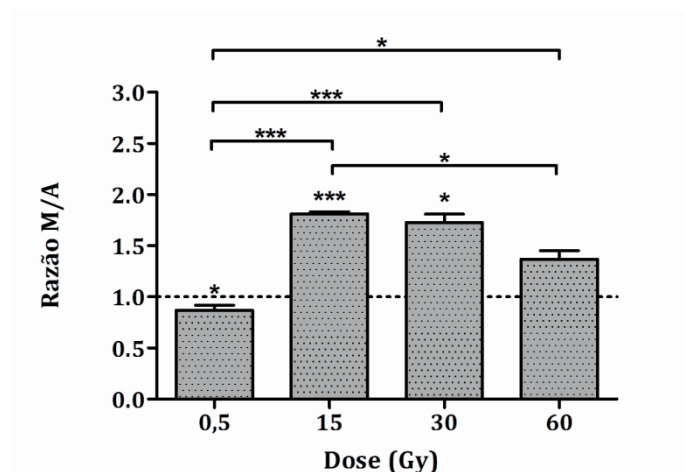


Figura 36: Razão M/A linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299. O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado por citometria de fluxo através do indicado JC1 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizada ao controlo (razão M/A igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p<0,05$ e com *** para $p<0,001$.

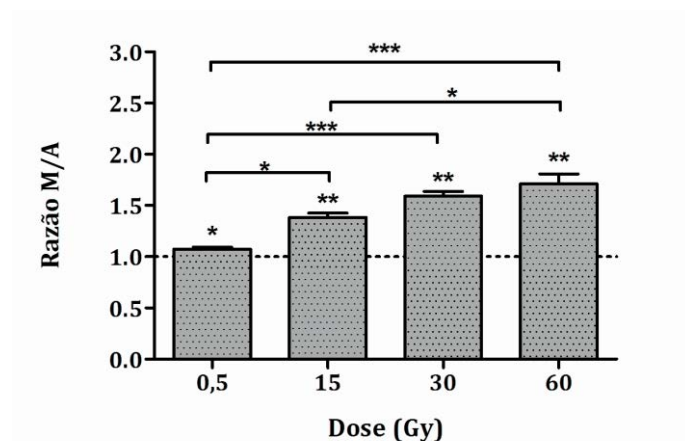


Figura 37: Razão M/A linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage. O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado por citometria de fluxo através do indicado JC1 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizada ao controlo (razão M/A igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p<0,05$; com ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$.

Verificou-se que a linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69 submetida a uma dose de radiação de 0,5 Gy apresentou uma razão M/A significativamente superior à das células H1299 ($p<0,001$) e que a razão M/A destas

foi significativamente superior à das A549 ($p<0,001$). Após irradiação com 15 Gy verificou-se que a razão M/A das células H1299 foi significativamente superior à das células H69 ($p=0,032$), à das A549 ($p=0,009$) e à das Farage ($p<0,001$). Após irradiação com 60 Gy, verificou-se que a razão M/A das células H69 foi significativamente inferior à das células A549 ($p=0,006$).

Os resultados obtidos para a razão M/A após exposição a radiação ionizante encontram-se sintetizados na Tabela 12.

Tabela 12: Razão de M/A das linhas celulares H69, A549, H1299 e Farage 48 horas após a irradiação.

Dose	Linha celular	Média±EP
0,5 Gy	H69	1,24±0,06
	A549	1,25±0,03
	H1299	0,87±0,05**** ^{ooo}
	Farage	1,07±0,02
15 Gy	H69	1,38±0,09
	A549	1,69±0,17
	H1299	1,81±0,02**** ^{ooo}
	Farage	1,39±0,04 ^{'''}
30 Gy	H69	1,69±0,16
	A549	1,90±0,07
	H1299	1,73±0,08
	Farage	1,59±0,04
60 Gy	H69	1,42±0,15
	A549	2,43±0,12**
	H1299	1,37±0,08
	Farage	1,71±0,10

Legenda: Os resultados estão representados em MIF, normalizada ao controlo (razão M/A igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas entre a linha celular H69 e as restantes linhas celulares estão representadas com ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$; as diferenças significativas entre a linha celular A549 e as restantes linhas celulares estão representadas com ^{ooo} para $p<0,001$; e as diferenças significativas entre a linha celular H1299 e as restantes linhas celulares estão representadas com ^{'''} para $p<0,01$.

Stresse oxidativo

No que diz respeito aos efeitos da radiação é incontornável a importância do stresse oxidativo. Como se pode observar Figura 38A, no que respeita à produção

intracelular basal de peróxidos, verificou-se que não há diferenças significativas entre as quatro linhas celulares estudadas. Por outro lado, como se pode observar na figura Figura 38B, verificou-se que a produção basal de anião superóxido pelas células de cancro de pulmão de pequenas células H69 foi de $124,50 \pm 15,87$, valor inferior ao produzido pelas A549, cujo valor foi de $632,75 \pm 134,82$ ($p=0,002$) e só produzido pelas células H1299 que apresentaram um valor de $502,20 \pm 50,74$ ($p=0,04$). Ainda se verificou que a produção intracelular basal de anião superóxido pela linha celular A549 foi superior ao produzido pela linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage que apresentou um valor de $99,64 \pm 18,54$ ($p < 0,001$).

No que respeita ao comportamento da defesa antioxidante glutaciona reduzida, representada na Figura 38C, verificou-se que a expressão na linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69 foi de $67,75 \pm 8,20$, valor significativamente inferior ao obtido na linha celular A549 que foi de $154,38 \pm 14,97$ ($p=0,003$), e ao obtido na linha celular H1299 que foi de $121,25 \pm 18,49$ ($p=0,004$). Ainda se verificou que a expressão de glutaciona reduzida da linha celular A549 foi superior à da linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage, que apresentou um valor de $67,60 \pm 11,52$ ($p=0,002$).

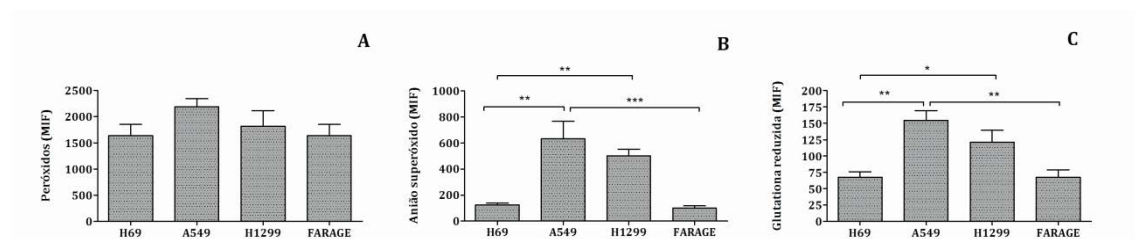


Figura 38: Avaliação do ambiente oxidativo basal. Valores basais de peróxidos (A), de anião superóxido (B) e de glutaciona reduzida (C) em média de intensidade de fluorescência (MIF) por citometria de fluxo nas linhas celulares H69, A549, H1299 e Farage. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro experiências independentes ($n=4$). As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$; com ** para $p < 0,01$ e com *** para $p < 0,001$.

Na linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69, como podemos ver representado na Figura 39, verificou-se que a produção intracelular de peróxidos foi de $1,11 \pm 0,03$ após a irradiação com a dose de 15 Gy ($p=0,02$), de $1,33 \pm 0,06$ após a irradiação com a dose de 30 Gy ($p=0,004$) e de $1,44 \pm 0,03$ após a irradiação com a dose de 60 Gy ($p < 0,001$), valores significativamente maiores do

que os do controlo. Ainda se verificou que com a dose de 0,5 Gy a produção intracelular de peróxidos foi de $1,00 \pm 0,03$ significativamente inferior à produzida pelas células irradiadas com as doses de 15 Gy ($p=0,014$), de 30 Gy ($p<0,001$) e de 60 Gy ($p<0,001$); que com a dose de 15 Gy foi inferior à produzida pelas células irradiadas com as doses de 30 Gy ($p=0,01$) e de 60 Gy ($p<0,001$); e, que com a dose de 30 Gy foi inferior à produzida pelas células irradiadas com a dose de 60 Gy ($p=0,021$).

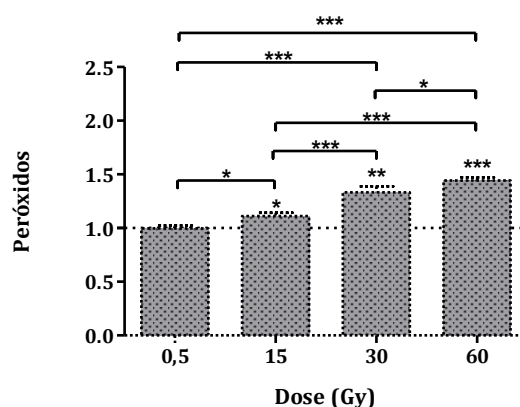


Figura 39: Produção intracelular de peróxidos na linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69. A produção intracelular de peróxidos foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com a sonda específicas DCFH-DA 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p<0,05$; com ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$.

Na Figura 40 e ainda nesta linha celular, verifica-se um aumento da produção intracelular de anião superóxido após exposição à dose de 30 Gy, com um valor de $1,26 \pm 0,04$ ($p<0,001$) e após a exposição à dose de 60 Gy apresentou um valor de $1,06 \pm 0,02$ ($p<0,001$), em relação ao controlo. Ainda se verificou que com a dose de 0,5 Gy a produção intracelular de anião superóxido foi de $0,93 \pm 0,05$, valor significativamente inferior ao produzido pelas células expostas às doses de 30 Gy ($p<0,001$) e de 60 Gy ($p=0,001$); que com a dose de 15 Gy, que apresentou um valor de $0,98 \pm 0,05$, se obteve um valor inferior ao produzido pelas células irradiadas com a dose de 30 Gy ($p<0,001$); e, que com a dose de 30 Gy a produção foi superior à das células irradiadas com a dose de 60 Gy ($p=0,001$).

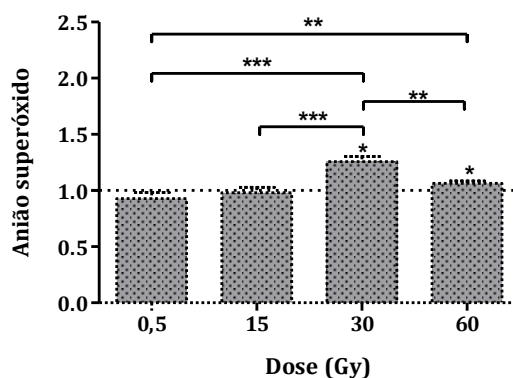


Figura 40: Produção intracelular de anião superóxido na linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69. A produção intracelular de anião superóxido foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com a sonda DHE, 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$; com ** para $p < 0,01$ e com *** para $p < 0,001$.

No que respeita à expressão de glutatona reduzida (Figura 41), apesar de não se terem observado alterações significativas como resposta à radiação em relação às células controlo, verificou-se que as células expostas à dose de 0,5 Gy apresentam um valor de $0,94 \pm 0,03$, expressão significativamente inferior à das expostas à dose de 15 Gy as quais apresentaram um valor de $1,06 \pm 0,02$ ($p < 0,001$) e às expostas à dose de 30 Gy que apresentaram um valor de $1,01 \pm 0,03$ ($p = 0,029$).

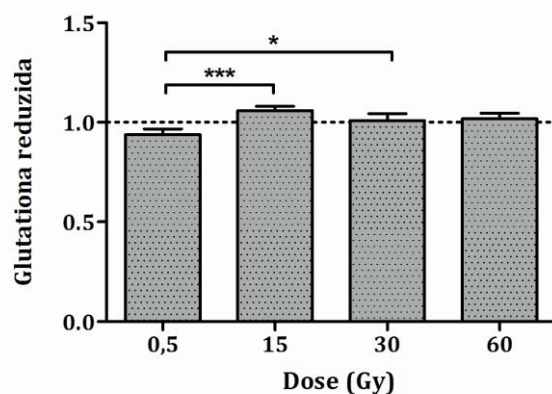


Figura 41: Expressão de glutatona reduzida na linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69. A expressão da defesa antioxidante GSH foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com alaranjado de mercúrio, 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$ e com *** para $p < 0,001$.

Na linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549, como

representado na Figura 42, verificou-se que a produção intracelular de peróxidos foi de $1,28 \pm 0,01$ após a irradiação com a dose de 0,5 Gy ($p < 0,001$), foi de $1,37 \pm 0,03$ após a irradiação com a dose de 15 Gy ($p = 0,001$), foi de $1,64 \pm 0,02$ após a irradiação com a dose de 30 Gy ($p < 0,001$) e foi de $1,69 \pm 0,06$ após a irradiação com a dose de 60 Gy ($p = 0,001$), valores significativamente aumentados em relação ao controlo. Ainda se verificou que com a dose de 0,5 Gy a produção intracelular de peróxidos foi significativamente inferior à das células irradiadas com as doses de 30 Gy ($p = 0,002$) e de 60 Gy ($p < 0,001$); e, que com a dose de 15 Gy foi inferior à das células irradiadas com as doses de 30 Gy ($p = 0,024$) e de 60 Gy ($p = 0,003$).

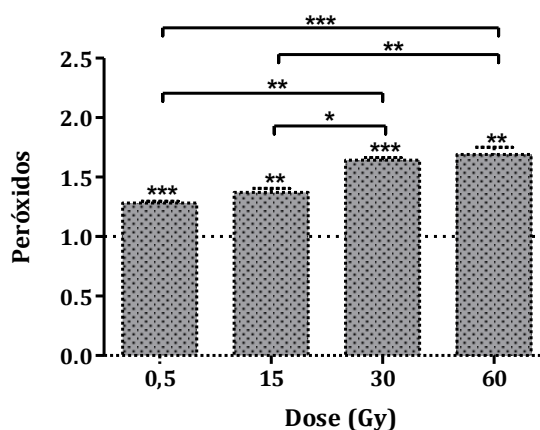


Figura 42: Produção intracelular de peróxidos linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549. A produção intracelular de peróxidos foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com a sonda específicas DCFH-DA, 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$; com ** para $p < 0,01$ e com *** para $p < 0,001$.

Quanto à produção intracelular de anião superóxido (Figura 43) verificou-se um aumento, em relação às culturas celulares controlo, após irradiação com a dose de 0,5 Gy que apresentou um valor de $1,21 \pm 0,02$ ($p < 0,001$), com a dose de 15 Gy, que apresentou um valor de $1,47 \pm 0,04$ ($p = 0,001$), com a dose de 30 Gy, que apresentou um valor de $1,53 \pm 0,03$ ($p < 0,001$) e com a dose de 60 Gy, que apresentou um valor de $1,30 \pm 0,06$ ($p = 0,001$). Ainda se verificou que com a dose de 0,5 Gy a produção intracelular de anião superóxido foi de significativamente inferior à das células irradiadas com as doses de 15 Gy ($p < 0,003$) e de 30 Gy ($p = 0,001$); que com a

dose de 15 Gy foi superior à das células irradiadas com a dose de 60 Gy ($p<0,044$); e, que com a dose de 30 Gy foi superior à das células irradiadas com a dose de 60 Gy ($p<0,007$).

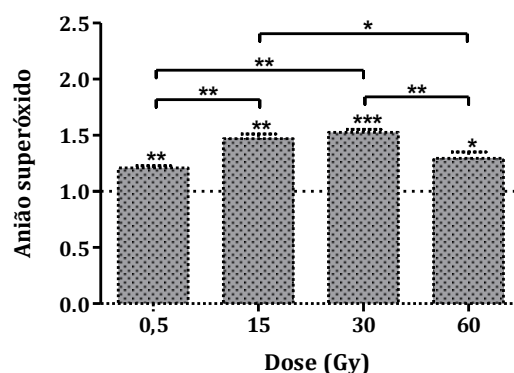


Figura 43: Produção intracelular de anião superóxido na linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549. A produção intracelular de anião superóxido foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com a sondas DHE, 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p<0,05$; com ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$.

A expressão de glutatona reduzida (Figura 44) aumentou significativamente nas células irradiadas com a dose de 15Gy, que apresentaram um valor de $1,21\pm 0,06$ ($p=0,033$), em relação às culturas controlo.

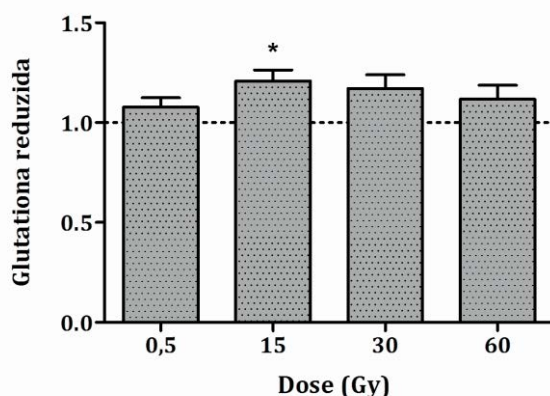


Figura 44: Expressão de glutatona reduzida na linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549. A expressão da defesa antioxidante GSH foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com alaranjado de mercúrio, 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p<0,05$.

Na linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299, como representado na Figura 45, verificou-se que a produção intracelular de peróxidos foi de $1,57 \pm 0,06$ após a irradiação com a dose de 15 Gy ($p < 0,001$), foi de $1,64 \pm 0,04$ após a irradiação com a dose de 30 Gy ($p < 0,001$) e foi de $1,68 \pm 0,01$ após a irradiação com a dose de 60 Gy ($p < 0,001$), valores significativamente aumentados em relação ao controlo. Ainda se verificou que com a dose de 0,5 Gy a produção intracelular de peróxidos foi de $0,97 \pm 0,02$ significativamente inferior à das células irradiadas com as doses de 15 Gy ($p < 0,001$), de 30 Gy ($p < 0,001$) e de 60 Gy ($p < 0,001$).

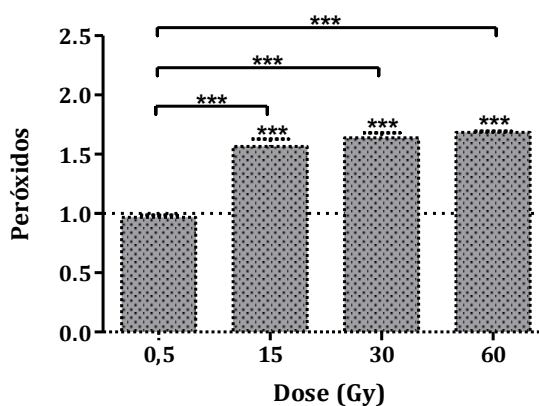


Figura 45: Produção intracelular de peróxidos na linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299. A produção intracelular de peróxidos foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com a sonda específicas DCFH-DA 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com *** para $p < 0,001$.

Relativamente à produção intracelular de anião superóxido (Figura 46) verificou-se um aumento com a dose de 15 Gy, com um valor de $1,46 \pm 0,06$ ($p < 0,001$), com a dose de 30 Gy, com um valor de $1,85 \pm 0,08$ ($p < 0,001$) e com a dose de 60 Gy, com um valor de $2,08 \pm 0,05$ ($p < 0,001$), em relação ao controlo. Ainda se verificou que com a dose de 0,5 Gy a produção intracelular de anião superóxido foi de $1,01 \pm 0,03$, significativamente inferior à produzida pelas células irradiadas com a dose de 15 Gy ($p < 0,001$), com a dose de 30 Gy ($p < 0,001$) e com a dose de 60 Gy ($p = 0,001$); e, que com a dose de 15 Gy foi inferior à das células irradiadas com a dose de 30 Gy ($p < 0,001$) e com a dose de 60 Gy ($p = 0,001$).

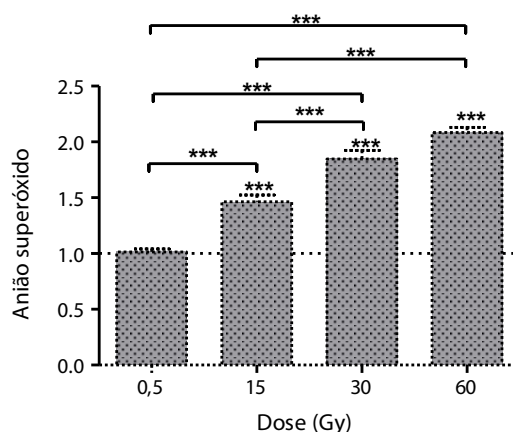


Figura 46: Produção intracelular de anião superóxido na linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299. A produção intracelular de anião superóxido foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com a sondas DHE, 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com *** para $p < 0,001$.

Quanto á expressão de glutaciona reduzida (Figura 47) esta diminuiu em relação às culturas controlo nas células irradiadas com a dose de 60 Gy, que apresentaram um valor de $0,84 \pm 0,08$ mas sem significado estatístico.

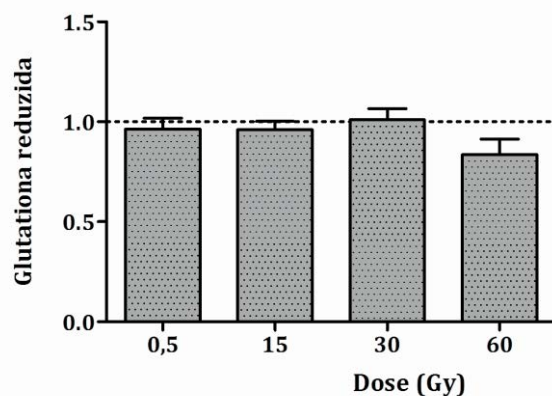


Figura 47: Expressão de glutaciona reduzida na linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299. A expressão da defesa antioxidante GSH foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com alaranjado de mercúrio, 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes.

Na linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage, como representado na Figura 48, verificou-se que a produção intracelular de peróxidos foi de $1,22 \pm 0,07$ após a irradiação com a dose de 15 Gy ($p = 0,043$), de $1,93 \pm 0,08$ após a irradiação com a dose de 30 Gy ($p = 0,001$) e de $1,22 \pm 0,05$ após a irradiação com a

dose de 60 Gy ($p=0,024$), valores significativamente aumentados em relação ao controlo. Ainda se verificou que com a dose de 0,5 Gy a produção intracelular de peróxidos foi de $1,03\pm 0,01$ significativamente inferior à das células irradiadas com a dose de 30 Gy ($p<0,001$); que com a dose de 15 Gy foi inferior à das células irradiadas com a dose de 30 Gy ($p<0,001$); e, que com a dose de 30 Gy foi inferior à das células irradiadas com a dose de 60 Gy ($p<0,001$).

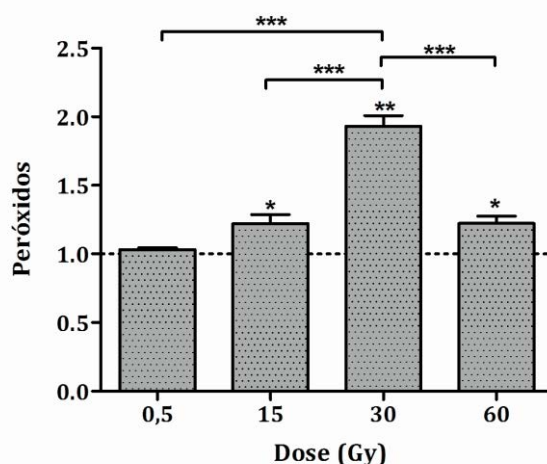


Figura 48: Produção intracelular de peróxidos na linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage. A produção intracelular de peróxidos foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com sondas a sonda DCF-DA, 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p<0,05$; com ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$.

Relativamente à produção intracelular de anião superóxido 48 horas após a irradiação (Figura 49) verificou-se um aumento com a dose de 15 Gy com um valor de $1,39\pm 0,08$ ($p=0,016$), com a dose de 30 Gy com um valor de $1,82\pm 0,15$ ($p=0,011$) e com a dose de 60 Gy que apresentou um valor de $1,55\pm 0,13$ ($p=0,024$). Ainda se verificou que com a dose de 0,5 Gy a produção intracelular de anião superóxido foi de $0,98\pm 0,03$ significativamente inferior à das células irradiadas com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e de 60 Gy ($p=0,007$).

Quanto à expressão de glutatona reduzida (Figura 50), esta diminuiu nas células irradiadas com a dose de 0,5 Gy para um valor de $0,86\pm 0,03$ ($p=0,008$), no entanto, com a dose de 30 Gy e com a dose de 60 Gy aumentou para $1,26\pm 0,09$ ($p=0,046$) e $1,31\pm 0,05$ ($p=0,004$), respetivamente, em relação às culturas celulares controlo. Verificou-se também que a expressão de glutatona reduzida foi inferior

nas células irradiadas com a dose 0,5 Gy em relação às irradiadas com a dose de 30 Gy ($p=0,003$) e com a dose de 60 Gy ($p=0,001$). Após irradiação com a dose de 15 Gy, a expressão de glutathiona reduzida foi de $0,97\pm 0,07$, valor significativamente inferior ao das células irradiadas com a dose de 60 Gy ($p=0,012$).

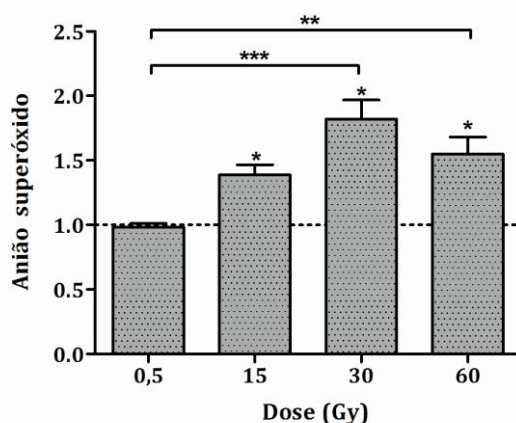


Figura 49: Produção intracelular de anião superóxido na linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage. A produção intracelular de anião superóxido foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com a sondas DHE, 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p<0,05$; com ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$.

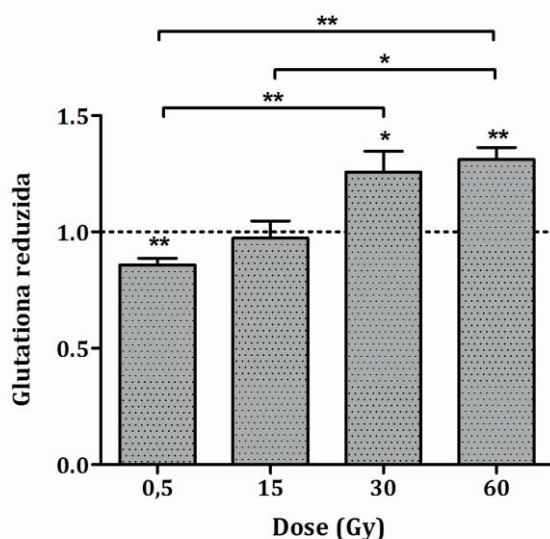


Figura 50: Expressão de glutathiona reduzida na linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage. A expressão da defesa antioxidante GSH foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com alaranjado de mercúrio, 48 horas após a irradiação. Os resultados estão representados em MIF, normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com * para $p<0,05$ e com ** para $p<0,01$.

Se fizermos a comparação entre as diversas linhas celulares irradiadas, verificamos que a linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69 quando submetida a uma dose de 0,5 Gy apresentou uma produção intracelular de peróxidos significativamente inferior à da linha celular A549 ($p < 0,001$) a qual, por sua vez, foi significativamente superior à obtida com a linha celular H1299 ($p < 0,001$) e com a linha celular Farage ($p < 0,001$). Após a irradiação com 15 Gy verificou-se que a produção intracelular de peróxidos pela linha celular H1299 foi superior à produzida pelas linhas celulares H69 ($p = 0,006$), A549 ($p < 0,001$) e Farage ($p = 0,002$). Após a irradiação com a dose de 30 Gy verificou-se que a produção intracelular de peróxidos pela linha celular H69 foi inferior à produzida pela linha celular A549 ($p = 0,002$), pela linha celular H1299 ($p < 0,001$) e pela linha celular Farage ($p < 0,001$). Por sua vez, a produção pela linha celular Farage foi superior à da linha celular A549 ($p = 0,024$) e à da linha celular H1299 ($p = 0,004$). Após a irradiação com a dose de 60 Gy verificou-se que produção intracelular de peróxidos pela linha celular H69 foi superior à da linha celular Farage ($p < 0,001$). Para a mesma dose, a produção intracelular de peróxidos pela linha celular A549 foi superior à da linha celular H69 ($p < 0,001$) e da linha celular H1299 ($p < 0,001$) enquanto a produção pela linha celular H1299 foi superior à da celular Farage ($p < 0,001$).

Quanto à produção intracelular de anião superóxido, a linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549 exposta a uma dose de 0,5 Gy mostrou ser significativamente superior à da linha celular H69 ($p < 0,001$), à da linha celular H1299 ($p = 0,005$) e à da linha celular Farage ($p = 0,004$). Após a irradiação com 15 Gy verificou-se que a produção intracelular de anião superóxido pela linha celular H69 foi inferior à da linha celular A549 ($p = 0,021$), e que a produção pela linha celular H1299 foi superior à da linha celular H69 ($p < 0,001$) e à da linha celular Farage ($p = 0,002$). Após a irradiação com a dose de 30 Gy verificou-se que a produção intracelular de anião superóxido pela linha celular H69 foi inferior à da linha celular A549 ($p = 0,001$) e à da linha celular Farage ($p < 0,001$). Ainda para estas doses a produção pela linha celular H1299 foi superior à das linhas celulares A549 ($p < 0,001$) e Farage ($p = 0,001$). Após a irradiação com a dose de 60 Gy verificou-se que produção intracelular de anião superóxido pela linha celular H69 foi inferior à da linha celular A549 ($p = 0,001$) e à da linha celular H1299 ($p = 0,001$). Para a mesma

dose, a produção intracelular de anião superóxido pela linha celular H1299 foi superior às das linhas celulares A549 ($p<0,001$) e Farage ($p<0,001$).

Em relação à expressão de glutatona reduzida verificou-se que a linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549, após exposição a uma dose de 0,5 Gy, mostrou ser superior à da linha celular H1299 ($p=0,030$) e que a expressão desta linha celular foi significativamente superior à da linha celular Farage ($p=0,006$). Após irradiação com 15 Gy verificou-se que a expressão da linha celular A549 foi superior à da linha celular Farage ($p=0,031$). Quando a irradiação foi com a dose de 60 Gy a glutatona reduzida da linha celular Farage foi superior às das linhas celulares H69 ($p=0,001$) e H1299 ($p<0,001$). Para a mesma dose, a de glutatona reduzida expressa pela linha celular A549 foi superior à da linha celular H1299 ($p=0,009$). Os resultados relativos à avaliação do stresse oxidativo após as irradiações com as várias doses encontram-se sintetizados na Tabela 13.

Tabela 13: Stresse oxidativo nas linhas celulares H69, A549, H1299 e Farage 48 horas após a irradiação.

Dose	Linha celular	Peróxidos Média±EP	Anião superóxido Média±EP	Glutaciona reduzida Média±EP
0,5 Gy	H69	1,00±0,03	0,93±0,05	0,94±0,03
	A549	1,28±0,01***	1,21±0,02***	1,08±0,05
	H1299	0,97±0,02 ^{ooo}	1,01±0,03 ^{oo}	0,97±0,05 ^o
	Farage	1,03±0,01 ^{ooo}	0,98±0,03 ^{oo}	0,86±0,03 ^{'''}
15 Gy	H69	1,11±0,03	0,98±0,05	1,06±0,02
	A549	1,37±0,03	1,47±0,04*	1,21±0,06
	H1299	1,57±0,06 ^{****oo}	1,46±0,06***	0,96±0,04
	Farage	1,22±0,07 ^{****oo}	1,39±0,08 ^{'''}	0,97±0,07 ^o
30 Gy	H69	1,33±0,06	1,26±0,04	1,01±0,03
	A549	1,64±0,02**	1,53±0,03***	1,17±0,07
	H1299	1,64±0,04***	1,85±0,08 ^{ooo}	1,01±0,06
	Farage	1,93±0,08 ^{oo'''}	1,82±0,15 ^{****'''}	1,26±0,09
60 Gy	H69	1,44±0,03	1,06±0,02	1,02±0,03
	A549	1,69±0,06***	1,30±0,06**	1,12±0,07
	H1299	1,68±0,01 ^{ooo}	2,08±0,05 ^{****oo}	0,84±0,08 ^{oo}
	Farage	1,22±0,05 ^{****'''}	1,55±0,13 ^{'''}	1,31±0,05 ^{****'''}

Legenda: EP=Erro Padrão. Os resultados estão representados em MIF, normalizados ao controlo (controlo igual a 1) e expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas entre a linha celular H69 e as restantes estão representadas com * para $p<0,05$, ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$; as diferenças significativas entre a linha celular A549 e as restantes linhas celulares estão representadas com ^o para $p<0,05$; ^{oo} para $p<0,01$ e com ^{ooo} para $p<0,001$; e, as diferenças significativas entre a linha celular H1299 e as restantes linhas celulares estão representadas com ^{'''} para $p<0,01$ e com ^{****} para $p<0,001$.

Ciclo celular

Após a avaliação da morte celular, das proteínas pró e anti-apoptóticas, do potencial de membrana mitocondrial bem como a citomorfologia e as alterações a nível do stresse oxidativo, onde se comprovaram os efeitos citotóxicos induzidos pela radiação ionizante, foram avaliados os efeitos da radiação a nível do ciclo celular. De uma forma geral, a exposição à radiação provocou um aumento das populações celulares presentes nas fases S ou G₂/M do ciclo celular assim como o aparecimento do pico apoptótico.

A avaliação do ciclo celular da linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69, representada na Figura 51 mostra uma distribuição com 62,57±1,49% das células na fase G₀/G₁, com 33,14±1,49% das células na fase S e com 4,29±1,19% das células na fase G₂/M. Após irradiação verificou-se que a população em G₀/G₁ diminuiu para 34,17±3,30% com a dose de 15 Gy ($p<0,001$), mantendo-se em valores semelhantes com a dose de 30 Gy (34,40±3,96%; $p<0,001$) e com a dose de 60 Gy (41,86±1,93%; $p<0,001$). Por sua vez a população na fase S subiu para 51,67±3,28% com a dose de 15 Gy ($p<0,001$) para depois diminuir para valores de 42,00±3,17% com a dose de 30 Gy ($p=0,01$) e a população em G₂/M aumentou significativamente para 16,20±3,99% com a dose de 15 Gy ($p=0,018$), para 20,60±3,20% com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e para 22,29±1,54% com a dose de 60 Gy ($p<0,001$). Verificou-se ainda o aumento do pico apoptótico de 3,14±0,70% no controlo para 18,50±3,36% com a dose de 0,5 Gy ($p=0,004$) valor que se manteve com a dose de 15 Gy (18,50±2,62%; $p=0,004$) e com a dose de 30 Gy (21,40±3,52%; $p<0,001$) seguido de uma ligeira diminuição para valores de 14,60±3,5% com a dose de 60 Gy ($p=0,007$).

Se compararmos agora entre as diferentes doses (Figura 51) verificamos que com a dose de 0,5 Gy, a população em G₀/G₁ foi de 68,00±0,91%, valor significativamente superior ao obtido com a dose de 15 Gy ($p<0,01$), com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e com a dose de 60 Gy ($p=0,005$). Relativamente à população em fase S esta foi de 27,75±1,11% quando a irradiação foi com 0,5 Gy, valor significativamente inferior ao obtido com a dose de 15 Gy ($p<0,001$) e com a dose de 30 Gy ($p=0,003$). Após irradiação com 60 Gy, a população na fase S foi de 35,71±0,92%, valor significativamente inferior ao obtido com a dose de 15 Gy

($p < 0,001$) e com a dose de 30 Gy ($p = 0,013$). Após irradiação com 0,5 Gy o pico apoptótico foi significativamente inferior aos obtidos com a dose de 15 Gy ($p = 0,001$), de 30 Gy ($p = 0,001$) e de 60 Gy ($p = 0,001$).

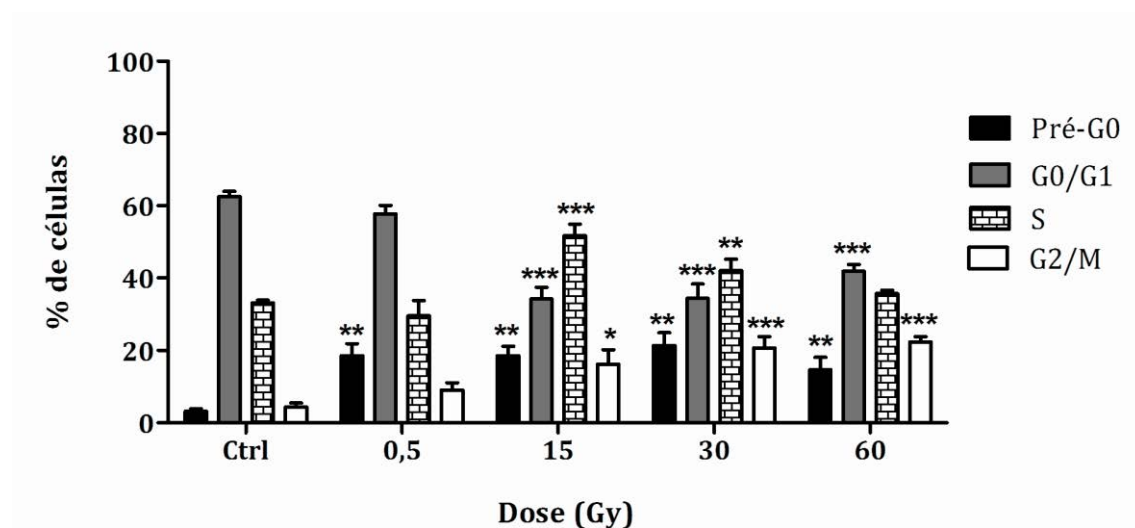


Figura 51: Ciclo celular da linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69 48 horas após a irradiação. A avaliação do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo através da quantificação do DNA marcado com iodeto de propídeo. Os gráficos representam a percentagem de células nas fases pré-G0, G0/G1, S e G2/M. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com * para $p < 0,05$; com ** para $p < 0,01$ e com *** para $p < 0,001$. As comparações entre doses são descritas ao longo do texto.

A avaliação do ciclo celular da linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549, representado na Figura 52 mostrou uma distribuição com $83,50 \pm 1,32\%$ das células na fase G0/G1, com $10,75 \pm 0,85\%$ das células na fase S e com $5,75 \pm 0,63\%$ das células na fase G2/M. Após irradiação verificou-se que a população em G0/G1 diminuiu para $68,00 \pm 0,91\%$ com a dose de 0,5 Gy ($p < 0,001$), mantendo-se em valores semelhantes com a dose de 15 Gy ($71,50 \pm 1,26\%$; $p < 0,001$), com a dose de 30 Gy ($74,00 \pm 0,91\%$; $p = 0,003$) e com a dose de 60 Gy ($73,50 \pm 0,50\%$; $p = 0,001$) enquanto a população na fase S aumentou para $27,75 \pm 1,1\%$ com a dose de 0,5 Gy ($p < 0,001$) e para $11,57 \pm 1,66\%$ com a dose de 30 Gy ($p < 0,001$) atingindo o valor de $3,25 \pm 0,63\%$, abaixo do controlo, com a dose de 60 Gy ($p < 0,001$). Por sua vez a população na fase G2/M aumentou para valores de $15,00 \pm 1,22\%$ com a dose de 30 Gy ($p < 0,001$) e para $23,25 \pm 0,75\%$ com a dose de 60 Gy ($p < 0,001$). Verificou-se ainda o aumento significativo do pico apoptótico de $0,50 \pm 0,29\%$ no controlo para valores de $4,25 \pm 0,95\%$ com a dose de 15 Gy ($p < 0,001$), de $5,25 \pm 0,55\%$ com a dose

de 30 Gy ($p<0,001$) e de $11,75\pm 1,11\%$ com a dose de 60 Gy ($p<0,001$).

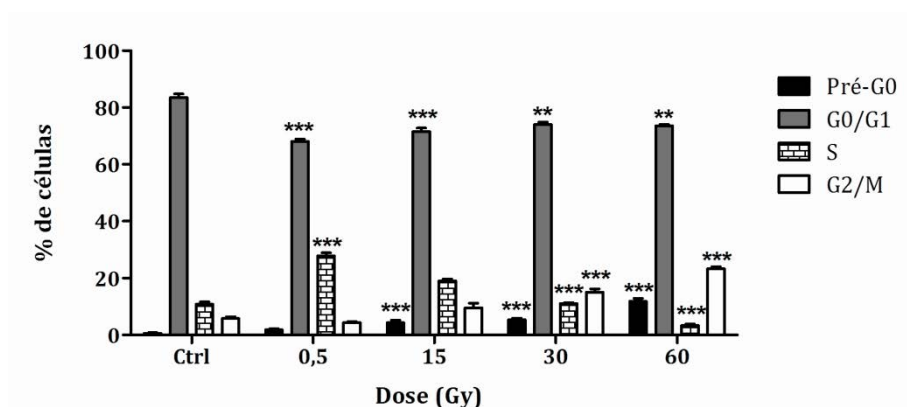


Figura 52: Ciclo celular da linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549 48 horas após a irradiação. A avaliação do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo através da quantificação do DNA marcado com iodeto de propídeo. Os gráficos representam a percentagem de células nas fases pré-G0, G0/G1, S e G2/M. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com * para $p<0,05$; com ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$. As comparações entre doses são descritas ao longo do texto.

Quando comparamos entre as diferentes doses verificamos que após irradiação com a dose de 0,5 Gy, a população na fase G₀/G₁ foi significativamente inferior à obtida com a dose de 30 Gy ($p=0,008$) e com a dose de 60 Gy ($p=0,021$). A população na fase S após irradiação com a dose de 0,5 Gy foi significativamente superior à obtida com as doses de 15 Gy ($p<0,001$), de 30 Gy ($p<0,001$) com a qual apresentou um valor de $11,0\pm 0,41\%$ e de 60 Gy ($p<0,001$). A população na fase G₂/M com a dose de 0,5 Gy teve um valor de $4,25\pm 0,78\%$ que foi significativamente inferior ao obtido com as doses de 15 Gy, que apresentou um valor de $9,50\pm 1,66\%$ ($p=0,029$), de 30 Gy ($p=0,01$) e de 60 Gy ($p<0,001$). Após irradiação com a dose de 15 Gy a população em fase S foi significativamente superior à obtida com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e com a dose de 60 Gy ($p<0,001$). Quanto à população na fase G₂/M, que apresentou um valor de $9,50\pm 1,66\%$ após irradiação com 15 Gy, foi significativamente inferior à obtida com a dose de 30 Gy ($p=0,002$) e com a dose de 60 Gy ($p<0,001$). Após irradiação com a dose de 30 Gy, a população em fase S foi significativamente superior à obtida com a dose de 60 Gy ($p<0,001$) e a população em fase G₂/M foi significativamente inferior à obtida com a dose de 60 Gy ($p=0,001$). Após irradiação com 0,5 Gy o pico apoptótico foi de $1,75\pm 0,48\%$, significativamente inferior ao obtido com as doses de 15 Gy ($p=0,026$), de 30 Gy ($p=0,002$) e de 60 Gy ($p<0,001$).

Após irradiação com 15 Gy o pico apoptótico foi significativamente inferior ao obtido com a dose de 60 Gy ($p=0,003$) enquanto após a irradiação com 30 Gy o pico apoptótico foi significativamente inferior ao obtido com a dose de 60 Gy ($p=0,046$).

A avaliação do ciclo celular da linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299, representado na Figura 53, mostrou uma distribuição com $79,14\pm 1,78\%$ das células na fase G_0/G_1 , com $15,14\pm 1,45\%$ das células na fase S e com $5,71\pm 0,36\%$ das células na fase G2/M. Após irradiação verificou-se que a população na fase G_0/G_1 diminuiu para $61,14\pm 2,69\%$ com a dose de 15 Gy ($p<0,001$), para $18,71\pm 0,97\%$ com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e para $9,71\pm 2,07\%$ com a dose de 60 Gy ($p<0,001$). Quanto à população na fase S, ela diminuiu para $7,57\pm 1,32\%$ com a dose de 15 Gy ($p=0,004$) mantendo-se em valores semelhantes com a dose de 60 Gy ($7,86\pm 1,08\%$; $p=0,004$). Em relação à população em G2/M, esta aumentou para $31,29\pm 2,03\%$ com a dose de 15 Gy ($p<0,001$), para $69,71\pm 1,82\%$ com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e para $82,29\pm 2,67\%$ com a dose de 60 Gy ($p<0,001$). Verificou-se ainda o aumento do pico apoptótico, o qual apresentou valores de $0,57\pm 0,20\%$ no controlo, para valores de $3,57\pm 0,48\%$ com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e para $2,71\pm 0,68$ com a dose de 60 Gy ($p<0,001$).

Quando comparamos entre as diferentes doses verificamos que após irradiação com a dose de 0,5 Gy, a população na fase G_0/G_1 teve um valor de $77,20\pm 1,46\%$ que foi significativamente superior à população obtida quando as irradiações foram de 15 Gy ($p<0,001$), de 30 Gy ($p<0,001$) e de 60 Gy ($p<0,011$). A população em fase S com a dose de 0,5 Gy atingiu $16,80\pm 1,74\%$, valor significativamente superior ao obtido quando a irradiação foi com a dose de 15 Gy ($p=0,005$) ou com a dose de 60 Gy ($p=0,005$) enquanto a população em G2/M, que teve um valor de $6,00\pm 0,55$ com a dose de 0,5 Gy, foi significativamente inferior à obtida após irradiação com as doses de 15 Gy ($p<0,001$), de 30 Gy ($p<0,001$), e de 60 Gy ($p<0,001$). Após irradiação com a dose de 15 Gy a população em fase G_0/G_1 foi significativamente superior à obtida com a dose de 30 Gy ($p<0,001$) e à obtida com a dose de 60 Gy ($p<0,001$) enquanto a população em fase G2/M foi significativamente inferior à obtida com a dose de 30 Gy ($p<0,001$), e à obtida com a dose de 60 Gy ($p<0,001$). Após irradiação com 0,5 Gy o pico apoptótico teve um valor de $0,80\pm 0,20\%$ que foi significativamente inferior ao obtido com a dose de 30 Gy ($p<0,001$). Para a

irradiação com 15 Gy o pico apoptótico teve um valor de $1,29 \pm 0,36\%$ e foi significativamente inferior ao obtido com 30 Gy ($p=0,006$).

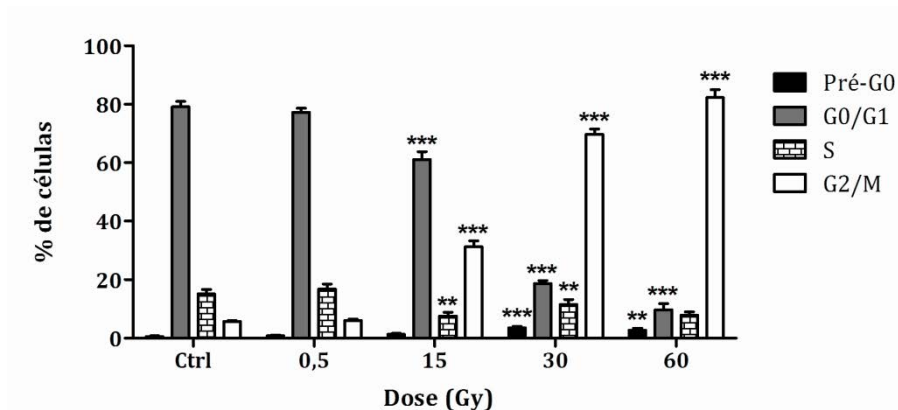


Figura 53: Ciclo celular da linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299 48 horas após a irradiação. A avaliação do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo através da quantificação do DNA marcado com iodeto de propídeo. Os gráficos representam a percentagem de células nas fases pré-G0, G0/G1, S e G2/M. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com * para $p < 0,05$; com ** para $p < 0,01$ e com *** para $p < 0,001$. As comparações entre doses são descritas ao longo do texto.

A avaliação do ciclo celular da linha celular de linfoma difuso de grandes células B, representado na Figura 54, mostrou uma distribuição com $64,20 \pm 1,69\%$ das células na fase G₀/G₁, com $27,40 \pm 1,69\%$ das células na fase S e com $10,40 \pm 1,72\%$ das células na fase G₂/M. Após irradiação, a população em fase G₀/G₁ diminuiu para $31,00 \pm 1,93\%$ com a dose de 15 Gy ($p < 0,001$), mantendo-se em valores semelhantes com a dose de 30 Gy ($32,33 \pm 2,39\%$; $p < 0,001$) mas que sobe para $41,50 \pm 0,96\%$ com a dose de 60 Gy ($p < 0,001$). Em relação à população em G₂/M, esta aumenta para $39,83 \pm 2,68\%$ com a dose de 15 Gy ($p < 0,001$), valor que se mantém com as doses de 30 Gy ($36,50 \pm 2,05\%$; $p < 0,001$) e de 60 Gy ($42,25 \pm 2,75\%$; $p < 0,001$). Verificou-se ainda o aumento do pico apoptótico de $2,60 \pm 0,51\%$ para $12,50 \pm 1,57\%$ com a dose de 15 Gy ($p < 0,001$), para $19,33 \pm 0,99\%$ com a dose de 30 Gy ($p < 0,001$) e para $12,25 \pm 1,60\%$ com a dose de 60 Gy ($p < 0,001$).

Quando comparamos entre as diferentes doses verificamos que após irradiação com a dose de 0,5 Gy, a população em fase G₀/G₁, que teve um valor de $57,17 \pm 1,49\%$, foi significativamente superior à obtida com as irradiações de 15 Gy ($p < 0,001$), de 30 Gy ($p < 0,001$) e de 60 Gy ($p < 0,001$).

Quanto à população em fase S, que teve um valor de $31,57 \pm 2,56\%$, foi

significativamente superior à obtida com a dose de 60 Gy ($p=0,023$) enquanto a população em fase G₂/M, que obteve um valor de $7,17\pm 0,48\%$, foi significativamente inferior à obtida com a dose de 15 Gy ($p<0,001$), com a dose de 30 Gy ($p<0,001$), e com a dose de 60 Gy ($p<0,001$).

Após irradiação com a dose de 60 Gy a população em fase G₀/G₁ foi significativamente superior à obtida após a irradiação com a dose de 15 Gy ($p=0,012$) e com a dose de 30 Gy ($p=0,036$).

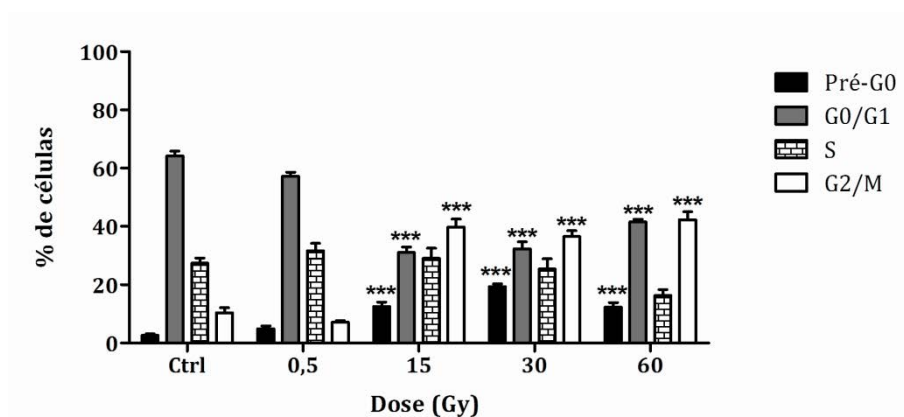


Figura 54: Ciclo celular da linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage, 48 horas após a irradiação. A avaliação do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo através da quantificação do DNA marcado com iodeto de propídeo. Os gráficos representam a percentagem de células nas fases pré-G₀, G₀/G₁, S e G₂/M. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controle estão representadas com * para $p<0,05$; com ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$. As comparações entre doses são descritas ao longo do texto.

Após irradiação com 0,5 Gy o pico apoptótico teve um valor de $4,83\pm 1,01\%$ que foi significativamente inferior ao obtido com as doses de 15 Gy ($p=0,001$), de 30 Gy ($p<0,001$) e de 60 Gy ($p=0,004$). Em relação à irradiação com 30 Gy o pico apoptótico foi significativamente superior ao obtido com a dose de 15 Gy ($p=0,003$) e de 60 Gy ($p=0,007$).

Os resultados relativos à avaliação do ciclo celular após irradiação encontram-se sintetizados na Tabela 14.

Tabela 14: Ciclo celular nas linhas celulares H69, A549, H1299 e Farage 48 horas após a irradiação.

Dose	Linha celular	Pré-G0	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
		Média±EP	Média±EP	Média±EP	Média±EP
Ctrl	H69	3,14±0,70	62,57±1,49	33,14±0,70	4,29±1,19
	A549	0,50±0,29	83,50±1,32	10,75±0,85	5,75±0,63
	H1299	0,57±0,20	79,14±1,78	15,14±1,45	5,71±0,36
	Farage	2,60±0,51	64,20±1,69	27,40±1,69	10,40±1,72
0,5 Gy	H69	18,50±3,36	57,83±2,26	29,50±4,30	9,00±2,02
	A549	1,75±0,48	68,00±0,91	27,75±1,11	4,25±0,78
	H1299	0,80±0,20	77,20±1,46	16,80±1,74	6,00±0,55
	Farage	4,83±1,01	57,17±1,49	31,67±2,56	7,17±0,48
15 Gy	H69	18,50±2,62	34,17±3,30	51,67±3,28	16,20±3,99
	A549	4,25±0,95	71,50±1,26	19,00±0,71	9,50±1,66
	H1299	1,29±0,36	61,14±2,69	7,57±1,32	31,29±2,03
	Farage	12,50±1,57	31,00±1,93	29,00±3,54	39,83±2,68
30 Gy	H69	21,40±3,52	34,40±3,96	42,00±3,17	20,60±3,20
	A549	5,25±0,48	74,00±0,91	11,00±0,41	15,00±1,22
	H1299	3,57±0,48	18,71±0,97	11,57±1,66	69,71±1,82
	Farage	19,33±0,99	32,33±2,39	25,33±3,54	36,50±2,05
60 Gy	H69	14,60±3,50	41,86±1,93	35,71±0,92	22,29±1,54
	A549	11,75±1,11	73,50±0,50	3,25±0,63	23,25±0,75
	H1299	2,71±0,68	9,71±2,07	7,86±1,08	82,29±2,67
	Farage	12,25±1,60	41,50±0,96	16,25±2,14	42,25±2,75

Legenda: EP= Erro Padrão. Os resultados representam a percentagem de células nas fases pré-G₀, G₀/G₁, S e G₂/M. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes.

Genotoxicidade

Como resultado da sua interação a radiação ionizante pode provocar diversas consequências resultantes dos efeitos diretos, dos indiretos, do *bystander* ou ainda uma resposta adaptativa. Quando, como consequência ocorre lesão do DNA, que poderá ser na forma de quebras nas duas cadeias da dupla hélice do DNA ou quebras numa única cadeia da dupla hélice do DNA. Para estudar os efeitos da radiação ionizante no DNA recorreu-se ao ensaio de genotoxicidade, denominado ensaio cometa.

No geral, os nossos resultados permitem afirmar que, 48h após a irradiação, em todas as linhas celulares se verificou um aumento de lesões no DNA com aumento da dose de radiação.

Como se pode observar na Figura 55, referente à linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69, há um aumento do comprimento da cauda dos cometas entre as diferentes condições em estudo, particularmente com a dose de 30 Gy (Figura 55D) e com a dose de 60 Gy (Figura 55E).

O gráfico da Figura 56 mostra o diagrama de extremos e quartis do momento da cauda da linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69. Verificou-se que o momento da cauda foi significativamente maior nas células irradiadas com a dose de 60 Gy do que no controlo ($p<0,001$) e do que com as doses de 0,5 Gy ($p<0,001$), de 15 Gy ($p<0,001$) e de 30 Gy ($p<0,001$).

Em relação à linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549 e conforme podemos observar na Figura 57, há aumento do comprimento da cauda dos cometas entre as diferentes condições em estudo, sendo este aumento mais notório com as doses de 30 Gy (Figura 57D) e de 60 Gy (Figura 57E).

O gráfico da Figura 58 mostra o diagrama de extremos e quartis do momento da cauda da linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549. Verificou-se que o momento da cauda das culturas celulares controlo foi significativamente inferior ao momento da cauda das células irradiadas com as doses de 0,5 Gy ($p<0,001$), de 15 Gy ($p<0,001$), de 30 Gy ($p<0,001$) e de 60 Gy ($p<0,001$). Foi também possível verificar que o momento da cauda das culturas celulares irradiadas com a dose de 0,5 Gy é significativamente inferior ao das irradiadas com a dose de 15 Gy ($p=0,001$), com a dose de 30 Gy ($p<0,001$), e com a dose de 60 Gy ($p<0,001$) enquanto o das culturas celulares irradiadas com a dose de 15 Gy é significativamente inferior ao das irradiadas com as doses de 30 Gy ($p<0,001$) e de 60 Gy ($p<0,001$).

Como se pode observar na Figura 59, referente à linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299, há um aumento do comprimento da cauda dos cometas entre as diferentes condições em estudo, particularmente após irradiação com as maiores doses (Figura 59E).

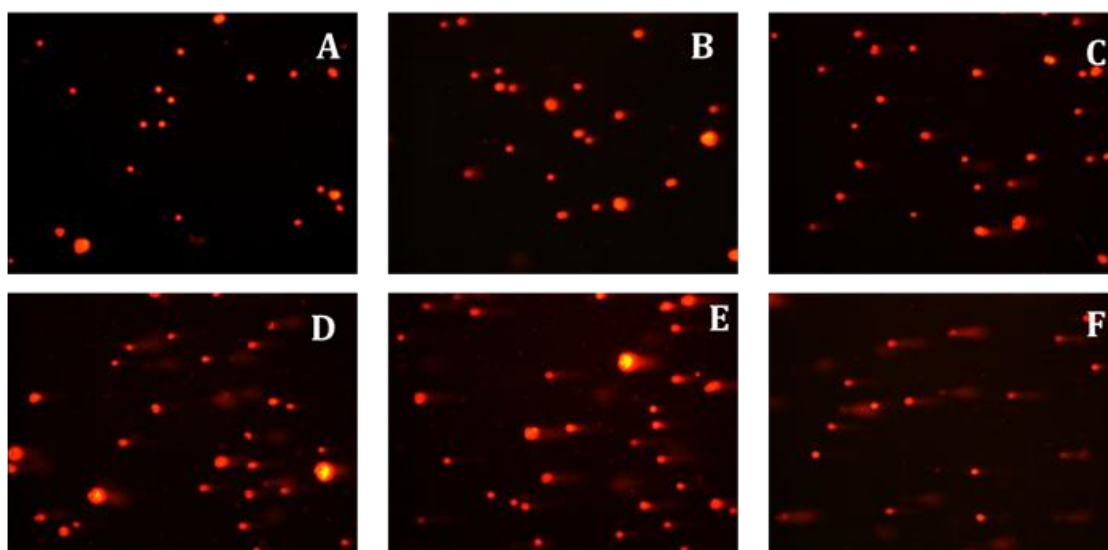


Figura 55: Imagens ilustrativas dos cometas obtidos na linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69. As células foram submetidas à eletroforese em microgel, 48 horas após a exposição à radiação com 0 Gy (A, controlo), 0,5 Gy (B), 15 Gy (C), 30 Gy (D), 60 Gy (E) e após incubação com peróxido de hidrogénio (F, controlo positivo).

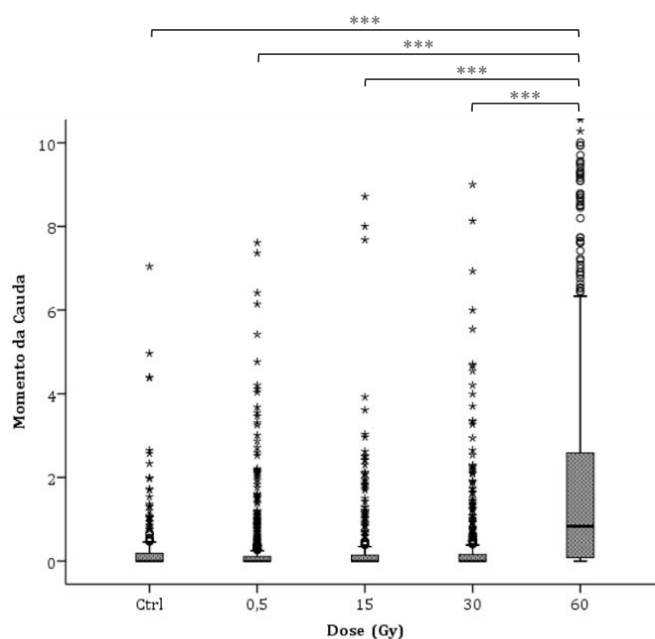


Figura 56: Momento da cauda dos cometas obtidos na linha celular H69. As células foram submetidas à eletroforese em microgel 48 horas após a exposição à radiação com 0 Gy (controlo), 0,5 Gy, 15 Gy, 30 Gy, 60 Gy. Os dados expressam a mediana e a amplitude interquartil de seis experiências independentes (n=6), correspondendo a um mínimo de 100 cometas. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com * para $p < 0,05$; com ** para $p < 0,01$ e com *** para $p < 0,001$.

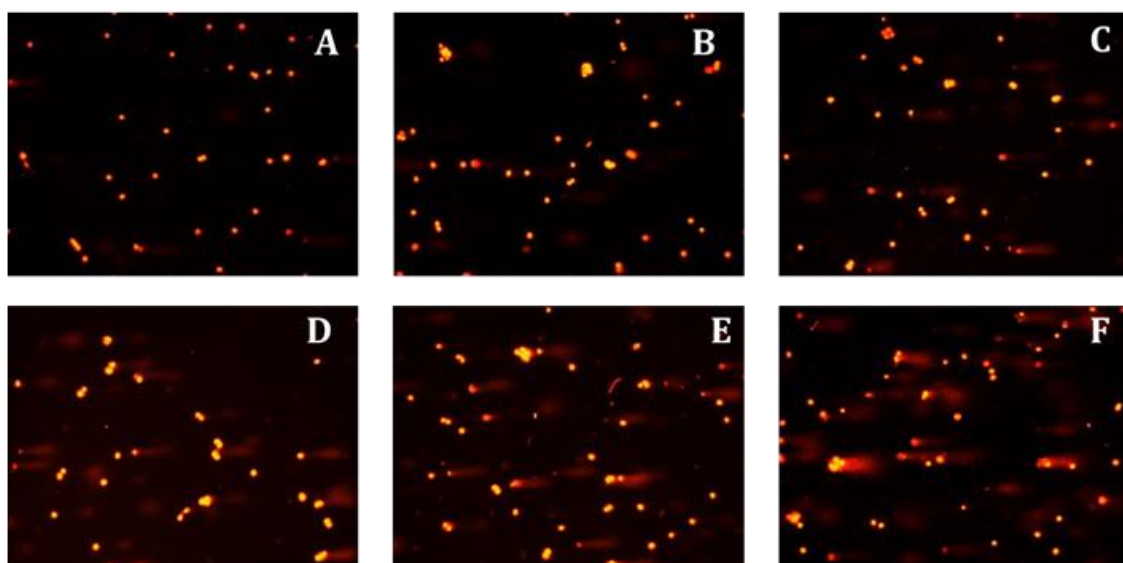


Figura 57: Imagens ilustrativas dos cometas obtidos na linha celular cancro do pulmão de não pequenas células A549. As células foram submetidas à eletroforese em microgel 48 horas após a exposição à radiação com 0 Gy (A, controlo), 0,5 Gy (B), 15 Gy (C), 30 Gy (D), 60 Gy (E) e após incubação com peróxido de hidrogénio (F, controlo positivo).

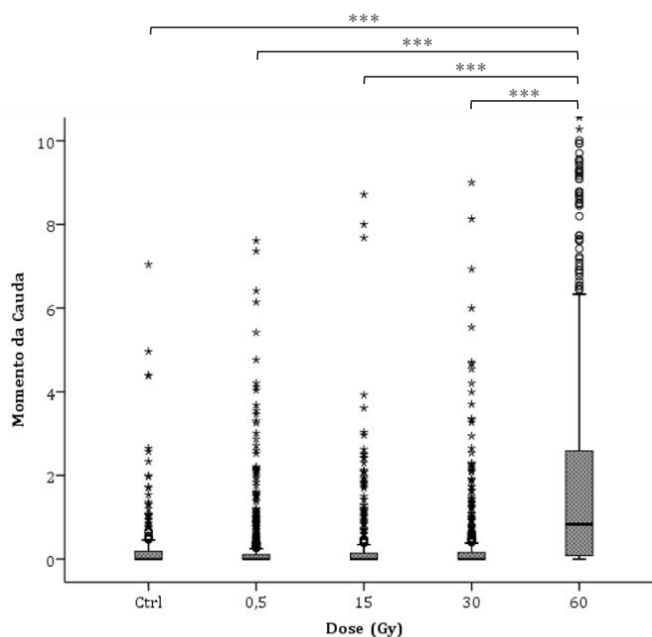


Figura 58: Momento da cauda dos cometas obtidos na linha celular A549. As células foram submetidas à eletroforese em microgel 48 horas após a exposição à radiação com 0 Gy (controlo), 0,5 Gy, 15 Gy, 30 Gy, 60 Gy. Os dados expressam a mediana e a amplitude interquartil de seis experiências independentes (n=6), correspondendo a um mínimo de 100 cometas. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *** para $p < 0,001$.

O gráfico da Figura 60 mostra o diagrama de extremos e quartis do momento da cauda da linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299. Verificou-se que o momento da cauda das culturas controlo foi significativamente inferior ao momento da cauda das células irradiadas com as doses de 0,5 Gy ($p<0,001$), de 15 Gy ($p<0,001$), de 30 Gy ($p<0,001$) e de 60 Gy ($p<0,001$).

Foi também possível verificar que o momento da cauda das culturas celulares irradiadas com a dose de 0,5 Gy é significativamente inferior ao das irradiadas com as doses de 15 Gy ($p=0,001$), de 30 Gy ($p<0,001$) e de 60 Gy ($p<0,001$) e que o das culturas celulares irradiadas com a dose de 15 Gy é significativamente inferior aos das irradiadas com as doses de 30 Gy ($p=0,014$) e de 60 Gy ($p<0,001$). O mesmo se verifica em relação ao momento da cauda das culturas celulares irradiadas com a dose de 30 Gy o qual é significativamente inferior ao das irradiadas com a dose de 60 Gy ($p<0,001$).

Como se pode observar na Figura 61, relativa à linha celular linfoma difuso de grandes células B Farage há um aumento do número de cometas entre as diferentes condições em estudo, particularmente após irradiação com a dose de 30 Gy (Figura 61D) e com a dose de 60 Gy (Figura 61E).

O gráfico da Figura 62 mostra o diagrama de extremos e quartis do momento da cauda da linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage. Verificou-se que o momento da cauda das culturas controlo foi significativamente inferior ao momento da cauda das células irradiadas com as doses de 0,5 Gy ($p<0,001$), de 15 Gy ($p<0,001$), de 30 Gy ($p<0,001$) e de 60 Gy ($p<0,001$). Foi também possível verificar que o momento da cauda das culturas celulares irradiadas com a dose de 0,5 Gy é significativamente inferior aos das irradiadas com as doses de 15 Gy ($p=0,001$), de 30 Gy ($p<0,001$) e de 60 Gy ($p<0,001$).

A mediana e a amplitude interquartil do momento da cauda dos cometas das quatro linhas celulares encontram-se sintetizadas na Tabela 15.

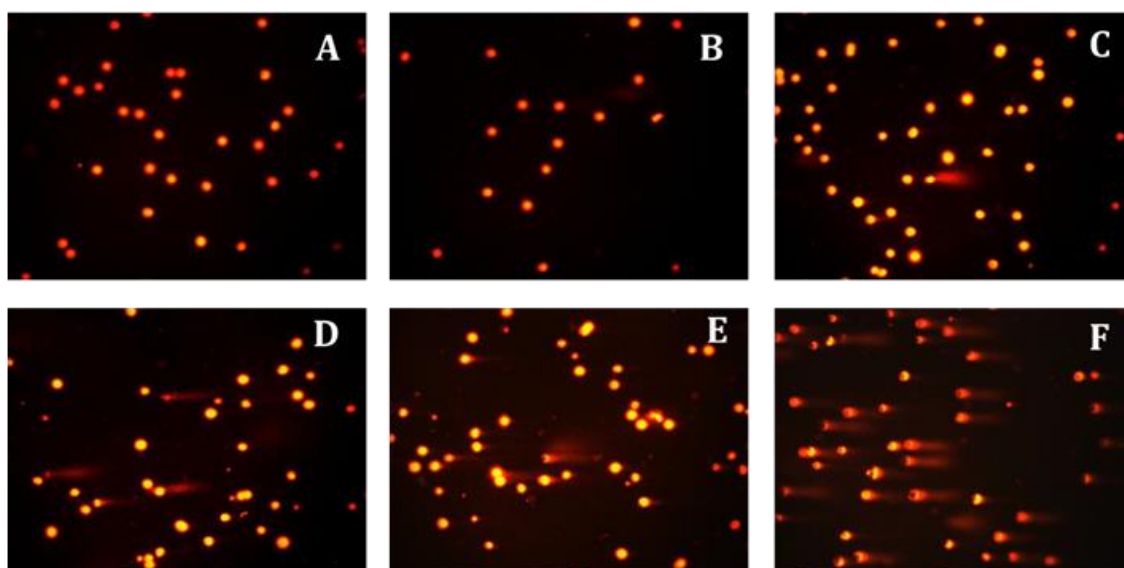


Figura 59: Imagens ilustrativas dos cometas obtidos na linha celular cancro do pulmão de não pequenas células H1299. As células foram submetidas à eletroforese em microgel 48 horas após a exposição à radiação com 0 Gy (A, controlo), 0,5 Gy (B), 15 Gy (C), 30 Gy (D), 60 Gy (E) e após incubação com peróxido de hidrogénio (F, controlo positivo).

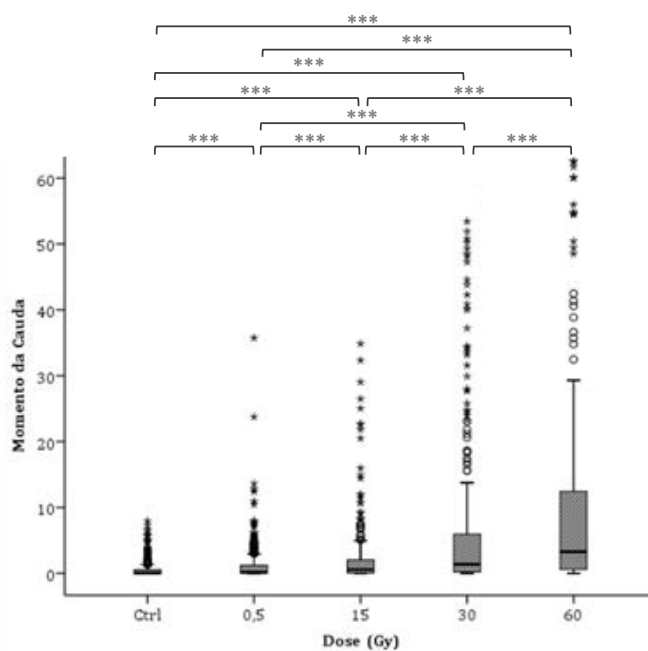


Figura 60: Momento da cauda dos cometas obtidos na linha celular H1299. As células foram submetidas à eletroforese em microgel 48 horas após a exposição à radiação com 0 Gy (controlo), 0,5 Gy, 15 Gy, 30 Gy, 60 Gy. Os dados expressam a mediana e a amplitude interquartil de seis experiências independentes (n=6), correspondendo a um mínimo de 100 cometas. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *** para $p < 0,001$.

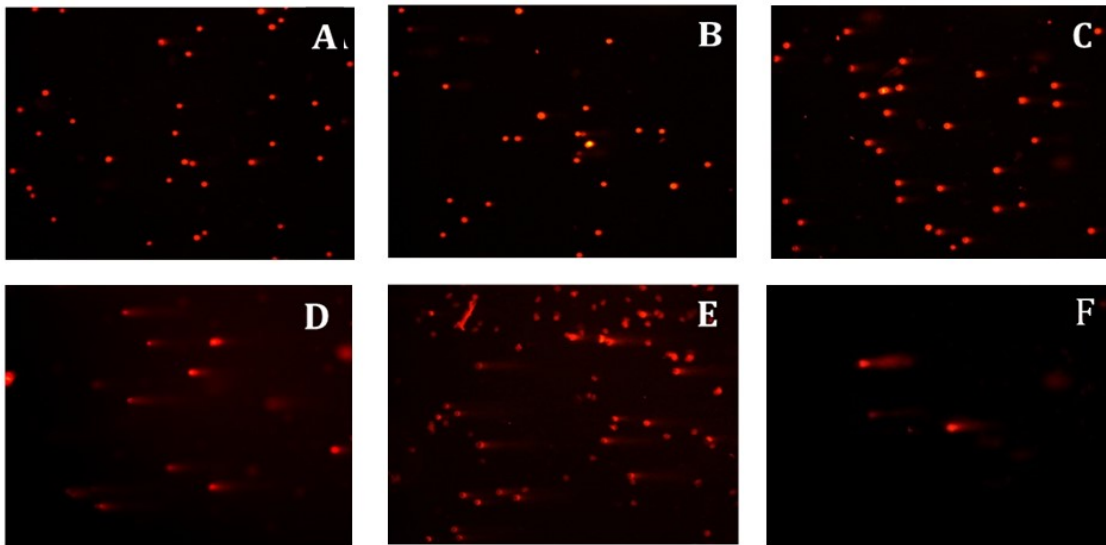


Figura 61: Imagens ilustrativas dos cometas obtidos na linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage. As células foram submetidas à eletroforese em microgel 48 horas após a exposição à radiação com 0 Gy (A, controlo), 0,5 Gy (B), 15 Gy (C), 30 Gy (D), 60 Gy (E) e após incubação com peróxido de hidrogénio (F, controlo positivo).

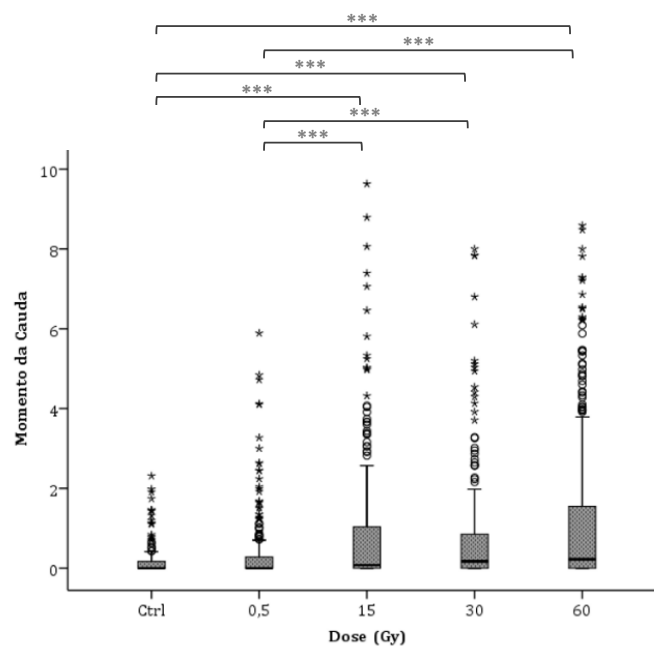


Figura 62: Momento da cauda dos cometas obtidos na linha celular Farage. As células foram submetidas à eletroforese em microgel 48 horas após a exposição à radiação com 0 Gy (controlo), 0,5 Gy, 15 Gy, 30 Gy, 60 Gy. Os dados expressam a mediana e a amplitude interquartil de seis experiências independentes (n=6), correspondendo a um mínimo de 100 cometas. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *** para $p < 0,001$.

Tabela 15: Genotoxicidade nas linhas celulares H69, A549, H1299 e Farage 48 horas após a irradiação.

Dose	Linha celular	Momento da Cauda	
		Mediana	AIQ
0,5 Gy	H69	0,000	0,105
	A549	0,073	0,097***
	H1299	0,175	1,196***
	Farage	0,000	0,280
15 Gy	H69	0,00	0,141
	A549	0,028	11150***
	H1299	0,576	10375,0***
	Farage	0,075	0,070***
30 Gy	H69	0.00	0.163
	A549	1035	10615,0***
	H1299	1,375	5,830***
	Farage	0,17	0,865***
60Gy	H69	0.934	2507206,0***
	A549	0,686	6,699***
	H1299	3,273	0,865***
	Farage	0,233	1,560***

Legenda: AIQ= Amplitude interquartil. As diferenças significativas estão representadas com*** para $p < 0,001$.

Proteína P53

O gene TP53 codifica um importante fator de transcrição supressor de tumores, a proteína P53, que desempenha um papel importante na regulação de respostas celulares à lesão no DNA. As mutações ou as deleções no gene TP53 são encontradas em mais de 50% dos tumores humanos.

A expressão basal da proteína P53 nas linhas celulares de cancro do pulmão de pequenas células H69, cancro do pulmão de não pequenas células A549 e H1299 e linfoma difuso de grandes células B Farage, encontra-se representada na Figura 63.

Na linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69 e de não pequenas células H1299, não foi possível detetar a proteína P53. Na linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549, observou-se uma expressão média de P53 de $0,36 \pm 0,33$, enquanto na linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage se observou uma expressão média de P53 de $0,56 \pm 0,19$ (Figura 63).

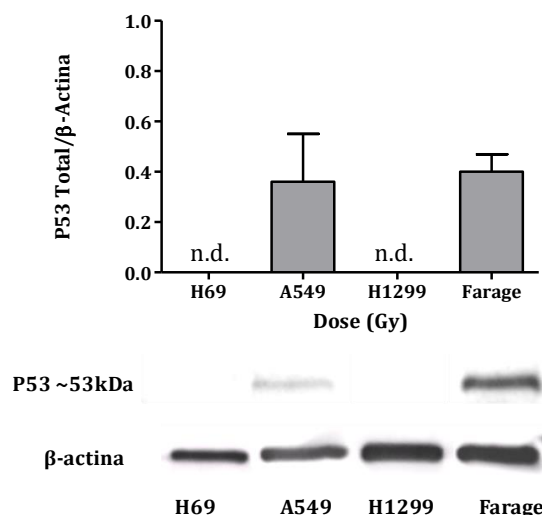


Figura 63: Expressão da proteína P53 na linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69 nas linhas celulares de não pequenas células A549 e H1299 e na linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage. A expressão da proteína P53 foi obtida for western blot de extractos totais de proteína. O gráfico representam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína P53 e da actina para cada um dos casos. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da proteína P53 e da respetiva β -actina (razão P53/ β -actina igual a 1).

No que concerne à linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69, submetida a irradiação com a dose de 0,5 Gy, com a dose de 15 Gy e com a dose de 30 Gy, verificou-se que a expressão da proteína P53 se manteve não detetável como se pode constatar no *immunoblot* apresentado na Figura 64.

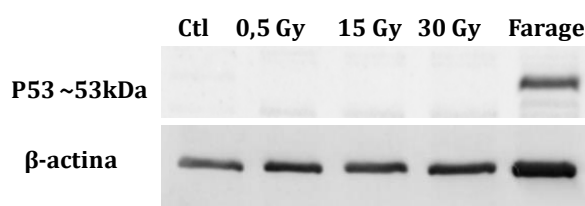


Figura 64: Imunoblot representativo da expressão da proteína P53 na linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69. A expressão da proteína P53 foi obtida for *western blot* de extractos totais de proteína preparados 48 horas após a irradiação com as doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy. A linha celular de linfoma difuso de grandes células B (Farage) foi utilizada como controlo positivo.

Para a linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549, foi possível observar e quantificar a expressão da proteína P53, ilustrada na Figura 65A, bem como da proteína P53 fosforilada representada na Figura 65B. Na linha celular A549, não se observaram diferenças significativas na expressão da proteína P53 total entre as células submetidas a diferentes doses de radiação e o

controlo apesar de, tendencialmente, se observar um aumento da expressão com o aumento da dose. Relativamente à proteína P53 fosforilada, observou-se um aumento significativo após irradiação com a dose de 15 Gy para um valor de $1,73 \pm 0,21$ ($p < 0,001$), como se pode observar na Figura 65B.

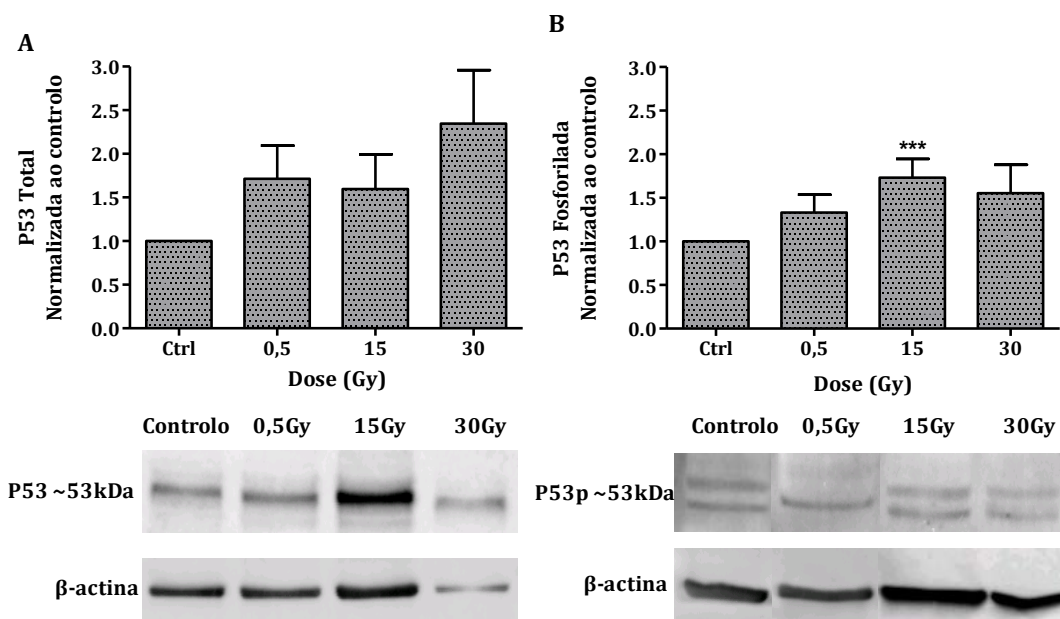


Figura 65: Expressão da proteína P53 (A) e da proteína P53 fosforilada (B) na linha celular de cancro do pulmão de pequenas células A549. A expressão da proteína P53 foi obtida for *western blot* de extractos totais de proteína preparados 48 horas após a irradiação com as doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy. Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína P53 e da actina para cada um dos casos. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da proteína P53 e da respetiva β-actina (razão P53/β-actina igual a 1). As diferenças significativas em relação ao controlo estão representads com *** para $p < 0,001$.

Na linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H1299 não foi possível detetar expressão quantificável da proteína P53, tal como mencionado anteriormente, situação que se manteve inalterada após irradiação com a dose de 0,5 Gy, com a dose de 15 Gy e com a dose de 30 Gy como se pode constatar no *immunoblot* representado na Figura 66.

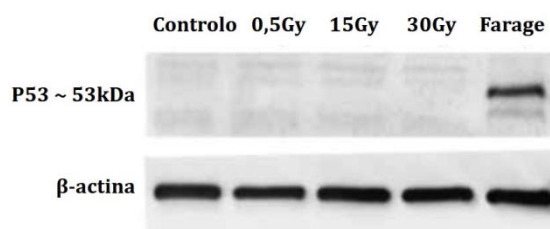


Figura 66: *Imunoblot* representativo da expressão da proteína P53 na linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299. A expressão da proteína P53 foi obtida for *western blot* de extractos totais de proteína preparados 48 horas após a irradiação com as doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy. A linha celular de linfoma difuso de grandes células B (Farage) foi utilizada como controlo positivo.

Para a linha celular de cancro do linfoma difuso de grandes células B Farage, quantificou-se a expressão da proteína P53 total (Figura 67-A) bem como da proteína P53 fosforilada (Figura 67-B). Nesta linha celular observou-se um aumento significativo da P53, em relação ao controlo, para valores de $1,90 \pm 0,11$ após irradiação com a dose de 15 Gy ($p=0,001$) e de $2,74 \pm 0,26$ após irradiação com a dose de 30 Gy ($p=0,001$). Verificou-se que a expressão da proteína P53 foi significativamente inferior nas culturas celulares irradiadas com a dose de 0,5 Gy, que apresentaram um valor de $0,91 \pm 0,06$, do que com a dose de 15 Gy ($p=0,015$) e do que com a dose de 30 Gy ($p<0,001$).

No que respeita à proteína P53 fosforilada verificou-se um aumento significativo da sua expressão em relação ao controlo após exposição à dose de 0,5 Gy que apresentou um valor de $1,22 \pm 0,07$ ($p=0,044$), após exposição à dose de 15 Gy que apresentou um valor de $1,64 \pm 0,16$ ($p=0,007$) e após exposição à dose de 30 Gy, que apresentou um valor de $2,66 \pm 0,24$ ($p=0,006$), como se pode observar na Figura 67-B. Deste modo, a expressão da proteína P53 fosforilada é significativamente inferior após irradiação com a dose de 0,5 Gy, comparativamente à irradiação com as dose de 30 Gy ($p<0,001$) e é inferior após irradiação com a dose de 15 Gy, comparativamente à irradiação com a dose de 30 Gy ($p<0,001$), como se pode constatar na Figura 67-B.

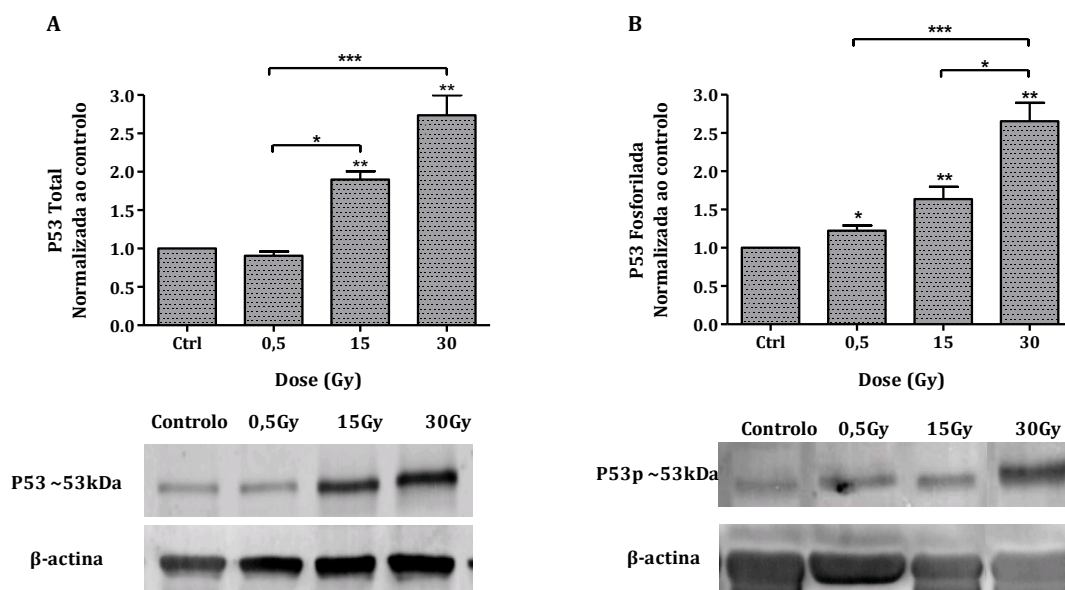


Figura 67: Expressão da proteína P53 (A) e da proteína P53 fosforilada (B) na linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage. A expressão da proteína P53 foi obtida por *western blot* de extractos totais de proteína preparados 48 horas após a irradiação com as doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy. Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As imagens constituem um *imunoblot* ilustrativo da expressão da proteína P53 e da actina para cada um dos casos. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da proteína P53 e da respetiva β-actina (razão P53/β-actina igual a 1). As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com * para $p < 0,05$, com ** para $p < 0,001$ e com *** para $p < 0,001$.

Considerando as linhas celulares A549 e Farage, que apresentaram expressão de P53, verificou-se que a expressão desta proteína foi superior na linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549 em relação à linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage, que apresentou um valor de $0,91 \pm 0,06$ ($p = 0,015$), após irradiação com a dose de 0,5 Gy.

No que respeita à proteína P53 fosforilada, contudo, a linha celular A549 apresentou uma razão média de $1,55 \pm 0,32$, significativamente inferior à observada na linha celular Farage, que apresentou um valor médio de $2,66 \pm 0,24$ ($p = 0,039$) após irradiação com a dose de 30 Gy. Os resultados relativos à expressão da proteína P53 e da proteína P53 fosforilada, após irradiação das linhas celulares A549 e Farage encontram-se sintetizados na Tabela 16.

Tabela 16: Expressão da proteína P53 total e fosforilada nas linhas celulares A549 e Farage, 48 horas após a irradiação.

Dose	Linha celular	P53	P53 Fosforilada
		Média±EP	Média±EP
0,5 Gy	A549	1,71±0,38	1,33±0,20
	Farage	0,91±0,06	1,22±0,07*
15 Gy	A549	1,60±0,39	1,73±0,21***
	Farage	1,90±0,11**	1,64±0,16**
30 Gy	A549	2,35±0,61	1,55±0,32
	Farage	2,74±0,26**	2,66±0,24**

Legenda: EP=Erro Padrão. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da proteína de interesse e da respetiva β -actina (razão proteína de interesse/ β -actina do controlo igual 1). Os valores representam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * que corresponde a $p < 0,05$, com ** para $p < 0,001$ e com *** para $p < 0,001$.

DISCUSSÃO

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo (Torre et al, 2015). As estratégias terapêuticas incluem a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. A quimioterapia e/ou a radioterapia adjuvantes são realizadas com o propósito de erradicar as células tumorais remanescentes que permanecem, mesmo depois da cirurgia, ou que se encontram disseminadas.

O cancro do pulmão é um dos tipos de cancro mais frequentes em todo o mundo e que, há várias décadas, mantém uma das mais elevadas incidências (Ettinger et al, 2012; Panel chair, 2015). O tipo mais frequente é o cancro do pulmão de não pequenas células que comumente desenvolve resistência à radioterapia e à quimioterapia e é diagnosticado, na maioria dos casos, em estádios inoperáveis (Panel chair, 2015; Torre et al, 2015). Porém, a baixa sensibilidade à radiação deste tipo de cancro do pulmão é uma das principais razões para o insucesso da radioterapia (Han et al, 2009). Por outro lado, o cancro do pulmão de pequenas células caracteriza-se por ser um tumor sensível à quimioterapia e à radioterapia, no entanto, é geralmente fatal. Apesar da boa resposta inicial ao tratamento, quer

quando localizado apenas no pulmão quer quando há extensão aos gânglios linfáticos intratorácicos, este tipo de cancro do pulmão frequentemente adquire quimiorresistência e radorresistência e torna-se altamente metastático (Tolosa *et al*, 2003; Shepherd *et al*, 2013; Panel chair, 2015). No tratamento do cancro do pulmão a combinação da radioterapia com a quimioterapia constitui uma abordagem frequente, com vista a aumentar o controlo local do tumor, apesar da maior citotoxicidade para os tecidos envolventes (Johnson *et al*, 2006; Anscher, 2010).

O linfoma difuso de grandes células B é reconhecido como um grupo heterogéneo de doenças hematológicas malignas que, coletivamente, formam o tipo mais comum e agressivo de linfoma não Hodgkin. O linfoma difuso de grandes células B pode ser subdividido em linfoma difuso de grandes células B do centro germinativo B, em linfoma difuso de grandes células B ativadas e em linfomas difusos de grandes células B inclassificáveis, que correspondem a 15% dos casos (Mendes *et al*, 2015b).

O tratamento com R-CHOP proporcionou resultados muito eficazes em estágio limitado (estádios I e II) e em estágio avançado (estádios III e IV) da doença. No entanto, esta terapêutica pode ser responsável por toxicidades que, eventualmente, poderiam ser evitadas com recurso à radioterapia. Assim, no caso de doentes com doença localizada (estádios I e II) e que não respondem à quimioterapia, a abordagem mais adequada pode ser o tratamento conjunto de R-CHOP com radioterapia (Sabattini *et al*, 2010; Mendes *et al*, 2015b).

Tendo em conta o estado da arte, a radioterapia com base em doses individuais elevadas não se encontra muito estudada. No entanto, devido às recentes inovações nos dispositivos de irradiação, no planeamento e na utilização de técnicas de imagem tridimensional e funcional, integrados nos regimes de tratamento, justifica-se avaliar os modelos que melhor se ajustam à entrega da dose de radiação. Esta perspetiva deve ser integrada com o perfil celular e molecular do tumor e os mecanismos envolvidos na progressão da doença. Neste sentido, pretendeu-se avaliar o efeito da exposição a diferentes doses de radiação, administrada em dose única, em modelos *in vitro* de tumores do pulmão e de linfoma não-Hodgkin, especialmente no que respeita ao efeito na proliferação e na viabilidade celulares,

no tipo de morte celular, nos níveis de stresse oxidativo, na disfunção mitocondrial, na lesão no DNA e na expressão de P53. Paralelamente pretendeu-se avaliar o reflexo periférico da radioterapia no sistema imunitário, através de estudos em doentes com cancro do pulmão e em doentes com linfoma difuso de grandes células B que foram submetidos ao tratamento com radioterapia.

O presente estudo pretende contribuir para um melhor conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares despoletados pela radiação ionizante quando depositada em dose única, de forma a conseguir o melhor aproveitamento das técnicas de radioterapia recentemente desenvolvidas, bem como dos equipamentos mais avançados, com vista ao tratamento de doentes com diferentes tipos de cancro.

Os estudos *in vitro* foram realizados com um acelerador linear que fornece fotões de baixa energia. Este tipo de equipamento é utilizado no tratamento de radioterapia fracionada convencional com baixas doses individuais de radiação ionizante (tradicionalmente de cerca de 2 Gy) assim como em abordagens mais recentes, como por exemplo a SABR ou a SBRT que utilizam maiores doses de radiação ionizante, administrada de forma hipofracionada.

Os efeitos da radiação ionizante, através da administração de doses entre 0,5 Gy e os 60 Gy, foram avaliados em quatro linhas celulares, três representativas de tumores sólidos, cancro do pulmão de pequenas células (H69) e cancro do pulmão de não pequenas células (A549 e H1299) e numa linha celular de tumor hematopoiético, o linfoma difuso de grandes células B (Farage).

O tempo de duplicação das diferentes linhas celulares variou entre as 22 horas e as 30 horas, com um tempo médio de 25 horas. Especificamente, foi de 24 horas para a linha celular H69, de 22 horas para a linha celular A549, de 25 horas para a linha celular H1299 e de 30 horas para a linha celular Farage (Mirski *et al*, 1987; Suzuki, 2004; Petrich *et al*, 2012; Sak *et al*, 2012). A semelhança entre estes tempos permite inferir que todas as linhas terão uma dinâmica de proliferação celular idêntica.

No contexto da radiobiologia, a morte celular é definida como qualquer processo que leve à perda da capacidade proliferativa das células. Assim, quando avaliamos a proliferação celular através do ensaio clonogénico, as células que após exposição à radiação não são capazes de formar colónias não são contabilizadas.

Deste modo, os resultados obtidos com este ensaio, que geralmente se correlacionam com a resposta tumoral *in vivo*, dão-nos informações relevantes acerca desta problemática (Hall, 1985; Suntharalingam *et al*, 2007).

Os ensaios do alamar *blue*[®] e o do azul tripiano dão informações sobre as lesões celulares que, a curto prazo, influenciam a atividade metabólica, o ambiente redox e a integridade membranar. Contudo, podem ser produzidas lesões cujos efeitos sejam apenas observáveis a longo prazo, como é o caso da capacidade de produção de colónias celulares. Deste modo, a sobrevivência celular foi avaliada recorrendo ao ensaio clonogénico, considerado o ensaio *gold standard* para estudos que envolvam radiação ionizante (Hall, 1985; Suntharalingam *et al*, 2007; Rafehi *et al*, 2011). Através do cálculo do fator de sobrevivência, parâmetro que relaciona o número de colónias formadas nas condições da irradiação com as obtidas na condição controlo, pode-se inferir acerca do efeito produzido pelas diferentes doses de radiação na capacidade proliferativa das células (Franken *et al*, 2006).

Os fatores de sobrevivência celular obtidos para as diferentes doses de radiação permitem traçar as curvas de sobrevivência em função da dose de radiação (SF vs. Dose) e correlacionar a sobrevivência com os modelos de resposta à agressão da radiação ionizante, tendo em conta o modelo *um só alvo um só toque* que corresponde ao modelo linear e o modelo *vários alvos vários toques* que corresponde ao modelo linear quadrático. O modelo *um só alvo um só toque* baseia-se na teoria de que na célula existem alvos especialmente importantes, nomeadamente o DNA que, quando lesados, são suficientes para induzir morte celular e que a lesão em cada alvo desencadeia uma resposta independente. Por outro lado, o modelo linear quadrático baseia-se no facto de que as múltiplas lesões provocadas pela exposição à radiação ionizante desencadeiam uma interação entre as respostas, de modo a eliminar eficazmente as células. A teoria de que duas ou mais lesões podem interagir de forma a provocar morte celular é descrita com recurso a uma equação que, no geral, se adequa a um vasto leque de curvas de sobrevivência em estudos experimentais (Joiner & Kogel, 2009).

As curvas obtidas para a resposta à radiação com doses até 12 Gy, representadas na Figura 15, mostraram que existe um decréscimo significativo na sobrevivência celular em todas as linhas celulares para as doses superiores a 2 Gy

(A549, H1299 e Farage) ou a 5 Gy (H69). A dose letal média (DL_{50}) é o parâmetro que define a dose para a qual 50% da população celular perde viabilidade e/ou capacidade proliferativa e permite comparar as linhas celulares no que respeita à radiosensibilidade. A linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69 foi a mais resistente ($DL_{50} = 4,46 \pm 0,32$ Gy), seguida das linhas de cancro de pulmão de não pequenas células A549 ($DL_{50} = 2,77 \pm 0,13$ Gy) e H1299 ($DL_{50} = 1,95 \pm 0,13$ Gy), e da linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage a qual mostrou ser a mais radiosensível ($DL_{50} = 1,73 \pm 0,27$ Gy) e com o maior α , igual a $0,412 \pm 0,118$ (Tabela 7). Além das diferenças na radiosensibilidade, a resposta à radiação pelas quatro linhas celulares estudadas correspondeu a modelos de agressão celular distintos. As linhas celulares H69 e A549 apresentaram uma resposta correspondente ao modelo de *um só alvo um só toque*, ou seja, a uma correlação linear, em que β é igual a zero. Por outro lado, as linhas celulares H1299 e Farage, as mais radiosensíveis, apresentaram uma resposta correspondente ao modelo linear quadrático, que se traduz por um β diferente de zero. No que diz respeito às linhas celulares de cancro de pulmão de não pequenas células A549 e H1299, apesar de pertencerem ao mesmo tipo de tumores, apresentaram respostas distintas à radiação ionizante. Estas diferenças enfatizam a importância da componente molecular e fenotípica na resposta à radioterapia.

O modelo linear quadrático é amplamente utilizado para descrever matematicamente os efeitos da radiação ionizante sobre o tecido normal e neoplásico. Este modelo foi inicialmente concebido para descrever as observações experimentais dos efeitos da dose e a influência do seu fracionamento na sobrevivência celular, nas lesões cromossómicas e nos efeitos agudos da radiação. Mais tarde, alguns autores adicionaram a este modelo os mecanismos biológicos, como a indução de quebras nas duas cadeias da dupla hélice do DNA ou quebras numa única cadeia da dupla hélice do DNA (Kirkpatrick *et al*, 2008, 2009).

Embora tenham sido propostas várias modificações ao modelo linear quadrático por forma a refletir a cinética quer da reparação celular quer do repovoamento celular, assim como o efeito de volume e o impacto da quimioterapia concomitante, estes modelos assumem que o principal mecanismo é a lesão do DNA, a sua reparação e o aparecimento de clones (Kirkpatrick *et al*, 2008, 2009).

No tratamento do cancro almeja-se que a dose mínima depositada no volume alvo consiga exceder a dose limite, no entanto devido ao fracionamento da dose este limite pode nunca ser atingido, o que determina a limitação da lesão provocada nas células tumorais. Por outro lado, a limitação da dose no tecido normal circundante é conseguida através de diferentes abordagens como o planeamento conformacional de feixe múltiplo ou fracionamento que apesar de qualitativamente semelhantes apresentam diferenças quantitativas significativas em relação às sugeridas pelo modelo linear quadrático (Kirkpatrick *et al*, 2008).

Alguns estudos sugerem que a administração de uma única e elevada dose de radiação *in vivo* tem um efeito superior ao que seria previsto a partir do modelo linear quadrático, utilizando os coeficientes calculados *in vitro* a partir da dose e do número de frações convencionais. Por exemplo, as doses de radiação necessárias para controlar lesões cerebrais metastáticas foram calculadas a partir de dados de curvas de sobrevivência obtidas *in vitro*. Nesta situação a dose necessária para obter uma probabilidade elevada de controlo do tumor foi pelo menos de 25 a 35 Gy, o que é superior à usada em radiocirurgia clínica, que é entre os 15 e os 20 Gy (Kirkpatrick *et al*, 2008, 2009). Da mesma forma, outro estudo avaliou o efeito da radiocirurgia em metástases cerebrais e verificou que o seu efeito terapêutico era maior do que o previsto a partir do modelo linear quadrático, que tem por base o cálculo efetuado com baixas doses e com estas depositadas em frações (Kocher *et al*, 2000; Kirkpatrick *et al*, 2008). À medida que aumenta a utilização da radiocirurgia estereotáxica ablativa, os dados experimentais pré-clínicos sobre o seu efeito nos tumores e nos tecidos normais, podem contribuir para desenvolver modelos que reflitam os verdadeiros mecanismos subjacentes e contribuam para um melhor controlo do tumor (Kirkpatrick *et al*, 2008).

A disparidade entre o observado clinicamente e as previsões com base em modelos *in vitro*, tem origem nos estudos de curvas de sobrevivência e pode estar, em parte, relacionada com as alterações induzidas pela radiação, noutras estruturas celulares como a microvascularização e o estroma. De facto, julga-se que a lesão dos tecidos de suporte seja uma resposta típica das altas doses por fração (Kirkpatrick *et al*, 2008). Estes dados sugerem que o tipo de tumor e a resposta do tecido normal às elevadas doses de radiação ionizante por fração deve refletir dois mecanismos

distintos, nomeadamente, a lesão citotóxica direta relacionada com lesão no DNA que ocorre para todas as doses e a lesão induzida no estroma e na vasculatura, que é preferencialmente verificada com as doses mais elevadas (Kirkpatrick *et al*, 2008).

A persistência de células sobreviventes altera a curva de sobrevivência obtida *in vitro* após exposição a doses elevadas, o que confere às curvas especial relevância (Kirkpatrick *et al*, 2008). Este comportamento, em linhas celulares resistentes a doses elevadas, foi referido como cauda da dose elevada (Kirkpatrick *et al*, 2008). No presente trabalho verificou-se, tanto para a linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299 como para a linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage (Figura 15) a formação de colónias com doses iguais e superiores a 12 Gy.

Existe hoje a evidência crescente da existência de uma subpopulação minoritária de células tumorais, com capacidade de autorrenovação, responsável pela contínua propagação do tumor. Estas células têm sido identificadas como células estaminais do cancro (Clarke & Fuller, 2006; Dalerba *et al*, 2007), que se dividem de forma assimétrica dando origem a uma célula igual à primeira e a outra com vista à diferenciação. As primeiras correspondem aos verdadeiros “clones” descritos pela radiobiologia clássica e são responsáveis pelas recidivas, pelo que para o controlo efetivo do tumor será necessária a sua erradicação (Kirkpatrick *et al*, 2008).

Vários estudos postulam que as células estaminais do cancro são mais radorresistentes do que as outras células que compreendem a massa de tumoral. É sabido que as células estaminais do cancro desempenham um papel importante não só no crescimento como na resistência dos gliomas malignos (Kirkpatrick *et al*, 2008; Vandersickel *et al*, 2010). Podemos pois considerar que estas células são as células iniciadoras responsáveis pelo desenvolvimento, pela manutenção e pela progressão tumoral e que a sua resposta à radiação e a outras terapias citotóxicas define a resposta global do tumor (Kirkpatrick *et al*, 2008; Vandersickel *et al*, 2010). De um modo análogo, a presença de uma pequena fração de células hipóxicas no meio da massa tumoral tem um importante impacto na resposta à radioterapia (Uchida *et al*, 2000; Singh *et al*, 2003; Galli *et al*, 2004; Kirkpatrick *et al*, 2008).

Apesar do modelo linear quadrático refletir o modelo *vários alvos vários toques*,

o conhecimento de fatores como a radiosensibilidade do estroma e da vasculatura, a que correspondem diferentes doses limite de indução de lesão, e a maior ou menor população de células estaminais do cancro, contribuirá para um melhor ajuste do tratamento recorrendo à radioterapia (Kirkpatrick *et al*, 2009). Adicionalmente, se o modelo incorporar os mecanismos que ocorrem a nível molecular e tecidual, a determinação da fração de sobrevivência com posterior origem de clones, leva a propor abordagens terapêuticas diferenciadas que complementarão a radioterapia. Exemplo desta abordagem é a utilização de anti-angiogénicos para indução de lesão na vascularização e no estroma do tumor que contribui, efetivamente, para o aumento da morte celular. Esta associação resulta no melhor controlo do tumor em comparação ao efeito isolado da radioterapia (Kirkpatrick *et al*, 2008). Este efeito pode ser ainda mais benéfico na área peritumoral, a qual é exposta a uma dose intermédia de radiação, pois limita o aporte de nutrientes à subpopulação de células estaminais do cancro (Kirkpatrick *et al*, 2008).

As lesões provocadas pela radiação ionizante têm sido estudadas há várias décadas, em particular as induzidas no DNA, as quais podem atingir apenas uma das cadeias (*single strand breaks*) ou ambas as cadeias (*double strand breaks*) da dupla hélice (Hall, 1985; Suntharalingam *et al*, 2007).

As curvas de sobrevivência obtidas após a exposição à radiação ionizante obtidas *in vitro* não preveem o comportamento dos tecidos como um todo, como ocorre na radioterapia clínica. Contudo, a relação α/β , obtida através dessas curvas, demonstrou ser útil para a compreensão das respostas aos diferentes regimes de fracionamento *in vivo* (Jones *et al*, 1995; Robertson *et al*, 1998; Garcia *et al*, 2007). Aquela relação representa a dose para a qual as componentes linear e quadrática (do modelo linear quadrático) contribuem igualmente para a morte celular e relaciona-se com as respostas imediata e tardia à radiação (Garcia *et al*, 2007). O α e o β apresentam incertezas quando a dose única é baixa. Em particular, o parâmetro β pois, por norma, é pequeno e pouco contribui para melhorar o ajuste nesse intervalo de baixas doses, entre os 0 Gy e os 2 Gy. Se o componente linear ocorre com as doses baixas, os ajustes esperados para esta região, denominada por alguns autores como região de baixa dose (<2 Gy) têm uma componente α forte (Garcia *et al*, 2007).

Apesar destas limitações, as curvas de sobrevivência obtidas a partir de estudos *in vitro* podem ser utilizadas para orientar a resposta clínica numa base relativa. As células individuais que crescem em frasco de cultura não se comportam como quando se encontram organizadas em tecido. Fatores como a taxa de crescimento, o ciclo celular, a vascularização e a consequente oxigenação, a temperatura e o microambiente, determinam diferente resposta quantitativa. Estas particularidades fazem com que sejam sugeridos estudos *in vivo* para avaliação do isoefeito de modo a estimar a razão α/β e a calcular a dependência da dose (Garcia *et al*, 2007).

Processos bioquímicos, como a síntese de proteínas ou a respiração celular, podem ser inibidos com doses mais elevadas de radiação, geralmente, após exposição a doses entre os 10 Gy e os 100 Gy (Hall, 1985; Suntharalingam *et al*, 2007). Por este motivo optou-se por estudar um intervalo abrangente que incluiu as doses de 0,5 Gy, de 15 Gy, de 30 Gy e de 60 Gy, depositadas em dose única.

No nosso estudo, a irradiação induziu uma inibição significativa da proliferação celular em todas as linhas celulares. A proliferação celular foi avaliada indiretamente através de dois ensaios, o do alamar *blue*[®] e o do azul de tripano, em que o primeiro avalia a metabolização celular através da atividade mitocondrial (Al-Nasiry *et al*, 2007) e o segundo avalia a integridade membranar. Assim, no ensaio do alamar *blue*[®] pode ocorrer a contribuição de células que, apesar de em morte por apoptose inicial, mantêm alguma atividade mitocondrial. No ensaio do azul de tripano pode ocorrer a contribuição ou da eventual lipoperoxidação, que resulta em *gaps* na membrana plasmática ou das células em apoptose inicial que mantêm a integridade membranar. Apesar destas possíveis contribuições, o efeito antiproliferativo da radiação ionizante variou com a dose, com o tempo e com o tipo celular e, neste caso, foi maior na linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69 e na linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage (Figura 19 e Figura 20). A radiação ionizante pode também induzir senescência nas células tumorais irradiadas, um estado em que estas permanecem metabolicamente ativas, no entanto, sem capacidade de proliferar e de formar colónias. Outra possibilidade é a morte por outras vias como é o caso da catástrofe mitótica que, tipicamente, ocorre dias ou semanas após a irradiação (Joiner & Kogel, 2009).

Os resultados do nosso estudo confirmam que a radiação ionizante tem um

impacto na proliferação e na viabilidade celulares, que é dependente da dose, do tempo e do tipo de célula. A diferente sensibilidade à radiação ionizante pode resultar do facto das linhas celulares serem obtidas de tumores com características moleculares e fenotípicas distintas, em particular quando consideramos o depósito de elevadas doses de radiação em regime de dose única.

Os resultados por nós obtidos para a análise da viabilidade celular, através da dupla marcação com anexina V e com iodeto de propídeo mostraram que as linhas celulares H69, A549 e Farage (Figura 21, Figura 22 e Figura 24) tiveram a população de células viáveis diminuída com conseqüente aumento das populações em morte celular. Esta morte ocorreu por apoptose ou por apoptose tardia/necrose, de forma proporcional ao aumento da dose de radiação. De modo análogo, na linha celular H1299, foi possível verificar que o aumento da dose de radiação provocou uma diminuição da população de células viáveis com conseqüente aumento de morte celular, preferencialmente por necrose, tal como observado na Figura 23.

Tal como referido anteriormente, a radiação ionizante pode provocar lesões nas células devido aos efeitos diretos, indiretos e *bystander*. As lesões celulares podem culminar na morte celular por apoptose, por necrose, por catástrofe mitótica ou, ainda, devido a processos como a autofagia. Porém parece actualmente ser consensual que o processo de morte das células irradiadas envolve dois principais mecanismos: a morte celular por catástrofe mitótica e a morte celular por apoptose (Fengling *et al*, 2009).

No contexto dos efeitos da radiação, a catástrofe mitótica por induzir ou apoptose ou necrose, tipos de morte que observámos no nosso estudo. A necrose é um tipo de morte celular não programada e que poderá iniciar um processo inflamatório local. Na prática clínica, este processo inflamatório poderá desencadear uma resposta imune antitumoral ou, em alternativa, um processo de inflamação seguido de libertação de fatores de crescimento que, por sua vez, promovem a progressão tumoral. Deste modo, o conhecimento dos processos de morte desencadeados após irradiação é de extrema importância para a determinação do resultado terapêutico (Verheij, 2008).

No nosso estudo verificou-se que, apesar das células A549 e H1299 serem de cancro do pulmão de não pequenas células, quando submetidas à mesma dose de

radiação a morte ocorreu preferencialmente por apoptose ou por necrose, respetivamente. Este facto realça a importância que os perfis moleculares poderão ter na resposta celular à radioterapia, que se traduz na adequação dos modelos de agressão celular e na eficácia na eliminação das células tumorais.

De facto, verificou-se que, nas linhas celulares H69, A549 e Farage, a radiação ionizante provocou, maioritariamente, morte por apoptose. Este tipo de morte foi confirmado pelas características morfológicas das células, nomeadamente pela formação de *blebs*, desintegração do núcleo em fragmentos envoltos pela membrana nuclear, condensação da cromatina nuclear e formação de corpos apoptóticos, com manutenção da integridade da membrana celular (Figura 25, Figura 26, Figura 27 e Figura 28). Por outro lado, a linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299 apresentou uma resposta distinta à radiação ionizante, apresentando poucas células em apoptose para as doses mais baixas de 0,5 e de 15 Gy e, para as doses de 30 e de 60 Gy, apresentou um grande número de células em necrose, caracterizadas principalmente pela perda da integridade membranar (Figura 27).

A morte celular por apoptose pode ocorrer através da ativação de duas vias distintas, a via extrínseca e a via intrínseca sendo esta a mais comum após exposição a radiação ionizante. Por este motivo, a última via de morte foi objeto de maior avaliação. Assim, avaliaram-se os efeitos das diferentes doses de radiação ionizante nas linhas celulares na via intrínseca da apoptose através da expressão das proteínas pró e anti-apoptóticas BAX e BCL-2 e das alterações no potencial de membrana mitocondrial.

Mais do que quantificar cada uma das proteínas pró e anti-apoptóticas BAX e BCL-2, razão BAX/BCL-2 é um indicador da ativação da via intrínseca da apoptose. Tal como referido anteriormente, a BCL-2 pertence a uma família de proteínas anti-apoptóticas responsável pela regulação da cascata de ativação da via intrínseca da apoptose, enquanto a BAX pertence a uma família de proteínas pró-apoptóticas. De facto, a interação entre estas duas famílias é fundamental para que ocorra apoptose e está intimamente relacionada com o gene supressor tumoral *TP53*. A deleção do gene da proteína P53 *wild-type*, total ou parcial, pode resultar na alteração dos níveis de BAX/BCL-2 e, por ventura, levar a uma supressão da apoptose (Shabnam *et al*, 2004).

Níveis elevados de BCL-2 demonstraram inibir a eliminação das células tumorais, em estádios precoces, pelo sistema imune. Além disso, pode desempenhar um papel protetor de células tumorais com capacidade clonogénica, e contribuir para o desenvolvimento de resistência ao tratamento (Friedman, 2002; Chaudhuri *et al*, 2009; Multhoff & Radons, 2012; Zheng *et al*, 2015).

Os nossos resultados revelaram que as linhas celulares em estudo apresentam diferentes expressões de BAX e de BCL-2. Assim, as linhas celulares H69 e H1299 têm níveis basais de BAX inferiores aos observados nas linhas A549 e Farage (Figura 29).

No caso particular da linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299, a razão BAX/BCL-2 diminui nas células submetidas a altas doses de radiação (Figura 32), situação onde se observou morte preferencialmente por necrose, como mostram os resultados de citomorfologia (Figura 27) e de citometria (Figura 23).

Nos resultados por nós obtidos após exposição das células a radiação ionizante, podemos verificar que, na generalidade, com o aumento da dose se verifica um aumento da razão BAX/BCL-2, o que pode contribuir para a maior suscetibilidade das células à morte, predominantemente por ativação da via intrínseca.

A despolarização da membrana mitocondrial é um dos eventos iniciais da via intrínseca da apoptose. Esta despolarização pode despoletar a libertação do citocromo c para o citosol que, por sua vez, desencadeia uma cascata de sinalização que provoca a morte celular por apoptose. Os nossos resultados demonstraram que, de forma geral, com o aumento da dose existe um aumento da razão monómeros/agregados, característico de despolarização da membrana mitocondrial, indicando que a morte celular está relacionada com a via intrínseca da apoptose.

Para além disso, a radiólise da água induz a produção de espécies reativas de oxigénio. Após exposição à radiação verificou-se que as linhas celulares em estudo apresentaram níveis aumentados de peróxidos e de radical superóxido. Estas espécies reativas de oxigénio, em altas concentrações, são extremamente nocivas para as células e caso sejam produzidas a nível mitocondrial, pode ocorrer perda de funcionalidade com conseqüente indução da apoptose. A radiação ionizante produz lesão biológica de forma direta, contribuindo com cerca de 30 a 40% das lesões

celulares e de forma indireta, devido à radiólise da água que determina cerca de 60 a 70% das lesões (Barreiros *et al*, 2006).

As espécies reativas de oxigénio atuam como um importante mensageiro intracelular e extracelular que, para além de provocarem lesões no DNA, induzem a peroxidação lipídica da membrana celular (Fengling *et al*, 2009). Vários estímulos apoptóticos compartilham a mesma via mecanística caracterizada pela produção de ROS (Fengling *et al*, 2009). Estudos recentes sugerem que as espécies reativas de oxigénio desempenham um papel importante na indução de apoptose. Muitos estímulos, tais como o TNF- α e alguns fármacos anticancerígenos e agentes quimiopreventivos poderão estimular as células tumorais para a produção de ROS e posterior ativação do mecanismo de morte celular. Associadamente as espécies reativas de oxigénio podem ativar diretamente a permeabilidade mitocondrial com consequente perda do potencial de membrana (Fengling *et al*, 2009).

Vários estudos associaram a formação de espécies reativas de oxigénio com a radorresistência, parâmetros que, combinados com o metabolismo mitocondrial, se encontram frequentemente alterados em células tumorais. Este facto leva a que as células tumorais desenvolvam mecanismos homeostáticos de forma a sobreviverem ao stresse oxidativo induzido pela radiação ionizante (Zheng *et al*, 2015). Estudos recentes têm apontado para que a interação entre a glutathione e a tioredoxina possa facilitar a sobrevivência celular em resposta ao stresse oxidativo através do aumento da expressão do fator nuclear eritroide 2 - fator relacionado 2 (NRF2, do inglês *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*), um fator de transcrição sensível ao ambiente redox, que está implicado na resistência ao stresse oxidativo (Patwardhan *et al*, 2015).

No nosso estudo verificou-se, na generalidade, um aumento do stresse oxidativo com o aumento da dose de radiação. No caso da linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69, verificou-se um aumento dos níveis de peróxidos (Figura 39) 48 h após a irradiação celular. Verificou-se igualmente que não existiram diferenças nos níveis da defesa antioxidante, glutathione reduzida (Figura 41). No que diz respeito à linha celular de cancro de pulmão de não pequenas células A549, verificou-se que ambas as espécies reativas de oxigénio aumentaram os seus níveis após exposição à radiação ionizante, sem alterações a nível da defesa

antioxidante. Esta mesma observação pode ser feita para a linha celular H1299, que apresentou níveis elevados de peróxidos (Figura 45) e de anião superóxido (Figura 46) após a irradiação, sem alterações a nível da defesa antioxidante (Figura 47). Apesar das células A549 e H1299 apresentarem perfis de stresse oxidativo dependentes da dose, a sua extensão é superior na linha H1299.

No que respeita à linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage, verificou-se também um aumento significativo de ambas as ROS consideradas, apesar do aumento ser menor com a dose mais elevada de 60 Gy. O nível de ROS nesta linha celular após irradiação com 60 Gy (Figura 48 e Figura 49) foi acompanhado por um aumento significativo de glutathione reduzida (Figura 50), que é essencial para diminuir os efeitos das lesões provocados pela radiação ionizante. Verificou-se que os níveis de stresse oxidativo estão diretamente relacionados com a radiosensibilidade das linhas celulares. Neste contexto, as linhas celulares Farage e H1299, caracterizadas como as mais radiosensíveis, foram as que apresentaram um maior desequilíbrio no ambiente oxidativo celular, enquanto as linhas celulares H69 e A549, mais radorresistentes, apresentaram menores níveis de stresse oxidativo.

O ciclo celular é composto por dois processos consecutivos, a replicação do DNA e a consequente segregação dos cromossomas em duas células filhas idênticas e individualizadas. Este é um processo complexo, dividido em duas fases, a interfase (constituída pelas subfases G_1 , S e G_2) e a mitose. Todas as fases e subfases do ciclo celular são altamente complexas e reguladas, com vários pontos de controlo estrategicamente colocados, como o ponto de controlo G_0/G_1 , o ponto de controlo na fase S e o ponto de controlo G_2/M . A existência destes pontos de controlo garante a sobrevivência e a reprodução de cópias fiéis do genoma para as gerações seguintes e assegura que o ciclo celular, mesmo após agressões no DNA, progrida apenas caso essas lesões tenham sido reparadas (Deckbar *et al*, 2011).

Os resultados por nós obtidos mostram que a irradiação induziu um bloqueio do ciclo celular em diferentes pontos de controlo, G_0/G_1 , S e G_2/M nas diferentes linhas celulares (Figura 51, Figura 52, Figura 53 e Figura 54). Para além disso, verificou-se o surgimento de um pico apoptótico, geralmente designado por pré- G_0 , após exposição à radiação ionizante, o que corrobora a apoptose como principal tipo

de morte celular, nomeadamente para as linhas celulares H69, A549 e Farage (Hansakul *et al*, 2014).

Vários estudos apontam para que células em diferentes fases do ciclo celular apresentem radiosensibilidades distintas e que determinadas populações celulares podem ser parcialmente sincronizadas pela radiação (Shackelford *et al*, 1999; Chapman, 2003; Pawlik & Keyomarsi, 2004; Joiner & Kogel, 2009). Esta circunstância determina que, se uma única dose de radiação for administrada a células em diferentes fases do ciclo, poderá existir um padrão de sobrevivência em função da fase do ciclo celular. Estudos sobre esta problemática indicam que a maior parte das células apresenta maior resistência à radiação na fase S e maior sensibilidade na fase M e na fase G₂ (Stuschke *et al*, 2002; Pawlik & Keyomarsi, 2004; Nome *et al*, 2005; Joiner & Kogel, 2009; Deckbar *et al*, 2011; Balcer-Kubiczek, 2012). Contudo, esta dependência não se verifica para todos os tipos celulares, podendo ser observados diferentes períodos de sensibilidade em todas as fases do ciclo celular (Videtic *et al*, 2003). O padrão de radiosensibilidade durante o ciclo celular poderá mesmo ser diferente para o mesmo tipo de células tumorais considerando as condições *in vivo* e *in vitro*, realçando a importância das interações célula-célula na sobrevivência (Valerie *et al*, 2007). Alguns estudos demonstraram que células que apresentam sobre-expressão de oncogenes, como é o caso do KRAS, apresentam uma resistência aumentada na fase G₂, enquanto células deficientes em mecanismos de reparação de DNA apresentam sensibilidade semelhante ao longo de todo o ciclo celular (Hall, 1985).

Concordante com as diferentes radiosensibilidades durante o ciclo celular, também a sensibilidade à radioterapia varia com as fases do ciclo celular como vários estudos demonstraram (Chapman, 2003; Pawlik & Keyomarsi, 2004). Assim, os parâmetros α e β também variam ao longo do ciclo celular (Chapman, 2003). O mecanismo do modelo *vários alvos vários toques* é máximo na fase G₁ e diminui linearmente cerca de nove vezes com a progressão das células para fase G₂ (Chapman, 2003).

No caso da linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299, verificou-se que, após irradiação, existe uma grande diminuição das células na fase G₀/G₁, com aumento significativo das populações em G₂/M (Figura 53). Esta

ocorrência pode dever-se ao facto de a proteína P53 induzir o bloqueio do ciclo celular na fase G₀/G₁, por forma a permitir a reparação do DNA antes da replicação, de modo a evitar a propagação das lesões. A ativação da proteína P53 está na dependência da proteína P21 (Cip/Waf), uma proteína que funciona como inibidora de ciclinas dependentes de cinase, necessária para uma adequada transição entre a fase G₁ e a fase S (Shackelford et al, 1999; Gudkov & Komarova, 2003; Joiner & Kogel, 2009).

Alguns estudos com linhas celulares de cancro da mama mostraram que o bloqueio do ciclo celular na fase G₂/M compreende a repressão do gene para a cinase polo-like1 (PLK-1). O mecanismo de sinalização da ativação do ponto de controlo G₂, após lesão no DNA, é iniciado pela ATM, uma proteína essencial na ativação dos checkpoints na iniciação da reparação das quebras nas duas cadeias da duple hélice do DNA, e envolve a inibição da atividade enzimática da PLK1 e subsequente inibição da ativação da cinase de transição G₂/M, CDK1 (Dipaola, 2002; Flatmark et al, 2006). O bloqueio do ciclo celular em G₂/M, descrito anteriormente, pode estar também relacionado com o aumento do stresse oxidativo, uma vez que níveis elevados de stresse oxidativo foram associados ao bloqueio do ciclo em G₂/M superior ao verificado em G₀/G₁ e S (Yamamori et al, 2012).

A exposição de qualquer célula à radiação ionizante pode desencadear lesões nos organelos, nas membranas celulares ou em biomoléculas devido à ação direta ou indireta pelos radicais livres (Zhao et al, 2012b). O DNA, como se sabe, é uma dessas biomoléculas pelo que, no nosso estudo, foi avaliada a extensão das suas lesões, através do ensaio cometa. Este ensaio, que combina a eletroforese em microgel de agarose em condições alcalinas e a microscopia de fluorescência, permite avaliar a extensão das lesões causadas no DNA. A formação de quebras nas duas cadeias da duple hélice do DNA permite a migração aumentada dos fragmentos, que surgem como a cauda de um cometa. Quanto mais longa e densa for a cauda, maior é a lesão no DNA. O momento da cauda é o parâmetro que relaciona o comprimento da cauda com a percentagem de DNA presente na mesma (Olive et al, 1990; Olive & Banáth, 2006).

Os nossos resultados demonstraram que, na generalidade, em todas as linhas celulares, se verificou um aumento da extensão das lesões no DNA com o aumento

da dose de radiação ionizante (Figura 56, Figura 58, Figura 60 e Figura 62). Contudo, destacou-se a linha celular H1299 de cancro do pulmão de não pequenas células (Tabela 15), em que para a dose mais elevada (60 Gy) se observaram lesões no DNA significativamente superiores às observadas nas restantes linhas celulares.

A proteína P53 desempenha um papel fundamental na regulação de diversos mecanismos essenciais à divisão celular, ao ciclo celular e à ativação de vias de morte, tendo mesmo alguns autores postulado que tem a capacidade de induzir stresse oxidativo (Achanta *et al*, 2004). Para além disso, as mutações nesta proteína estão associadas a mais de metade dos tumores diagnosticados, o que demonstra a sua importância no desenvolvimento de neoplasias (Richardson, 2013; Yang *et al*, 2014). No cancro do pulmão de pequenas células estas mutações podem existir em cerca de 70 a 100% dos casos (Gadepalli *et al*, 2014; Gibbons *et al*, 2014). Assim, é fundamental o conhecimento da expressão desta proteína chave, pois não é só importante no desenvolvimento do tumor mas também contribui para a eficácia das diferentes terapêuticas a nível do controlo local do tumor e na sobrevivência global (Kruiswijk *et al*, 2015).

As linhas celulares estudadas possuem perfis de expressão da proteína P53 distintos. A linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células, A549 e a linha celular de linfoma difuso de grandes células B expressam a forma nativa da proteína P53 (P53^{Wild}), enquanto a linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299 não expressa a proteína (P53^{Null}) e a linha celular de cancro do pulmão de pequenas células, H69 expressa a P53 mutada (P53^{Mut}) (Meek, 2015), o que foi confirmado pelos estudos efetuados por *western blot* (Figura 63).

A linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69 apresenta expressão de uma forma mutada da proteína (P53^{Mut}) que está associada a inativação ou a perda de funcionalidade, por ausência de expressão ou pela expressão de uma proteína mais pequena não funcional. Esta variante da proteína P53 pode acumular-se tanto no citoplasma como no núcleo, mas não executa as suas funções ou, em alternativa, executa-as indevidamente, o que pode até conferir vantagem clonal a algumas células tumorais (Brambilla *et al*, 1996). Assim, pode colocar-se a hipótese deste facto estar relacionado com o nível de lesões observadas no DNA e na génese da radiorresistência desta linha celular.

Uma vez que as linhas celulares A549 e Farage são P53^{Wild} é previsível a ativação das vias de reparação. Quando as células A549 (Figura 65) e Farage (Figura 67), que expressam a proteína P53^{Wild}, foram expostas à radiação ionizante verificou-se um aumento da expressão da proteína com o aumento da dose de radiação. Para além disso, este aumento verifica-se também na expressão da proteína P53 fosforilada, sendo a fosforilação o mecanismo ativador desta proteína. Como já foi descrito anteriormente, a proteína P53 forma um complexo com a ubiquitina ligase MDM2 E3, ocorrendo a repressão dos níveis de P53 devido à sua contínua ubiquitinação seguida de degradação (Budanov, 2014; Pflaum *et al*, 2014; Kruiswijk *et al*, 2015). Assim, após sinais de crescimento aberrantes, de stresse celular e de lesões no DNA, ocorre a fosforilação da proteína P53 o que, por sua vez, inibe a interação MDM2-P53.

A proteína P53 além da sua função de regulação da apoptose é um importante regulador do ciclo celular. Como referido, a proteína P53 desempenha um papel fundamental no bloqueio do ciclo celular em G₁, sendo fulcral para a inibição da ciclina B/CDK1 (Taylor & Stark, 2001; Bartek *et al*, 2004; Krämer *et al*, 2004; Lukas *et al*, 2004).

Também a P53 desempenha papel determinante na regulação da via intrínseca da apoptose, devido ao seu papel de reguladora da expressão das proteínas da família BCL-2, inibindo a expressão de BCL-2 e potenciando a de BAX (Belka *et al*, 2001). Assim, uma vez que as células H1299 não expressam a proteína P53, a irradiação das mesmas pode provocar genotoxicidade mais acentuada, o que despoletou a morte celular por necrose. A ausência de P53 nesta linha celular pode limitar não só a ativação da apoptose como a correta reparação do DNA e a regulação do ciclo celular no que diz respeito ao ponto de controlo G₀/G₁. Para além disso, é possível que existam lesões no DNA capazes de persistir e de escapar à reparação em todos os pontos de controlo do ciclo, incluindo no ponto de controlo G₂/M, independente da proteína P53 (Mcilwrath *et al*, 1994; Smith *et al*, 1999; Stuschke *et al*, 2002; Pawlik & Keyomarsi, 2004; Bieging *et al*, 2014). Este processo leva a uma acumulação de erros que podem promover a catástrofe mitótica. Este mecanismo está descrito como um dos principais tipos de morte celular consequente da exposição à radiação ionizante (Castedo & Kroemer, 2004; Joiner & Kogel, 2009).

Nos nossos resultados observou-se que o tipo de morte preferencial depende não só da dose administrada, como também do stresse oxidativo, da expressão de P53 e do tipo de células.

O estudo dos perfis de expressão da proteína P53 nas diferentes linhas celulares permitiu-nos alicerçar a sua importância no que diz respeito à resposta celular desencadeada após a exposição a radiação ionizante. Assim, nas linhas celulares A549 e Farage, linhas que expressam a P53^{Wild}, as lesões no DNA induzidos pela radiação ionizante terão levado à ativação da P53. Esta, por sua vez, levou à ativação de diversos mecanismos de resposta, nomeadamente a ativação da via intrínseca da apoptose, verificada pela despolarização do potencial de membrana mitocondrial e pelo aumento da razão de BAX/BCL-2. No caso da linha celular A549 observou-se um bloqueio do ciclo celular nas fases S e G₂/M (Figura 52), um aumento do stresse oxidativo (Figura 42 e Figura 43) e o principal tipo de morte celular foi a apoptose inicial (Figura 22), possivelmente devido a ativação da via intrínseca da apoptose, pois com o aumento da dose observou-se igualmente uma maior despolarização do potencial de membrana mitocondrial (Figura 35).

Por outro lado, nas linhas celulares H69 (P53^{Mut}) e H1299 (P53^{Null}), possivelmente assistiu-se a morte celular por vias P53-independentes, tais como a catástrofe mitótica e a necrose, bem como o bloqueio do ciclo celular em fases mais adiantadas. No caso das H1299 estes resultados podem estar relacionados com o facto de as células não expressarem P53 (Figura 63). Na ausência da proteína P53 a via intrínseca da apoptose pode estar comprometida (Montero *et al*, 2013) e determinar que a morte celular ocorra preferencialmente por uma via não apoptótica. O papel da proteína P53 na regulação destas famílias de proteínas é ainda mais importante no que diz respeito à proteína anti-apoptótica BCL-2 (Han *et al*, 1999; Groeger *et al*, 2004; Mendes *et al*, 2015c). Sabe-se que esta proteína, em estádios iniciais de neoplasias, poderá desempenhar um papel fundamental como indutor de sobrevivência das células tumorais (Diller *et al*, 1990; Gudkov & Komarova, 2003; Davey *et al*, 2004). No entanto, o bloqueio do ciclo celular no ponto G₂/M foi mais frequente com as doses mais elevadas de radiação particularmente nas células com o fenótipo P53^{null}.

Os resultados por nós obtidos vêm, uma vez mais, alertar para a importância de

um conhecimento profundo das características moleculares e fenotípicas das células tumorais. Este conhecimento poderá permitir não só compreender melhor a resposta das células tumorais às lesões induzidas pela radiação ionizante, bem como ser fundamental para uma melhor adequação dos regimes de tratamento (escolha das doses, tipo de fracionamento das doses, duração do tratamento, entre outros parâmetros) aos perfis moleculares dos tumores diagnosticados aos doentes.

Este trabalho experimental permitiu-nos verificar e comprovar que os diversos mecanismos de resposta à radiação ionizante estão intimamente relacionados com os perfis moleculares específicos de cada linha celular. Foi possível comprovar que diferentes tipos de tumores, tais como o cancro do pulmão de não pequenas células e o linfoma difuso de grandes células B, exemplos de tumores sólidos e hematopoéticos, respetivamente, poderão apresentar perfis de resposta à radiação ionizante semelhante, mediante as similitudes verificadas a nível da expressão da proteína P53, proteína fundamental no desenvolvimento e na resposta terapêutica tumoral. No sentido inverso, verificámos que dentro do mesmo tipo de tumor, no caso específico das linhas celulares de cancro do pulmão de não pequenas células A549 e H1299, a resposta à radioterapia poderá ser bastante distinta, considerando a diferença nos perfis de expressão da proteína P53. Estes resultados vêm realçar uma vez mais a importância de aprofundar a classificação dos tumores a nível molecular, para que no futuro se possa atingir taxas de sobrevivência global superiores. Este conhecimento poderá ser fundamental para se evitar o desenvolvimento de resistência aos tratamentos utilizados na prática clínica.

A radiação ionizante provoca lesões celulares diretas nos organelos ou nas biomoléculas das células atingidas, bem como lesões indiretas devidas à produção de espécies reativas de oxigénio por stresse oxidativo. A radiólise da água promove a formação de espécies reativas de oxigénio altamente lesivas para diversos organelos e biomoléculas, pelo que é uma das principais responsáveis pela eficácia da radioterapia. Os nossos resultados demonstraram que o desequilíbrio criado pelo stresse oxidativo no ambiente redox celular é um dos principais desencadeadores da inibição da proliferação e da viabilidade celular, podendo contribuir também para um incremento nas lesões no DNA induzidas pela radiação ionizante. Verificámos igualmente que o desequilíbrio observado no ambiente redox nas

diferentes linhas celulares foi distinto demonstrando, uma vez mais, que os mecanismos celulares e moleculares despoletados pela radiação ionizante são determinantes na resposta e na sensibilidade à terapêutica.

CONCLUSÕES

Neste trabalho experimental, foram avaliados as alterações celulares e moleculares induzidas pela radiação ionizante em linhas celulares de cancro do pulmão de pequenas células (H69), de cancro do pulmão de não pequenas células (A549 e H1299) e de linfoma difuso de grandes células B (Farage). As células foram expostas a diferentes doses de radiação de 0,5 Gy a 60 Gy, de forma a avaliar os seus efeitos a nível da proliferação e da viabilidade celular, na sobrevivência celular, nos tipos de morte e nas alterações no ciclo celular. Para além disso, foi também alvo de estudo o papel desempenhado pela proteína P53 na resposta celular à radiação. Deste modo, os resultados deste trabalho experimental permitiram a obtenção de diversas conclusões, que se expõem de seguida.

Foi possível garantir um sistema que permitiu a entrega de uma dose correta e uniforme a todas as células submetidas a radiação ionizante, de forma a garantir a homogeneidade da amostra.

A radiação ionizante induziu diminuição da proliferação celular e da viabilidade de forma dependente da dose e do tempo em todas as linhas celulares estudadas.

A radiação ionizante induziu uma resposta que se ajustou aos modelos de agressão celular, o modelo linear quadrático ou o modelo linear, mediante as características moleculares da cada linha celular.

As linhas celulares escolhidas apresentavam perfis de expressão da proteína P53 distintos. Os níveis de expressão desta proteína aumentaram de forma dependente da dose tanto no que respeita à proteína total como à forma fosforilada. No entanto, nos casos das linhas celulares H69 e H1299, em que não se detetou a expressão de P53, após irradiação não se verificaram alterações.

O tipo de morte celular preferencial após exposição à radiação ionizante demonstrou ser dependente da dose e, presumivelmente, do perfil de expressão de P53. Assim, a expressão P53^{Wild} (A549 e Farage) foi associada a morte celular por apoptose, enquanto a ausência de expressão ou a expressão de uma proteína mutada foi associada a morte celular por necrose.

A despolarização do potencial de membrana mitocondrial e o aumento da razão BAX/BCL-2 indicam que a morte celular por apoptose, típica das células P53^{Wild}, deverá ser ativada pela via intrínseca.

A exposição das células às diferentes doses de radiação induziu alterações no ciclo celular de forma dependente da dose e, possivelmente, dos perfis de expressão da proteína P53. Verificou-se bloqueio do ciclo celular em G₀/G₁ e S nas linhas celulares P53^{Wild}, enquanto a ausência desta proteína se associou a bloqueio do ciclo celular em G₂/M.

De forma geral, os resultados obtidos neste trabalho experimental permitem concluir que os perfis moleculares e celulares são determinantes para a compreensão da resposta celular à radiação ionizante. Consequentemente, a escolha dos diferentes modelos de agressão celular deve ter em conta as características moleculares do cancro. A integração e a implementação destes conceitos na prática clínica contribuem para aumentar eficácia da radioterapia.

**CAPITULO 6 – ESTUDO EM
PATOLOGIA HUMANA**

MATERIAL E MÉTODOS

Duração do estudo e população em estudo

A seleção dos doentes a incluir neste estudo, decorreu no Serviço de radioterapia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e foi realizada por clínicos. Este trabalho decorreu entre 14 de janeiro de 2013 e 31 de julho de 2014.

Foram incluídos no estudo todos os doentes com o diagnóstico de cancro do pulmão, nos seus diferentes subtipos, e os doentes com linfoma difuso de grandes células B, propostos para tratamento com radioterapia, independentemente do estágio da sua neoplasia. Todos os doentes incluídos foram caracterizados quanto à não existência de outras patologias que pudessem interferir na avaliação, como a presença de doenças autoimunes ou cardíacas.

Os doentes selecionados para o estudo, que corresponderam a oito com cancro do pulmão e nove com linfoma difuso de grandes células B, foram avaliados em três momentos distintos: imediatamente antes do início da radioterapia (T0), a meio do tratamento (T1) e trinta dias após o fim do tratamento (T2), independentemente da duração do mesmo. Por forma a caracterizar e a quantificar as várias subpopulações linfocitárias recorreu-se às suas características imunofenotípicas, através da expressão de antígenos de superfície específicos.

Consentimento informado e aprovação pela Comissão de Ética

Todos os doentes selecionados foram informados da finalidade do estudo e qual a metodologia a usar, e a privacidade e a confidencialidade dos dados dos participantes foram rigorosamente protegidas, ficando a decisão de participação neste estudo a seu critério.

O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e posteriormente submetido à Comissão de

Ética do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra o Conselho de Administração do mesmo deu a sua aprovação para a realização do estudo (Anexos 01 - 04).

Os doentes incluídos neste estudo assinaram um consentimento informado (Anexo 02), esclarecido e livre para participação em estudos de investigação nos termos da norma nº 015/2013 da Direção-Geral da Saúde (de acordo com a declaração de Helsínquia e a Convenção de Oviedo).

Colheita de amostra biológica

Para cada doente foi preenchido um questionário no qual foram recolhidos dados para a caracterização como a idade, o género, a terapia indicada, o estágio da doença, entre outras informações. Para além disso, foram colhidas amostras de sangue periférico, por flebotomia, para 2 tubos com ácido etileno-diaminotetraacético tripotássico (EDTA_{K3}), colheita para o estudo por citometria de fluxo foi efetuada num tubo com *transfix* (Cytomark, Buckingham, Reino Unido) solução estabilizadora da membrana celular que permite processar a amostra até 48 horas. Um dos tubos de EDTA_{K3} destinou-se à realização do hemograma e o segundo reservou-se para o estudo de citometria de fluxo. Foi colhido ainda um tubo sem preparação ou tubo seco.

Os tubos de hemograma e os tubos secos foram centrifugados a 1000xG durante 10 minutos, recolhidos o plasma e o soro os quais foram armazenados a -20°C até ao seu processamento. O soro/plasma foi utilizado para a posterior quantificação de diferentes moléculas do sistema imunitário.

Este procedimento foi realizado nos três momentos de colheita, T0, T1 e T2, anteriormente descritos.

Contagem das células do sistema imunitário com recurso ao leucograma

O estudo laboratorial dos efeitos da radioterapia e o seu reflexo no sistema imune dos doentes diagnosticados com cancro do pulmão ou com linfoma difuso de grandes células B iniciou-se com a realização de uma colheita de amostra biológica,

para a realização de hemograma.

Análise imunofenotípica das células do sistema imunitário com recurso à citometria de fluxo

Os estudos imunofenotípicos foram realizados por citometria de fluxo. Por forma a obter os valores absolutos de cada componente, realizou-se, no laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, para cada momento de avaliação (T0, T1 e T2) um hemograma com leucograma. Os dados obtidos com recurso ao linfograma, que permitiram a caracterização e quantificação das diferentes populações linfocitárias, são expressos em frequência relativa (%) e em valores absolutos (células/ μ L).

Estudo das Células do Sistema Imunológico nos doentes com cancro do pulmão e linfoma difuso de grandes células B

Para identificar e caracterizar as diferentes populações linfocitárias, nomeadamente as células T *cluster of differentiation* (CD) 3^+ e suas diferentes subpopulações, as células T citotóxicas CD 8^+ , as células T *helper* CD 4^+ , as células T duplas negativas (DN) CD 4^- CD 8^- , as células duplas positivas (DP) CD 4^+ CD 8^+ , as células B (CD 19^+), as células *Natural Killer* (NK) CD 3^- CD 56^+ , as células *Natural Killer* citotóxicas CD 3^- CD 56^+ CD 8^+ e as células *natural killer* CD 3^- CD 56^+ CD 8^- recorreu-se ao *kit* comercial Lymphogram[®] (Cytognos, Salamanca, Espanha).

Este Kit é constituído pelos anticorpos monoclonais: anti-CD8 (clone UCH-T4) e anti-CD19 (clone HD37) conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein-isothiocyanate*), anti-CD3 (clone 33-2-A3) e anti-CD56 (clone C5.9) conjugados com ficoeritrina (PE, do inglês *phycoerythrin*), e anti-CD4 (clone 13B8.2) conjugado com ficoeritrina-cianina 5 (PE-Cy5, do inglês *phycoerythrin cyanine 5*).

Para esta análise, procedeu-se à incubação de 100 μ L de sangue total com

TransFix com o *Lymphogram*[®] durante 10 minutos à temperatura ambiente, no escuro. De seguida, foram adicionados 2 mL da solução de lise eritrocitária *lysing solution* (BD Biosciences, San José, Califórnia, EUA), e realizou-se uma nova incubação de 10 minutos, no escuro, à temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 500xG durante 5 minutos. Por fim efetuou-se uma lavagem com 2 mL de *FACSFlow* (BD Biosciences, San José, Califórnia, EUA), seguida de uma nova centrifugação a 500xG durante 5 minutos. Decantou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se a solução em 0,5 mL de *FACSFlow* e adquiriram-se e analisaram-se as células no citómetro de fluxo *FACSCanto II* (BD Biosciences, San José, Califórnia, EUA) utilizando o programa *FACSDiva Software* (BD Biosciences, San José, Califórnia, EUA).

Todo o procedimento foi realizado de acordo no protocolo do fabricante.

Caraterização e quantificação das diferentes populações de células T reguladoras

As células T reguladoras foram inicialmente quantificadas pela co-expressão dos marcadores de superfície CD4 e CD25, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4)*, *glucocorticoid-induced TNFR family related gene (GITR)*, *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4* conhecido como OX40 (CD134), *integrin, alpha E* (CD103), *L-selectin*, *lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3)* e baixa expressão de *interleukin-7 receptor- α* (CD127) (Roitt *et al*, 2011; Oliveira *et al*, 2013). No entanto, a característica que melhor pode definir esta população é a expressão do FoxP3 (Fehérvári & Sakaguchi, 2004; Cheng *et al*, 2008). Este apresenta-se como crucial no desenvolvimento e na atividade das células T reguladoras, cuja tradução regula a expressão de moléculas associadas a estas células, tais como o CD25, o CTLA-4 e o GITR (Fehérvári & Sakaguchi, 2004; Sakaguchi, 2005; Oliveira *et al*, 2013).

Assim, por forma a quantificar as células T reguladoras, procedeu-se à incubação do sangue com anticorpos monoclonais: 20 μ L de anti-CD4 conjugado com FITC (clone RPA-T4, BD Biosciences, San José, Califórnia, EUA), 5 μ L de anti-CD25 conjugado com alofococianina (APC, do inglês *allophycocyanin*)

(clone 2A3, BD Biosciences, San José, Califórnia, EUA), anti-CD31 conjugado com V450 (clone WM59, BD Biosciences, San José, Califórnia, EUA), 5 µL de anti-CD127 conjugado com proteína peridínica clorofila-cianina 5.5 [PerCP-Cy5.5, do inglês, (*pyridin chlorophyll protein*) cyanin 5.5.] (clone HIL-7R-M21, BD Biosciences, San José, Califórnia, EUA).

Após a incubação do sangue com o painel de anticorpos, procedeu-se à fixação e à permeabilização das membranas celulares usando as seguintes soluções, *stain buffer* (BD Biosciences, San José, Califórnia, EUA), o *human FoxP3 buffer set* (BD Biosciences, San José, Califórnia, EUA) durante 10 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Posteriormente o sangue foi centrifugado a 500xG durante 5 minutos com posterior decantação do sobrenadante ao qual se adicionaram 2 mL de *stain buffer* seguidos de nova centrifugação a 500xG durante 5 minutos e nova decantação do sobrenadante. Seguidamente adicionaram-se 10 µL de anti-FoxP3 e incubou-se durante 30 minutos no escuro à temperatura ambiente com posterior adição de 2 mL de *stain buffer* e centrifugação a 500xG durante 5 minutos. Após a decantação, acrescentaram-se 5 µL de CD45RA, incubou-se durante 10 minutos, no escuro, à temperatura ambiente após o que se adicionaram 2 mL de *FACSFlow* e se centrifugou a 500xG durante 5 minutos. Decantou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se a solução em 0,5 mL de *FACSFlow* e separaram-se as células no citómetro de fluxo *FACSCanto II* (BD Biosciences, San José, Califórnia, EUA) usando o *software* de aquisição *FACSDiva Software* (BD Biosciences, San José, Califórnia, EUA).

Quantificação das citocinas e quimiocinas nos doentes com cancro do pulmão e linfoma difuso de grandes células B

Procedeu-se à quantificação dos níveis de expressão de várias citocinas e quimiocinas no plasma dos doentes, nomeadamente o quimiocinas quimiotáticas da subfamília CC de eosinófilos (CCL11 ou eotaxin), GM-CSF, o oncogene-alfa relacionado ao crescimento (CXCL1/GRO- α , do inglês *growth regulated oncogene-alpha*), o interferão (IFN) α , o IFN γ , a interleucina (IL)-1RA, a IL-1 α , a IL-

1 β , a IL-2, a IL-4, a IL-5, a IL-6, a IL-7, a IL-8, a IL-9, a IL-10, a IL-12p70, a IL-13, a IL-15, IL-17A, a quimiocina (motivo CC) ligando 18 (CXCL18/IL-18, do inglês *chemokine (C-C motif) ligand 18*), a IL-21, a IL-22, a IL-23, a IL-27, a IL-31, a proteína induzida por interferão-gama (CXCL10/IP-10, do inglês *gamma-induced protein 10*), a proteína quimiotática de monócitos-1 (CCL2/MCP-1, do inglês *monocyte chemotactic protein*), as proteínas inflamatórias de macrófagos-1 α (CCL3/MIP-1 α , do inglês *macrophage inflammatory proteins-1 α*), a CCL4/MIP-1 β , a quimiocina normalmente expressa e segregada por células T, regulada na ativação (CCL5/RANTES, do inglês *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), o fator 1 α derivado de células estromais (CXCL12/SDF-1 α , do inglês *stromal cell-derived factor-1 α*), TNF- α e TNF- β .

Para tal, recorreu-se ao Kit comercial *ProcartaPlex™ Immunoassay Maxxgnetic Beads* (Affymetrix Company, eBioscience, Viena, Austria). Este ensaio utiliza a tecnologia *xMAP®*, que permite a deteção e a quantificação de múltiplas proteínas através da utilização de microesferas fluorescentes marcadas (*beads*) em citometria de fluxo. Nesta metodologia, as *beads* encontram-se revestidas com anticorpos específicos contra as proteínas alvo. Os testes multiplex permitem detetar vários alvos num único teste e asseguram elevada sensibilidade e especificidade dos resultados. Este teste utiliza um laser duplo e através do processamento de imagem digital permite detetar até 100 moléculas numa única amostra. A leitura foi realizada equipamento *LABScan 100* (Luminex Corporation, Austin, Estados Unidos).

Inicialmente preparou-se o tampão de lavagem pela adição de duas soluções disponibilizadas com o *kit*, o tampão de lavagem concentrado e o tampão universal. Para a preparação do padrão, ao tubo A, fornecido com o *kit*, adicionaram-se 250 μ L do tampão universal e agitou-se vigorosamente e colocou-se no gelo durante 10 minutos. O conteúdo deste tubo foi transferido para o tubo B, agitou-se vigorosamente e manteve-se em gelo durante 10 minutos.

De modo a obter uma curva padrão com oito pontos e em duplicado do padrão previamente preparado, identificaram-se vários microtubos nos quais se preparam diluições sucessivas com recurso ao tampão universal. Os microtubos foram mantidos em gelo.

De seguida, prepararam-se as quatro misturas de anticorpos, fornecidas com

o *kit*, com as microesferas magnéticas e agitaram-se vigorosamente em vortéx durante 30 segundos. Estas misturas foram transferidas para um só frasco que se manteve protegido da luz.

Utilizou-se a microplaca de cor preta, fornecida com o *kit*, instalou-se no suporte magnético, e distribuíram-se 200 μL da mistura de anticorpos por cada um dos noventa e seis poços da placa. Deixou-se repousar durante dois minutos. Com a placa sobre o suporte magnético, inverteu-se a mesma para um contentor de resíduos líquidos e deixou-se secar sobre o papel de laboratório. Com a mesma estratégia, procedeu-se a uma lavagem de cada poço com 150 μL de tampão de lavagem. Distribuíram-se os padrões e as amostras, em duplicado, pelos poços da microplaca. A microplaca foi selada com a película própria e mantida a agitar durante duas horas, protegida da luz.

Após o período de incubação, a microplaca foi novamente instalada no suporte magnético e os poços foram lavados por três vezes com o tampão apropriado.

Preparou-se a segunda mistura de anticorpos pela adição de 60 μL de cada um dos quatro anticorpos e 2760 μL de solução tampão diluente de anticorpos, o que fez um total de 3000 μL . Esta mistura foi distribuída num volume de 25 μL pelos noventa e seis poços da microplaca e incubou-se, selada, no escuro, em agitação constante durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Após a incubação, a microplaca foi instalada no suporte magnético e fizeram-se três lavagens com a solução própria. Adicionaram-se 50 μL de estreptavidina conjugada a R-ficoeritrina e incubou-se, selada, no escuro, em agitação constante durante 30 minutos à temperatura ambiente. Realizaram-se mais três lavagens com solução própria. No fim, adicionaram-se 120 μL de tampão de lavagem a cada um dos poços, selou-se a placa e incubou-se no escuro durante 5 minutos em agitação constante à temperatura ambiente.

A aquisição dos resultados foi efetuada com o programa *Luminex100 IS Software versão 2.3.182* (Luminex Corporation, Austin, Estados Unidos) e os resultados foram processados no *software ProcartaPlex Analyst Software 1.0* (Affymetrix Company, eBioscience, Viena, Austria). Todo o procedimento descrito foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Foram considerados apenas os resultados dentro da linearidade do método.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM® SPSS® v. 22.0 e os gráficos foram construídos através de GraphPad Prism versão 5.0. Na análise descritiva foram determinadas medidas de localização (mediana e quartis) e de dispersão (amplitude interquartil) para as variáveis quantitativas.

A avaliação da normalidade de distribuição das variáveis quantitativas foi feita de acordo com o teste de Shapiro-Wilk.

A comparação entre as duas patologias em estudo (cancro do pulmão e linfoma difuso de grandes células B), dentro de cada momento em estudo (T0, T1 e T2), foi feita segundo o teste *t-Student* para amostras independentes (no caso de se verificar uma normalidade da distribuição subjacente) ou segundo o teste U de Mann-Whitney (no caso contrário). A comparação das populações celulares entre os três momentos em estudo, T0, T1 e T2, dentro de cada patologia, foi feita segundo o teste não paramétrico Friedman e as comparações múltiplas foram feitas de acordo com o teste não paramétrico Wilcoxon.

Consideraram-se significativas, para todas as comparações, os valores iguais ou inferiores a 0,05.

RESULTADOS

A amostra sobre a qual este estudo se debruçou foi constituída por oito doentes com cancro do pulmão do subtipo adenocarcinoma e nove doentes com linfoma difuso de grandes células B, todos a receber tratamento de radioterapia conforme descrito na Tabela 17 e na Tabela 18, respetivamente.

Os doentes com cancro do pulmão realizaram radioterapia radical com uma dose mediana de 66 Gy, com uma distribuição entre a dose mínima de 54 Gy e a dose máxima de 66 Gy. Os tratamentos foram realizados com recurso à radioterapia administrada em frações, com uma mediana de trinta e três frações e com um mínimo de vinte e sete frações e um máximo de trinta e três frações, tendo a duração

do tratamento uma mediana de quarenta e seis dias, com o tratamento mais curto a ter durado trinta e sete dias e o mais longo cinquenta e dois dias (Tabela 17).

Tabela 17: Caracterização dos oito doentes com cancro do pulmão de não pequenas células, subtipo adenocarcinoma no que respeita ao género, à idade, ao estadiamento e ao tratamento com radioterapia radical e à sua duração.

Doente	Género	Idade (anos)	Estadiamento	Recidiva	Cirurgia	QT pré-RT	QT+RT	QT	Dose total	Duração do tratamento (dias)
1	M	76	II,III,0	N	N	N	S	Cis, Vin	66 Gy/33Fr	52
2	M	71	I,III,0	N	N	S	S	Cis, Pem	66 Gy/33Fr	49
3	M	80	IIa,III,0	N	N	S	N	Cis, Pem	66 Gy/33Fr	47
4	F	67	IIa,II,0	N	S	N	N	N	54 Gy/27Fr	37
5	M	56	Ib,II,0	N	S	N	S	Cis, Vin	60 Gy/30Fr	42
6	M	77	IIa,00	N	N	N	N	N	66 Gy/33Fr	48
7	M	79	II,I,0	S	S	N	N	N	66 Gy/33Fr	44
8	M	49	II,I,0	S	S	N	N	N	66 Gy/33Fr	44

QT - quimioterapia; RT - radioterapia; F - feminino; M - masculino; Cis - cisplatina; Vin - vinorelbina; Pem - pemetrexed; Gy - gray; Fr - frações; N - não; S - sim.

Os doentes com linfoma difuso de grandes células B realizaram radioterapia com uma dose mediana de 36 Gy, com distribuição entre a dose mínima de 30 Gy e a dose máxima de 40 Gy. O tratamento foi realizado com recurso à radioterapia administrada em frações, com uma mediana de dezoito frações, num mínimo de quinze frações e um máximo de vinte frações. A duração do tratamento apresentou uma mediana de vinte e três dias e o tratamento mais curto durou vinte dias e o mais longo durou vinte e nove dias, como se pode observar na Tabela 18.

A realização de leucograma nas amostras de sangue periférico dos doentes com cancro do pulmão e com linfoma difuso de grandes células B permitiu verificar que, ao longo do tratamento com a radioterapia, ocorreram alterações nas contagens de leucócitos, de neutrófilos, de linfócitos, de monócitos, de eosinófilos e de basófilos. Os valores absolutos do número de leucócitos totais e dos seus diferentes tipos como o número de linfócitos, de monócitos, de neutrófilos, de eosinófilos e de basófilos foram obtidos com base no hemograma e na fórmula leucocitária; o número de glóbulos vermelhos e de plaquetas obtidos não foram objeto deste estudo, como tal

não foram utilizados nem são apresentados.

Tabela 18: Caracterização dos nove doentes com linfoma difuso de grandes células B no que respeita ao género, à idade ao diagnóstico, ao estadiamento e ao tratamento com radioterapia e à sua duração.

Doente	Género	Idade (anos)	Estadiamento	Recidiva	Metastização	QT pré RT	QT+RT	QT	Dose total	Duração do tratamento (dias)
1	M	45	IIB	N	N	N	S	R-CHOP	30 Gy/15Fr	20
2	F	70	IIIB	N	N	S	N	R-CHOP	40 Gy/20Fr	27
3	M	73	IVB	N	N	S	S	R-CHOP	40 Gy/20Fr	27
4	M	34	IIB	N	N	S	N	R-CHOP	40 Gy/20Fr	28
5	M	38	IIIB	N	N	S	N	R-CHOP	30 Gy/15Fr	21
6	M	52	IVB	N	N	S	N	R-CHOP	30 Gy/15Fr	22
7	M	63	IVB	N	N	S	N	R-CHOP	30 Gy/15Fr	22
8	F	70	IVB	N	N	S	N	R-CHOP	36 Gy/18Fr	23
9	F	23	IIB	N	N	S	S	R-CHOP, R-ESHAP	40 Gy/20Fr	29

QT – quimioterapia; RT – radioterapia; F – feminino; M – masculino; N – não; S – sim; R-CHOP – hidroxidoxorubicina, vincristina, prednisona, rituximab; CHOP – hidroxidoxorubicina, vincristina, prednisona; ESHAP-R – etoposídeo, metilpredisolona, citarabina, cisplatina, rituximab; Gy – gray; Fr – frações.

Como se pode observar na Figura 68, nos doentes com cancro do pulmão de não pequenas células, subtipo adenocarcinoma, doravante identificados como doentes com cancro do pulmão, verificou-se uma diminuição significativa do valor dos leucócitos totais que passaram de um valor com uma mediana de $6,76 \times 10^3$ células/ μL e com uma amplitude interquartil de $1,50 \times 10^3$ células/ μL , antes da radioterapia (T0), para um valor com uma mediana de $4,40 \times 10^3$ células/ μL e com uma amplitude interquartil de $1,75 \times 10^3$ células/ μL ($p=0,036$) no tempo T1. No entanto, não se observaram alterações entre os tempos descritos e o tempo T2 no qual se obteve uma mediana de $5,80 \times 10^3$ células/ μL com uma amplitude interquartil de $1,08 \times 10^3$ células/ μL , nem entre os tempos T0 e T2.

No que respeita ao número de linfócitos, no tempo T0 obteve-se uma mediana de $1,80 \times 10^3$ células/ μL e uma amplitude interquartil de $0,27 \times 10^3$ células/ μL , valor que foi significativamente superior ao obtido no tempo T1, em que a mediana foi de

0,85 10^3 células/ μL e a amplitude interquartil foi de 0,30 10^3 células/ μL ($p=0,011$) e ao obtido no tempo T2, onde a mediana foi de 0,70 10^3 células/ μL e a amplitude interquartil de 0,32 10^3 células/ μL ($p=0,012$).

Ainda nos doentes com cancro do pulmão observou-se um aumento significativo dos valores absolutos de monócitos do momento de avaliação T1, em que a mediana foi de 0,50 10^3 células/ μL e a amplitude interquartil foi de 0,13 10^3 células/ μL , para o tempo T2 onde que a mediana foi de 0,60 10^9 células/ μL e a amplitude interquartil de 0,15 10^3 células/ μL ($p=0,012$). No entanto, não se observaram diferenças significativas dos valores absolutos de monócitos entre os tempos T1 e T2 e o momento T0, no qual a mediana foi de 0,60 10^3 células/ μL e a amplitude interquartil de 0,23 10^3 células/ μL . Nas populações de neutrófilos, de eosinófilos e de basófilos não se observaram alterações significativas entre os três momentos de avaliação, conforme se pode observar na Figura 68. Nos doentes com linfoma difuso de grandes células B, como se pode verificar na Figura 69, não se observaram alterações significativas no leucograma.

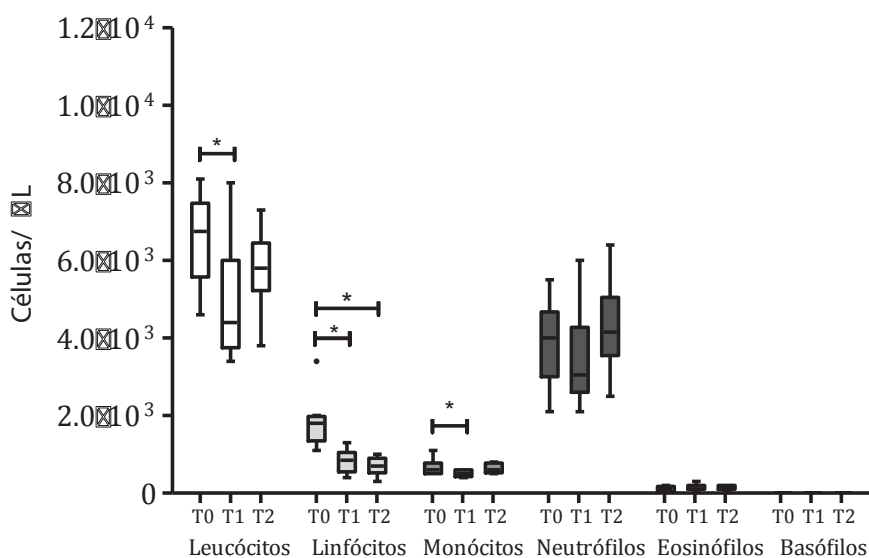


Figura 68: Leucograma do sangue periférico dos doentes com cancro do pulmão. Os resultados correspondem ao número total de leucócitos e à discriminação das populações de neutrófilos, de linfócitos, de monócitos, de eosinófilos e de basófilos obtidos nos tempos T0, T1 e T2. Os resultados encontram-se expressos em valores absolutos ($\times 10^3$ células/ μL) e representam a mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3) da distribuição das diferentes populações em estudo. Os outliers estão representados por •. As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$.

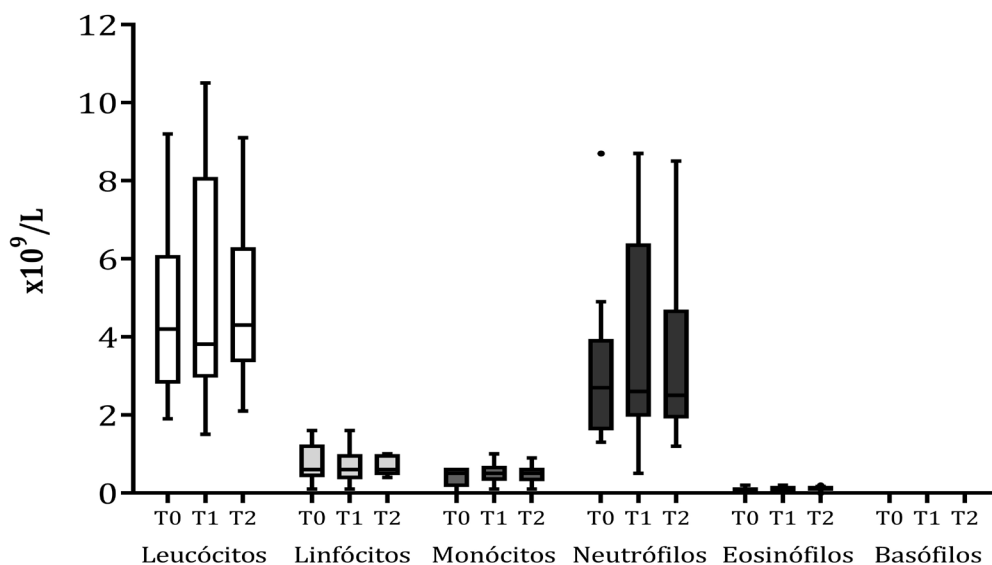


Figura 69: Leucograma do sangue periférico dos doentes com linfoma difuso de grandes células B. Os resultados correspondem ao número total de leucócitos e à discriminação das populações de neutrófilos, de linfócitos, de monócitos, de eosinófilos e de basófilos obtidos nos tempos T0, T1 e T2. Os resultados encontram-se expressos em valores absolutos ($\times 10^3$ células/ μ L) e representam a mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3) da distribuição das diferentes populações. Os outliers estão representados por •. As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$.

Verificou-se que no primeiro momento de avaliação (T0) os leucócitos totais dos doentes com cancro do pulmão apresentaram uma mediana significativamente superior à dos doentes com linfoma difuso de grandes células B, nos quais se obteve uma mediana de $4,20 \times 10^3$ células/ μ L e uma amplitude interquartil de $2,00 \times 10^3$ células/ μ L ($p=0,046$), conforme detalhado na Figura 70. No entanto, no que respeita ao momento T1 e ao momento T2 não houve diferenças nos leucócitos totais entre os doentes com cancro do pulmão e os doentes com linfoma difuso de grandes células B.

No que respeita aos linfócitos totais, observou-se, no momento T0, que os doentes com cancro do pulmão apresentaram uma mediana significativamente superior à dos doentes com linfoma difuso de grandes células B, nos quais se observou uma mediana de $0,60 \times 10^3$ células/ μ L e uma amplitude interquartil de $0,50 \times 10^3$ células/ μ L ($p=0,046$), como se pode verificar na Figura 70.

No momento T1 e no momento T2 não houve diferenças significativas entre os doentes com cancro do pulmão e os doentes com linfoma difuso de grandes

células B. Nas restantes populações leucocitárias (monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos) não se observaram diferenças significativas entre os doentes com cancro do pulmão e linfoma difuso de grandes células B.

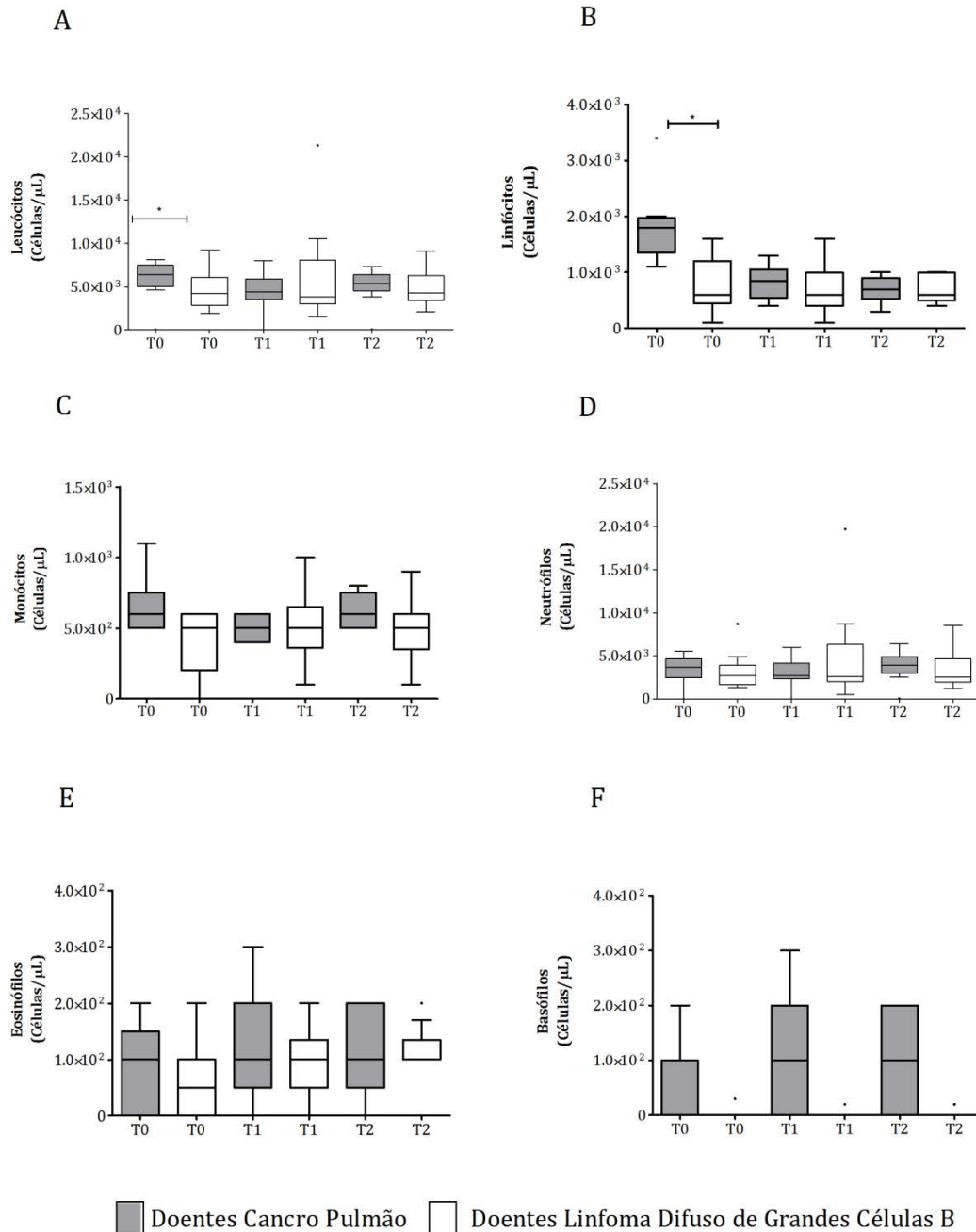


Figura 70: Leucograma do sangue periférico dos doentes com cancro do pulmão e dos doentes com linfoma difuso de grandes células B. Os resultados correspondem ao número total de leucócitos (A), de linfócitos (B), de monócitos (C), de neutrófilos (D), de eosinófilos (E) e de basófilos (F) obtido em T0, em T1 e em T2. Os resultados encontram-se expressos em valores absolutos ($\times 10^3$ células/ μL) e representam a mediana, e intervalo interquartil (Q1-Q3). Os *outliers* estão representados por •. As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$.

Subpopulações linfocitárias identificadas por Lymphogram®

Na Tabela 19 encontram-se descritos a frequência relativa e os valores absolutos das células T, das células B e das células *Natural Killer* observados nos doentes com cancro do pulmão.

Tabela 19: Frequência relativa (%) e valor absoluto (V.A.; células/ μ L) das células T e das suas respetivas subpopulações, das células B e das células *natural killer* e das suas respetivas subpopulações obtidos nos tempos T0, T1 e T2 nos doentes com cancro do pulmão.

		T0			T1			T2		
		Med	Q1	Q3	Med	Q1	Q3	Med	Q1	Q3
CD3 ⁺	%	80,40	74,28	84,43	82,20	66,48	87,60	75,50	63,48	80,95
	V.A.	1451,6	910,55	1576,95	715,70	561,78	775,88	498,00	355,65	622,88
CD3 ⁺ CD4 ⁺	%	43,00	28,35	49,58	45,15	31,73	53,23	35,95	33,33	39,38
	V.A.	665,02	406,84	753,97	290,37	183,00	385,77	136,85	121,13	206,81
CD3 ⁺ CD8 ⁺	%	27,85	24,25	31,98	22,45	20,23	26,98	26,70	21,00	36,83
	V.A.	368,71	221,30	483,45	155,78	110,84	198,79	115,60	69,61	217,76
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	%	0,75	0,58	1,20	0,95	0,45	1,95	0,65	0,30	1,25
	V.A.	11,15	5,29	18,97	5,45	2,80	14,46	2,65	1,38	4,88
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	%	4,35	2,93	5,33	5,65	3,75	7,15	3,35	2,93	4,93
	V.A.	45,94	42,47	81,52	24,64	16,47	52,94	17,03	11,38	20,53
CD19 ⁺	%	5,00	2,73	6,80	* 3,65	1,70	5,28	4,90	2,68	7,53
	V.A.	91,65	59,78	117,45	26,50	11,95	47,85	23,85	20,03	41,43
CD3 ⁻ CD56 ⁺	%	16,35	11,95	20,55	13,85	9,08	28,60	21,25	15,08	30,70
	V.A.	298,80	214,65	351,40	* 116,30	90,75	153,95	119,20	92,53	220,23
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD8 ⁺	%	4,20	2,65	5,85	3,25	1,55	4,35	4,60	2,98	7,38
	V.A.	10,88	5,97	15,84	* 3,27	1,60	5,88	5,41	2,87	8,14

Legenda: Med = mediana; Q1 = quartil 1; Q3 = quartil 3. Os resultados foram expressos em frequência relativa e em valores absolutos. Os resultados expressam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças significativas entre T0 e T1 estão representadas com * para $p < 0,05$.

Nos doentes com cancro do pulmão, como se pode verificar na Tabela 19, não se observaram alterações significativas nas células T, identificadas pela marcação CD3 positiva, e das suas subpopulações, nomeadamente as células T *helper* (CD3⁺CD4⁺), as células T citotóxicas (CD3⁺CD8⁺), as células T duplas positivas (CD4⁺CD8⁺) e as células duplas negativas (CD4⁻CD8⁻) para os diferentes momentos

em estudo.

A população de células B, identificada pela expressão positiva para CD19, diminuiu significativamente de T0, onde que se observou uma mediana de 5,00% e uma amplitude interquartil de 4,08%, para T1, onde que se observou uma mediana de 3,65% e uma amplitude interquartil de 3,58% ($p < 0,025$). Contudo, não se observaram diferenças significativas na população de células B entre estes momentos e o momento T2 em que se observou uma mediana de 4,90% e uma amplitude interquartil de 4,85% (Tabela 19).

As células Natural Killer foram identificadas e quantificadas pela ausência de expressão de CD3 e a pela expressão positiva de CD56. No momento T0 estas células apresentaram uma mediana de 298,80 células/ μ L e uma amplitude interquartil de 136,75 células/ μ L, que foi significativamente superior à mediana de 116,30 células/ μ L e respetiva amplitude interquartil de 63,20 células/ μ L observada em T1 ($p = 0,049$). Porém, não se observaram diferenças significativas na população de células Natural Killer entre estes momentos e o momento T2 em que se observou uma mediana de 119,20 células/ μ L e uma amplitude interquartil de 127,70 células/ μ L.

As células Natural Killer citotóxicas foram identificadas e quantificadas pela ausência de expressão de CD3 e pela expressão positiva de CD56 e de CD8. No momento T0 as células Natural Killer citotóxicas apresentaram uma mediana de 10,88 células/ μ L e uma amplitude interquartil de 9,87 células/ μ L, que foi significativamente superior à observada no momento T1, em que se observou uma mediana de 3,27 células/ μ L e uma amplitude interquartil de 4,28 células/ μ L ($p < 0,049$). Apesar desta diferença, não se observaram diferenças com significado estatístico nesta população entre os tempos referidos e o momento T2, em que se observou uma mediana de 5,41 células/ μ L e uma amplitude interquartil de 5,27 células/ μ L, como se pode verificar na Tabela 19.

A Tabela 20 descreve a frequência relativa e os valores absolutos das células T, das células B, e das células Natural Killer observados nos doentes com linfoma difuso de grandes células B. No caso destes doentes não se observaram diferenças estatisticamente significativas para qualquer destas células entre os momentos T0, T1 e T2.

Tabela 20: Frequência relativa (%) e valor absoluto (V.A.; células/ μ L) das células T e das suas respectivas subpopulações, das células B e das células *Natural Killer* e das suas respectivas subpopulações obtidos em T0, em T1 e em T2 nos doentes com linfoma difuso de grandes células B.

		T0			T1			T2		
		Med	Q1	Q3	Med	Q1	Q3	Med	Q1	Q3
CD3+	%	77,90	75,70	83,40	77,30	61,10	89,50	78,40	76,60	81,30
	V.A.	454,20	311,60	781,20	463,80	358,00	604,89	471,60	392,00	546,00
CD3+ CD4+	%	34,00	26,40	40,30	37,70	27,40	45,20	29,40	20,00	33,20
	V.A.	160,15	104,70	240,09	141,00	69,81	287,32	139,55	101,56	214,90
CD3+ CD8+	%	37,10	26,60	39,90	25,00	17,10	40,30	40,90	36,50	44,10
	V.A.	124,02	77,83	217,17	101,85	74,40	214,37	209,59	161,11	313,29
CD3+ CD4+ CD8+	%	0,30	0,30	0,80	0,30	0,30	0,60	0,30	0,30	0,40
	V.A.	3,05	1,36	4,17	1,81	1,07	3,96	1,52	0,95	3,25
CD3+ CD4- CD8-	%	2,80	2,50	5,70	2,30	1,90	4,40	4,10	2,30	10,50
	V.A.	21,75	7,17	56,25	16,04	6,05	30,96	19,14	11,96	49,52
CD19+	%	0,30	0,20	0,90	0,30	0,20	2,30	0,60	0,30	1,60
	V.A.	3,20	1,20	5,50	1,60	0,60	23,00	6,00	3,00	9,60
CD3- CD56+	%	21,60	16,20	24,00	22,30	9,50	36,40	21,20	15,60	23,00
	V.A.	144,00	86,40	286,40	133,80	80,00	164,10	127,20	93,60	181,50
CD3- CD56+ CD8+	%	3,30	1,90	5,00	3,70	1,80	4,80	2,40	1,90	8,10
	V.A.	7,20	2,25	11,66	3,12	2,38	6,55	4,60	1,22	14,66

Legenda: Med = mediana; Q1 = quartil 1; Q3 = quartil 3. Os resultados foram expressos em frequência relativa e em valores absolutos. Os resultados expressam a mediana e o intervalo interquartil.

No que respeita às células T, não se observaram diferenças significativas entre os doentes com cancro do pulmão e os doentes com linfoma difuso de grandes células B, conforme se pode constatar na Figura 71.

No momento T0 a população das células B, identificada pela expressão positiva de CD19, foi significativamente inferior nos doentes com linfoma difuso de grandes células B, em que se observou uma mediana de 0,30% e uma amplitude interquartil de 0,70% do que nos doentes com cancro do pulmão ($p=0,001$), conforme se pode verificar na Figura 71C. Esta diferença manteve-se no momento T2, em que os doentes com cancro do pulmão apresentaram uma mediana de 4,90% com uma amplitude interquartil de 4,85%, superior à mediana de 0,60% com a amplitude interquartil de 1,30% dos doentes com linfoma difuso de grandes células B ($p=0,012$). Não se observaram diferenças significativas no momento T1, em que os

doentes com linfoma difuso de grandes células B apresentaram uma mediana de 0,30% com uma amplitude interquartil de 0,70%.

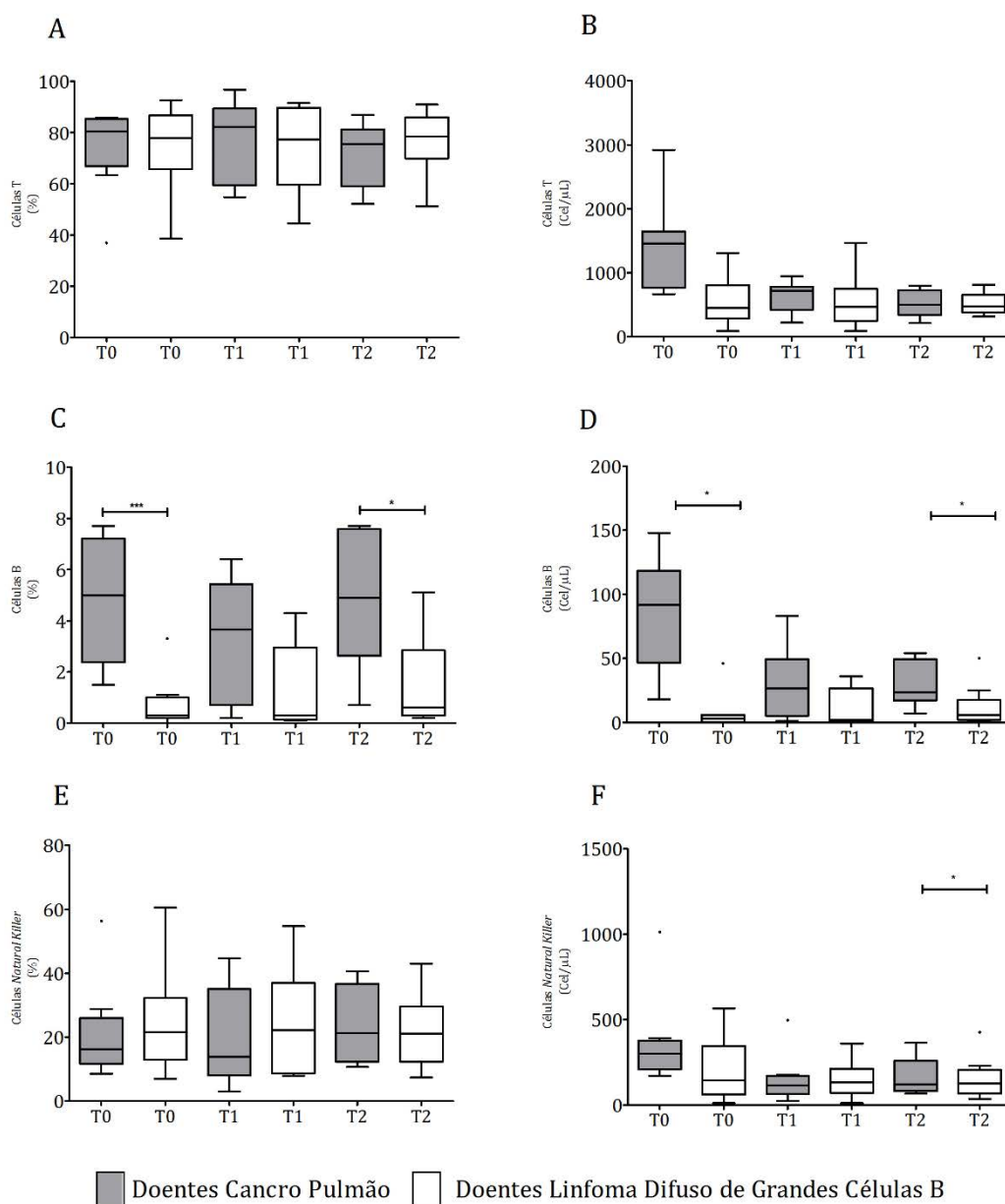


Figura 71: Populações e subpopulações de células T, nomeadamente das células T (CD3⁺, A e B), células B (CD19⁺, C e D) e células Natural Killer (CD3⁺CD56⁺, E e F) no sangue periférico dos doentes com cancro do pulmão e dos doentes com linfoma difuso de grandes células B obtidas em T0, em T1 e em T2. Os resultados encontram-se expressos em frequência relativa (%) e em valores absolutos (células/μL) e representam a mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3). Os *outliers* estão representados por •. As diferenças significativas estão representadas com * para p<0,05 e ** para p<0,005.

A análise dos valores absolutos (células/μL), apresentada na Figura 71D, corroborou estes resultados. No momento T0 os doentes com cancro do pulmão

apresentaram uma mediana de 91,65 células/ μL com uma amplitude interquartil de 57,68 células/ μL , enquanto os doentes com linfoma difuso de grandes células B apresentaram uma mediana de 3,20 células/ μL com uma amplitude interquartil de 4,30 células/ μL ($p=0,003$). No momento T2 os doentes com cancro do pulmão apresentaram uma mediana de 23,85 células/ μL com uma amplitude interquartil de 21,40 células/ μL enquanto os doentes com linfoma difuso de grandes células B apresentaram uma mediana de 6,00 células/ μL com uma amplitude interquartil de 6,60 células/ μL ($p=0,021$).

No que concerne às células *Natural Killer* não se observaram diferenças significativas entre os dois grupos de doentes.

Células T reguladoras e suas subpopulações

As células T reguladoras foram identificadas e quantificadas através da marcação $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD127}^{\text{lo}}$, denominadas células T reguladores *naïve* e as células T reguladoras induzidas $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD127}^{\text{lo}}\text{Foxp3}^+$. Nos doentes com cancro do pulmão, como representado na Tabela 21, não se observaram alterações significativas durante o estudo, nem nas populações de células T reguladoras *naïve* nem nas T reguladoras induzidas.

Tabela 21: Frequência relativa (%) e valor absoluto (V.A.; células/ μL) das células T reguladoras e das suas subpopulações obtidos para os tempos T0, T1 e T2 nos doentes com cancro do pulmão.

Populações de células T reguladoras e suas subpopulações		T0			T1			T2		
		Med	Q1	Q3	Med	Q1	Q3	Med	Q1	Q3
$\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD127}^{\text{lo}}$	%	8,55	6,28	9,18	9,15	6,60	10,55	8,60	8,03	10,20
	V.A.	42,66	29,14	51,68	21,35	17,00	22,43	13,30	8,07	19,57
$\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD127}^{\text{lo}}\text{Foxp3}^+$	%	1,20	0,25	0,75	0,90	0,38	1,68	0,95	0,28	1,73
	V.A.	1,89	0,79	7,45	1,97	0,99	3,88	1,42	0,46	2,43

Legenda: Med = mediana; Q1 = quartil 1; Q3 = quartil 3. Os resultados foram expressos em frequência relativa e em valores absolutos. Os resultados expressam a mediana e o intervalo interquartil.

No que concerne às células T reguladoras nos doentes com linfoma difuso de grandes células B, verificou-se uma diminuição significativa das células T reguladoras induzidas do momento T1, em que se observou uma mediana de 0,70%

e uma amplitude interquartil de 1,00% para o momento T2, em que se observou uma mediana de 0,30%, com uma amplitude interquartil de 0,20% ($p=0,032$). Contudo, não se observaram alterações significativas nestas células T entre os momentos referidos (T1 e T2) e o momento T0 onde que se observou uma mediana de 0,40% e uma amplitude interquartil de 0,80% (Tabela 22). Não se observaram diferenças significativas na frequência relativa e nos valores absolutos na população de células T reguladoras *naïves* entre os diferentes momentos em estudo.

Adicionalmente, no que respeita às células T reguladoras não se observaram diferenças significativas entre os doentes com cancro do pulmão e os doentes com linfoma difuso de grandes células B.

Tabela 22: Frequência relativa (%) e valor absoluto (V.A.; células/ μ L) das células T reguladoras e respetivas subpopulações nos doentes com linfoma difuso de grandes células B obtidos nos tempos T0, T1 e T2.

Populações de células T reguladoras e suas subpopulações		T0			T1			T2		
		Med	Q1	Q3	Med	Q1	Q3	Med	Q1	Q3
CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ^{lo}	%	5,90	4,70	9,80	5,40	3,60	9,10	6,30	3,80	8,50
	V.A.	12,26	6,18	19,00	6,35	3,12	12,77	6,40	5,04	12,59
CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ^{lo} Foxp3 ⁺	%	0,40	0,30	1,10	0,70	0,50	1,50	0,30 *	0,10	0,30
	V.A.	0,08	0,02	0,19	0,05	0,02	0,12	0,02	0,01	0,03

Legenda: Med = mediana; Q1 = quartil 1; Q3 = quartil 3. Os resultados foram expressos em frequência relativa e em valores absolutos. Os resultados expressam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças significativas entre T1 e T2 em %, estão representadas com um * nas comparações entre o momento T0 *versus* T2 em %, para um valor de $p<0,05$.

A dupla marcação CD31 e de CD45RA das células T reguladoras induzidas não foi considerada devido ao baixo número de células identificadas. O mesmo se verificou em relação à expressão de NF- κ B.

Expressão de citocinas e quimiocinas

As citocinas e as moléculas de perfil Th1 que foram avaliadas através da expressão de IL-2, de INF- γ , de TNF- α , de IL-1 β , de IL-18 e de IL-6 não apresentaram diferenças significativas nos diferentes momentos do estudo nos doentes com cancro do pulmão, como se pode verificar na Figura 72.

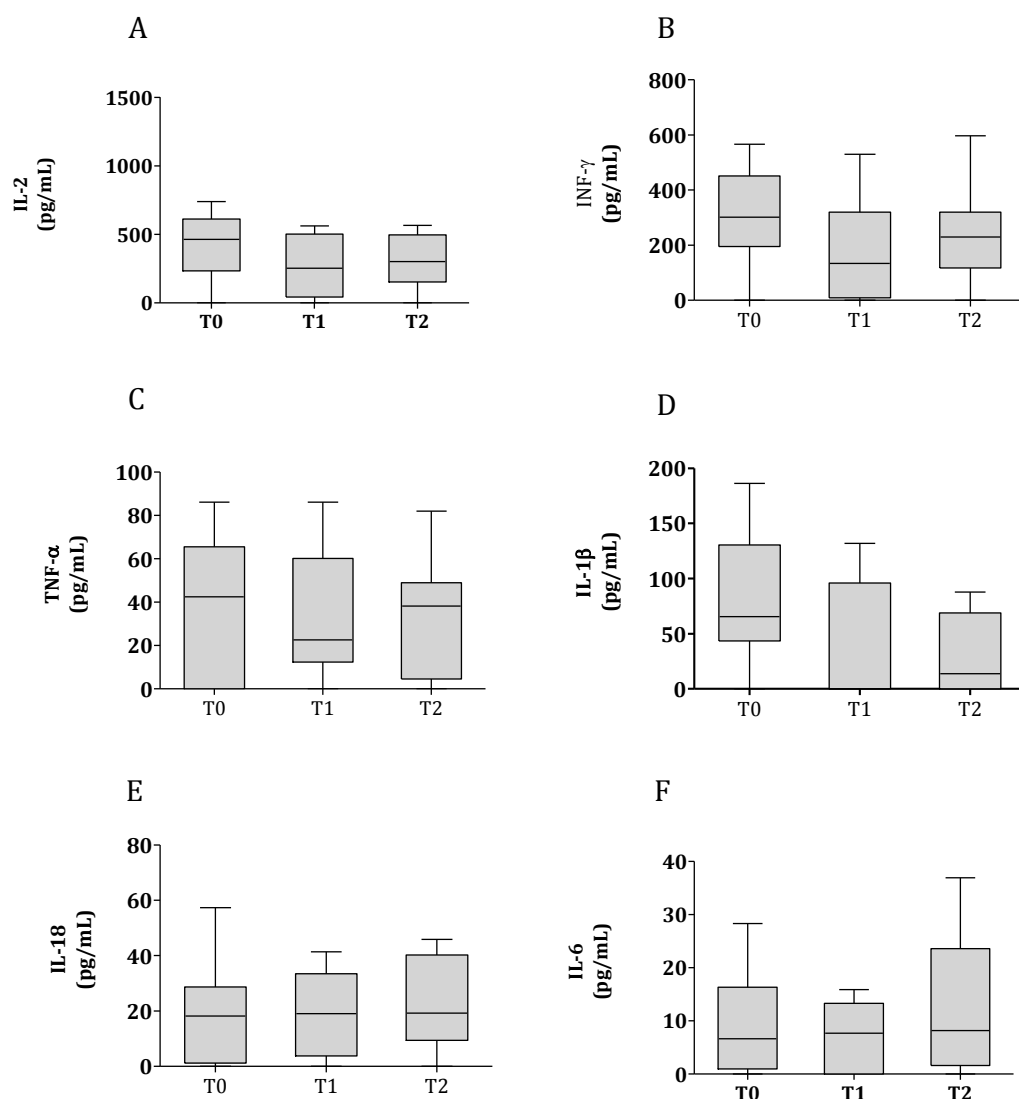


Figura 72: Quantificação das citocinas e de moléculas do perfil Th1 nomeadamente a IL-2 (A), o INF- γ (B), o TNF- α (C), a IL-1 β (D), a IL-18 (E) e a IL-6 (F) no sangue periférico dos doentes de cancro do pulmão, nos momentos T0, T1 e T2. Os resultados encontram-se expressos pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3).

Nos doentes com linfoma difuso de grandes células B, observou-se um aumento significativo de interferão- γ do momento T0, onde se obteve uma mediana de 144,01 pg/mL com uma amplitude interquartil de 179,36 pg/mL, no tempo T1 onde se obteve uma mediana de 214,60 pg/mL com uma amplitude interquartil de 112,96 pg/mL ($p=0,038$) e em T2 onde se obteve uma mediana de 253,19 pg/mL com uma amplitude interquartil de 214,73 pg/mL ($p=0,038$), como se pode observar na Figura 73B.

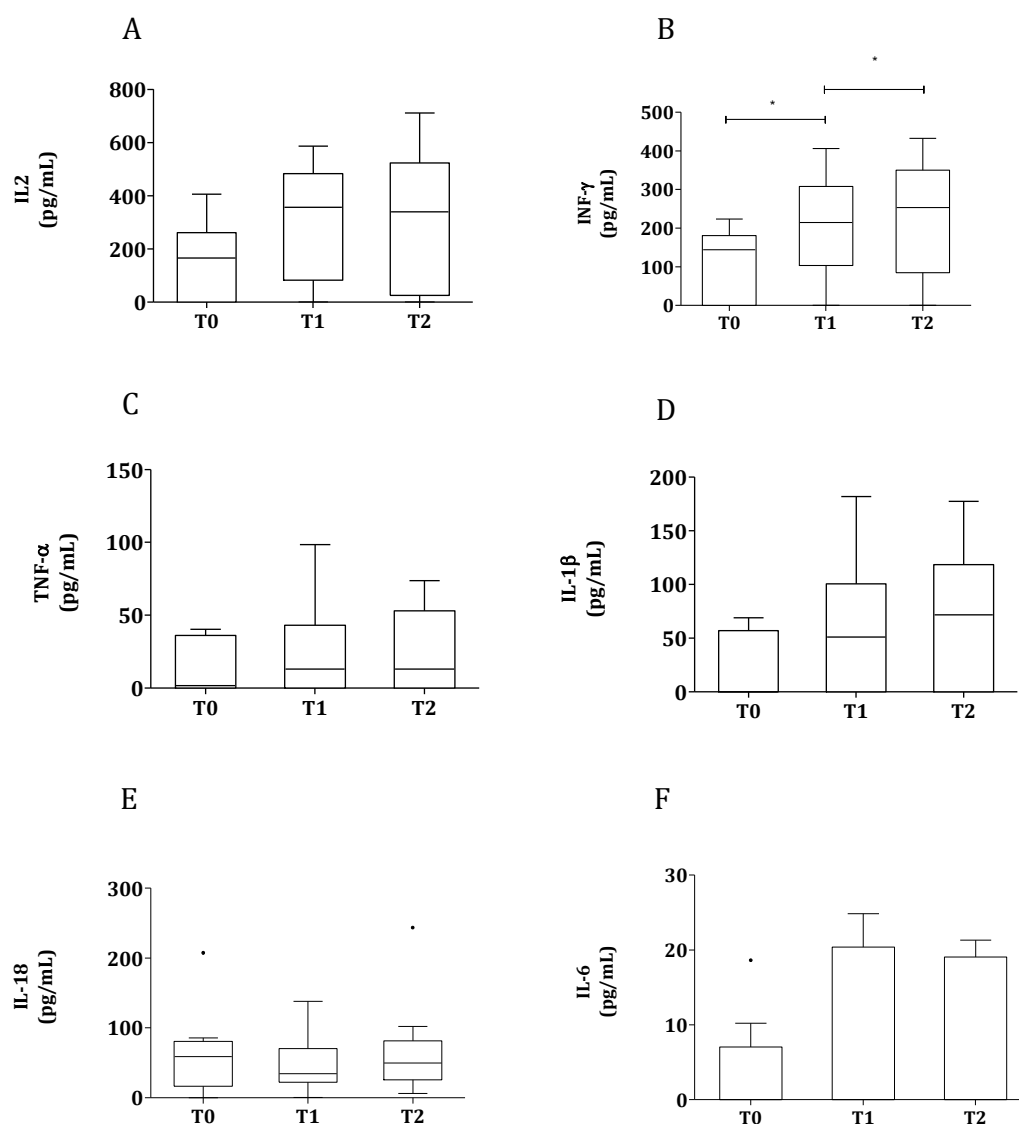


Figura 73: Quantificação das citocinas e de moléculas do perfil Th1 como a IL-2 (A), o INF- γ (B), o TNF- α (C), a IL-1 β (D), a IL-18 (E) e a IL-6 (F) no sangue periférico dos doentes com linfoma difuso de grandes células B, nos momentos T0, T1 e T2. Os resultados encontram-se expressos pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3). Os *outliers* estão representados por •. As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$.

Não se observaram diferenças significativas no nível da IL-2, do TNF- α , da IL-1 β , da IL-18 e da IL-6, para os diferentes momentos em estudo, como se pode verificar na Figura 73.

Na comparação entre as citocinas do perfil Th1, entre os doentes com cancro do pulmão e os doentes com linfoma difuso de grandes células B, verificou-se que o nível da citocina IL-2 no momento T0 foi superior nos doentes com cancro do pulmão, em que se observou uma mediana de 462,76 pg/mL com uma amplitude

interquartil de 348,55 pg/mL, do que nos doentes com linfoma difuso de grandes células B, em que se observou uma mediana de 165,48 pg/mL com uma amplitude interquartil de 241,78 pg/mL ($p=0,012$), como se pode observar na Figura 74A. Não se observaram diferenças significativas no momento T1 e no momento T2.

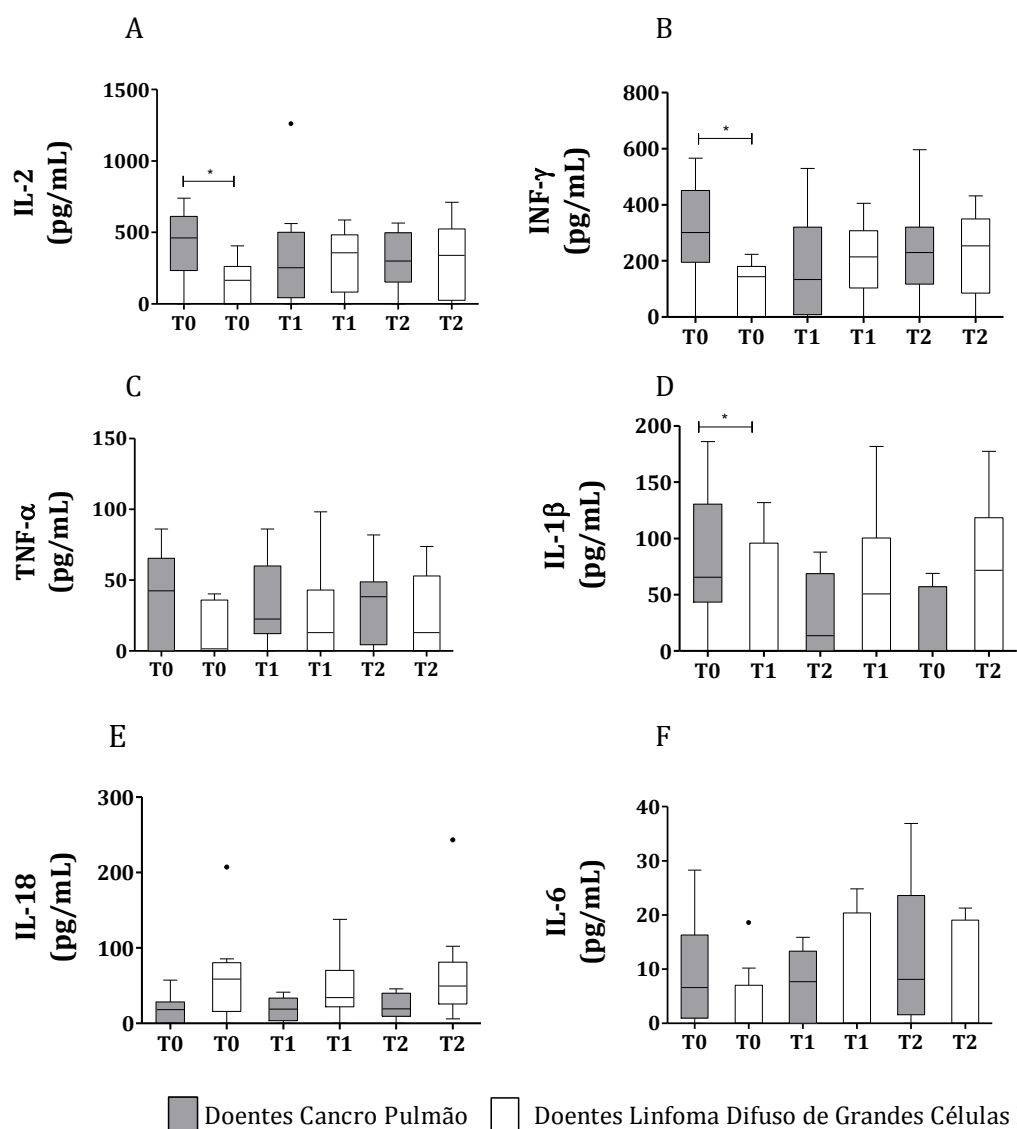


Figura 74: Comparação das citocinas e de moléculas do perfil Th1, como a IL-2 (A), o INF- γ (B), o TNF- α (C), a IL-1 β (D), a IL-18 (E) e a IL-6 (F) no sangue periférico dos doentes com cancro do pulmão e nos doentes com linfoma difuso de grandes células B, nos tempos T0, T1 e T2. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3). Os *outliers* estão representados por •. As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$.

Para os níveis de expressão do INF- γ , os doentes com cancro do pulmão apresentaram um valor superior desta molécula, com uma mediana de

301,53 pg/mL e uma amplitude interquartil de 239,68 pg/mL comparativamente aos doentes de linfoma difuso de grandes células B no momento T0, como se pode observar na Figura 74B. Não se observaram diferenças significativas no momento T1 e no momento T2. Para a citocina a IL-1 β , também no momento T0, verificou-se que os doentes com cancro do pulmão apresentaram uma mediana de 65,58 pg/mL com uma distribuição interquartil de 60,47 pg/mL, enquanto os doentes com linfoma difuso de grandes células B apresentaram um nível inferior, com uma mediana de 0,00 pg/mL e uma distribuição interquartil de 53,99 pg/mL ($p=0,039$), como se pode observar na Figura 74D. Não se observaram diferenças significativas no momento T1 nem no momento T2. Ainda no que respeita às moléculas de perfil Th1 não se observaram diferenças significativas no TNF- α , na IL-18 e na IL-6 entre os doentes com cancro do pulmão e os doentes com linfoma difuso de grandes células B nos diferentes momentos do estudo.

Nos doentes com cancro do pulmão, as citocinas de perfil Th2 que foram avaliadas através da expressão de IL-4, de IL-5 e de IL-13 estão representadas na Figura 75 e, conforme se pode observar, não houve diferenças significativas nos diferentes momentos em estudo.

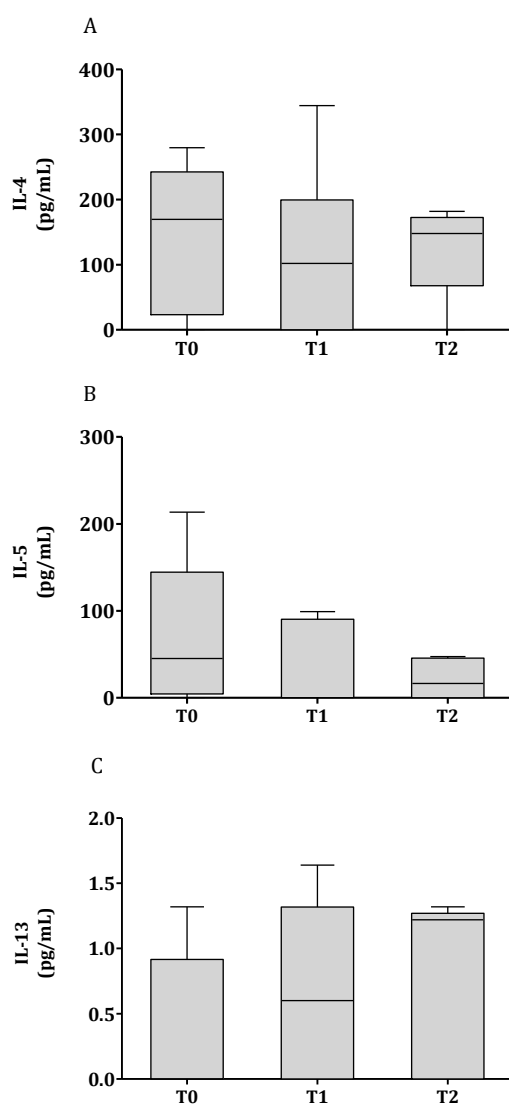


Figura 75: Quantificação de algumas citocinas do perfil Th2, nomeadamente a IL-4 (A), a IL-5 (B) e a IL-13 (C) nos doentes com cancro do pulmão, nos tempos T0, T1 e T2. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3).

Nos doentes com linfoma difuso de grandes células B, as citocinas de perfil Th2 que foram avaliadas através da expressão de IL-4, de IL-5 e de IL-13 estão representadas na Figura 76 e, conforme se pode verificar, também não houve diferenças significativas nos diferentes momentos em estudo.

No que respeita às citocinas do perfil Th2 observou-se, no momento T0, que o nível da IL-5, como se pode verificar na Figura 77B, apresentou uma mediana de 45,17 pg/mL com uma amplitude interquartil de 120,31 pg/mL nos doentes com cancro do pulmão, superior à apresentada pelos doentes com linfoma difuso de grandes células B, onde que se observou uma mediana de 0,00 pg/mL com uma

distribuição interquartil de 12,58 pg/mL ($p= 0,048$). Não se observaram diferenças significativas no momento T1 e no momento T2.

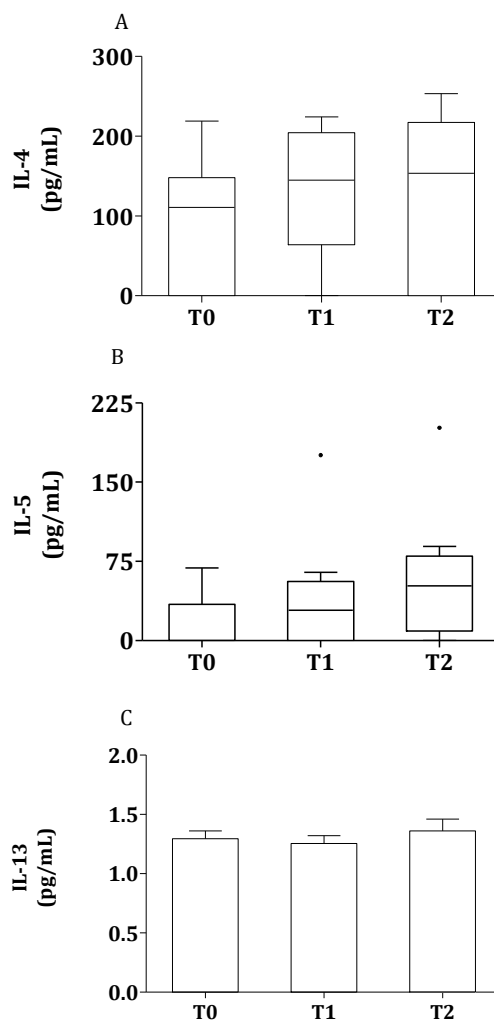


Figura 76: Quantificação de algumas citocinas do perfil Th2, nomeadamente a IL-4 (A), a IL-5 (B) e a IL-13 (C) nos doentes com linfoma difuso de grandes células B, nos tempos T0, T1 e T2. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3). Os *outliers* estão representados por •.

Ainda no que respeita às moléculas de perfil Th2 não se observaram diferenças significativas na IL-4 e na IL-13 entre os doentes com cancro do pulmão e os doentes com linfoma difuso de grandes células B nos diferentes momentos do estudo.

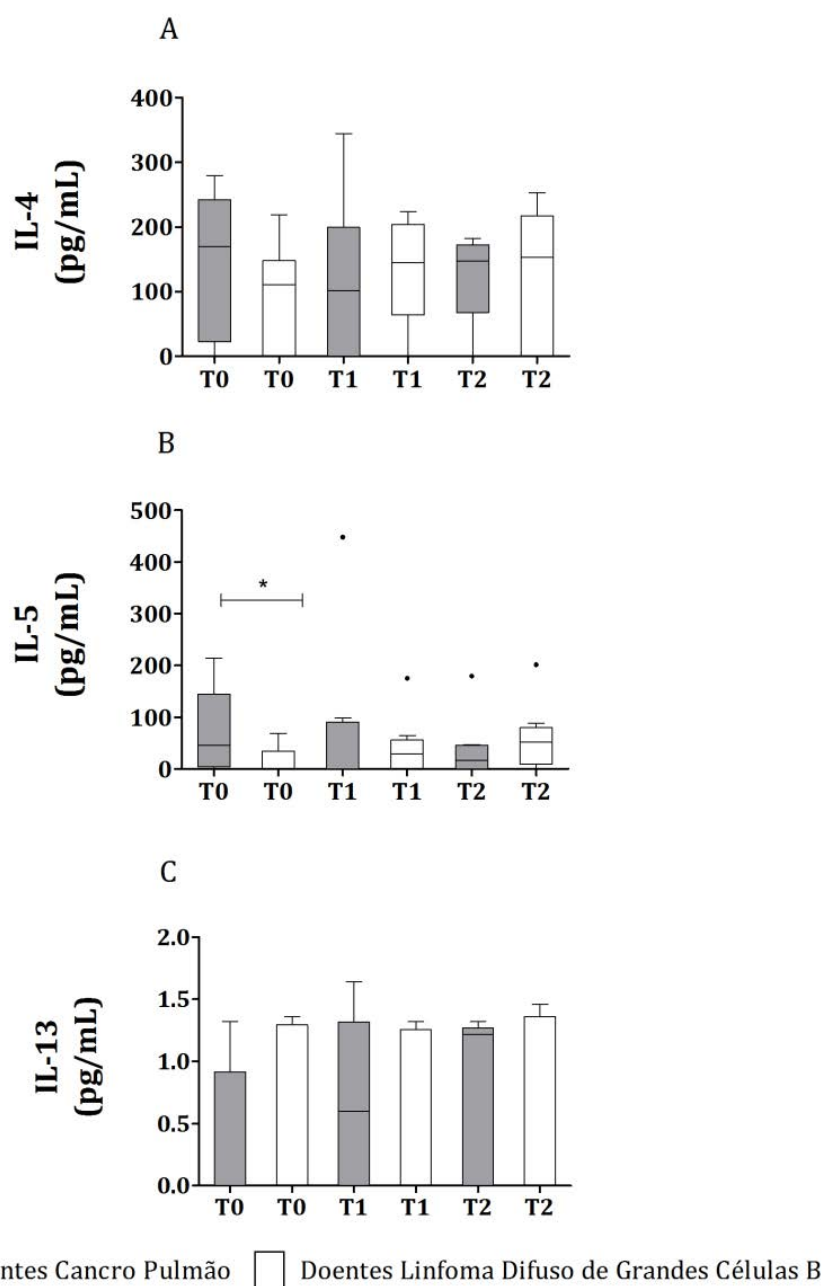


Figura 77: Comparação das citocinas e de moléculas do perfil Th2, nomeadamente a IL-4 (A), a IL-5 (B) e a IL-13 (C) no sangue periférico dos doentes com cancro do pulmão e dos doentes com linfoma difuso de grandes células B nos tempos T0, T1 e T2. Os resultados encontram-se expressos em pg/ml e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3). Os *outliers* estão representados por •. As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$.

Nos doentes com cancro do pulmão, relativamente às quimiocinas relacionadas com os monócitos, nomeadamente a CCL2, a CCL3, a CCL4, a CCL5, a CXCL1, a CXCL8 e a CXCL10 os resultados obtidos estão representados na Figura 78 e não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes momentos do estudo.

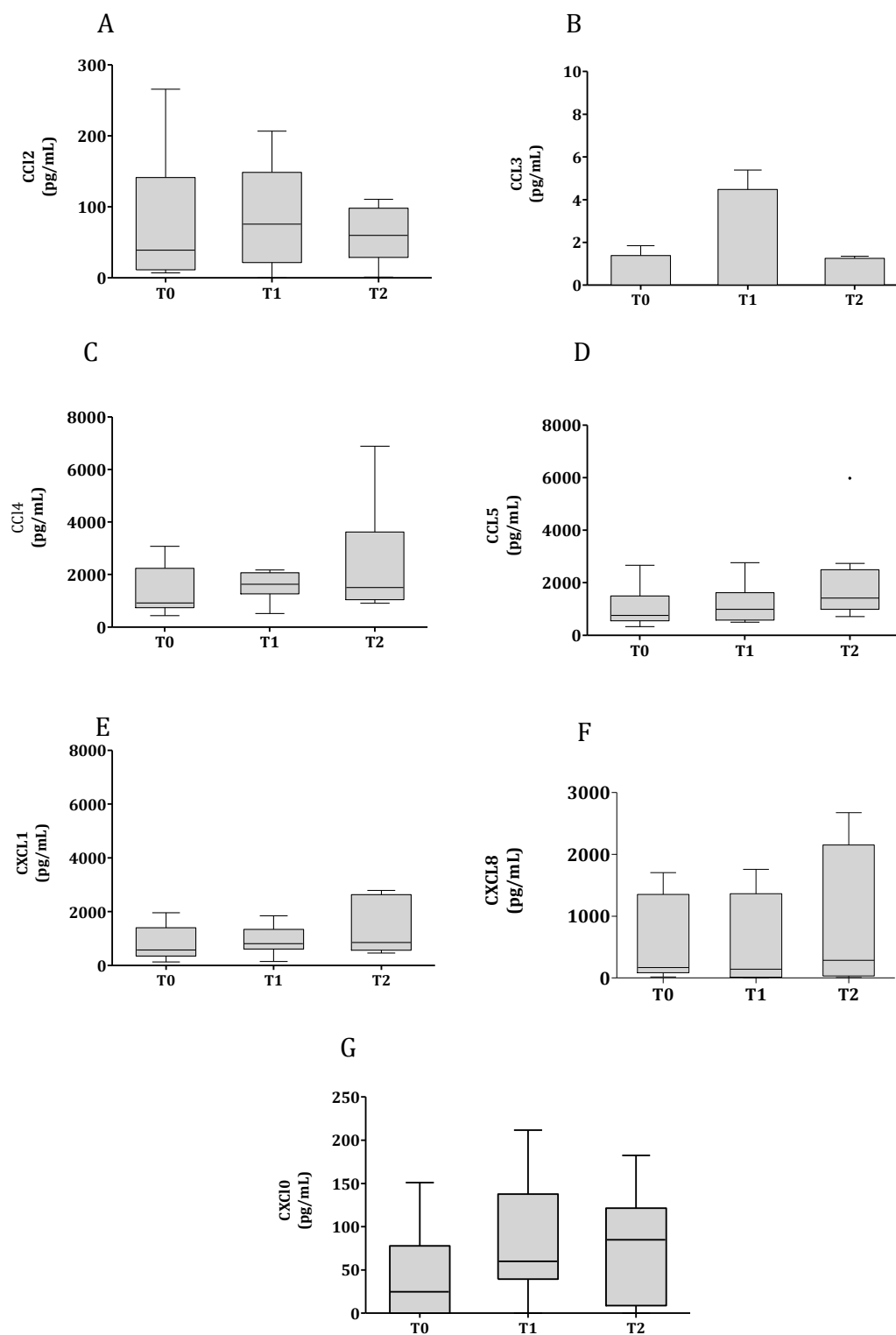


Figura 78: Quantificação das quimiocinas relacionadas com os monócitos nos doentes com cancro do pulmão, nomeadamente a CCL 2 (A), a CCL 3 (B), a CCL4 (C), a CCL4 (D), a CXCL 1 (E), a CXCL8 (F) e a CXCL10 (G) nos tempos T0, T1 e T2. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3). Os *outliers* estão representados por •.

Nos doentes com linfoma difuso de grandes células B, relativamente às quimiocinas relacionadas com os monócitos, nomeadamente a CCL2, a CCL3, a CCL4, a CCL5, a CXCL1, a CXCL8 e a CXCL10 os resultados obtidos estão representados na Figura 79. Verificou-se que a expressão de CCL2, que aumentou de T0, onde se obteve uma mediana de 83,21 pg/mL e uma amplitude interquartil de 43,82 pg/mL, para T2, onde se obteve uma mediana de 89,89 pg/mL e uma amplitude interquartil de 216,80 pg/mL ($p=0,021$), como se pode verificar na Figura 79A. Contudo, não se observaram diferenças significativas entre os dois momentos referidos e o momento T1 onde se obteve uma mediana de 63,73 pg/mL e uma amplitude interquartil de 85,12 pg/mL.

No que respeita às quimiocinas CCL3, a CCL4, a CCL5, a CXCL1, a CXCL8 e a CXCL10 não se observaram diferenças significativas entre os diferentes momentos do estudo.

No caso da molécula CCL5, observou-se que, no momento T1, os doentes com cancro do pulmão apresentaram valor inferior, com uma mediana de 574,83 pg/mL e uma amplitude interquartil de 867,11 pg/mL, do que os doentes com linfoma difuso de grandes células B, que apresentaram uma mediana de 1687,71 pg/mL com uma amplitude interquartil de 2175,50 pg/mL ($p=0,04$), como se pode verificar na Figura 80D. No entanto, não se observaram diferenças significativas no momento T0 nem no momento T2. Não se observaram diferenças significativas no nível de CCL2, de CCL3, de CCL4, de CXCL1, de CXCL8 e de CXCL10 entre as duas patologias nos diferentes momentos.

A quantificação da expressão da quimiocina CCL11 dos doentes com cancro do pulmão está representada na Figura 81 e não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos diferentes momentos do estudo.

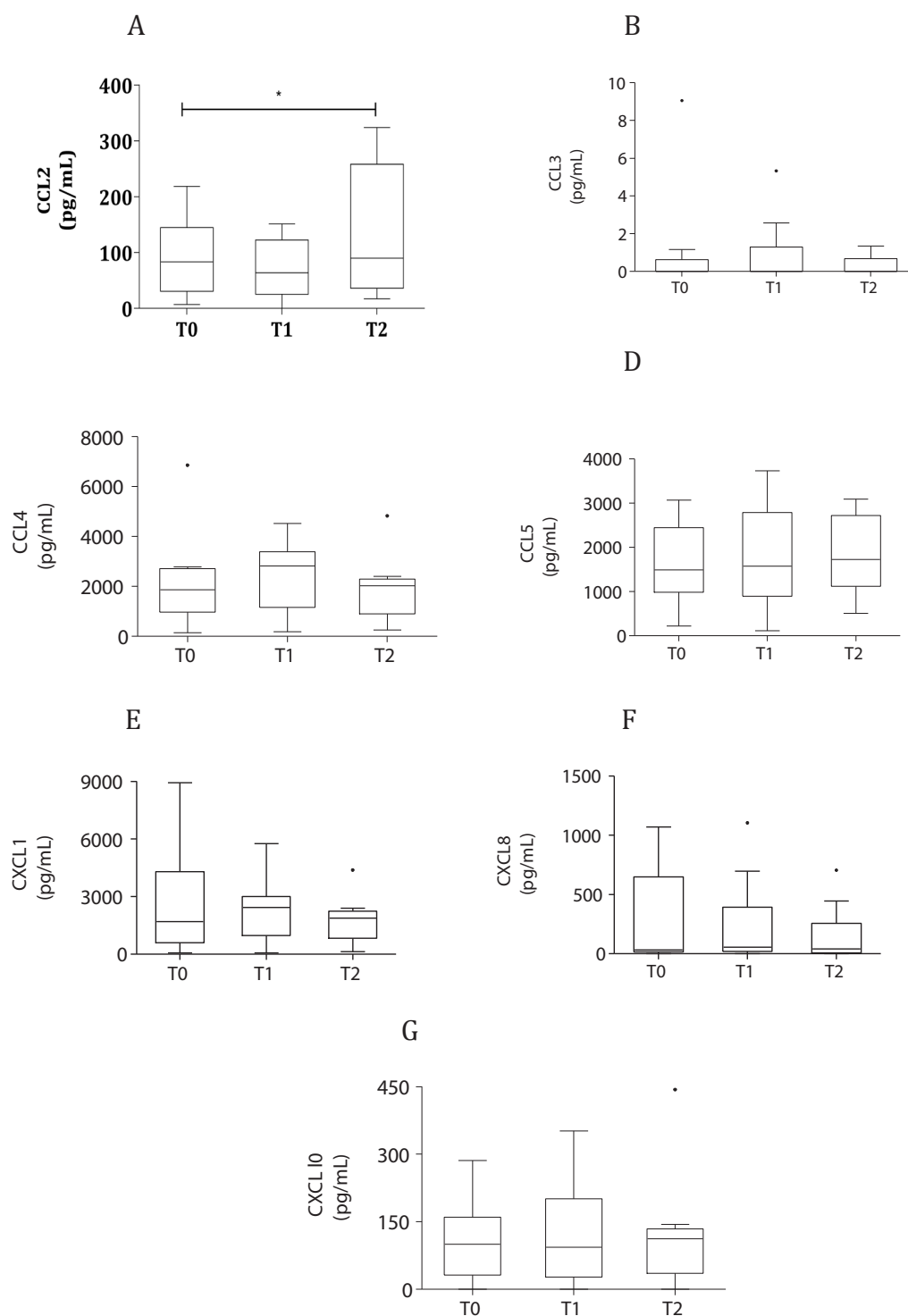


Figura 79: Quantificação das quimiocinas relacionadas com os monócitos nos doentes com linfoma difuso de grandes células B, nomeadamente a CCL 2 (A), a CCL 3 (B), a CCL4 (C), a CCL4 (D), a CXCL 1 (E), a CXCL8 (F) e a CXCL10 (G) nos tempos T0, T1 e T2. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3). Os outliers estão representados por •. As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$.

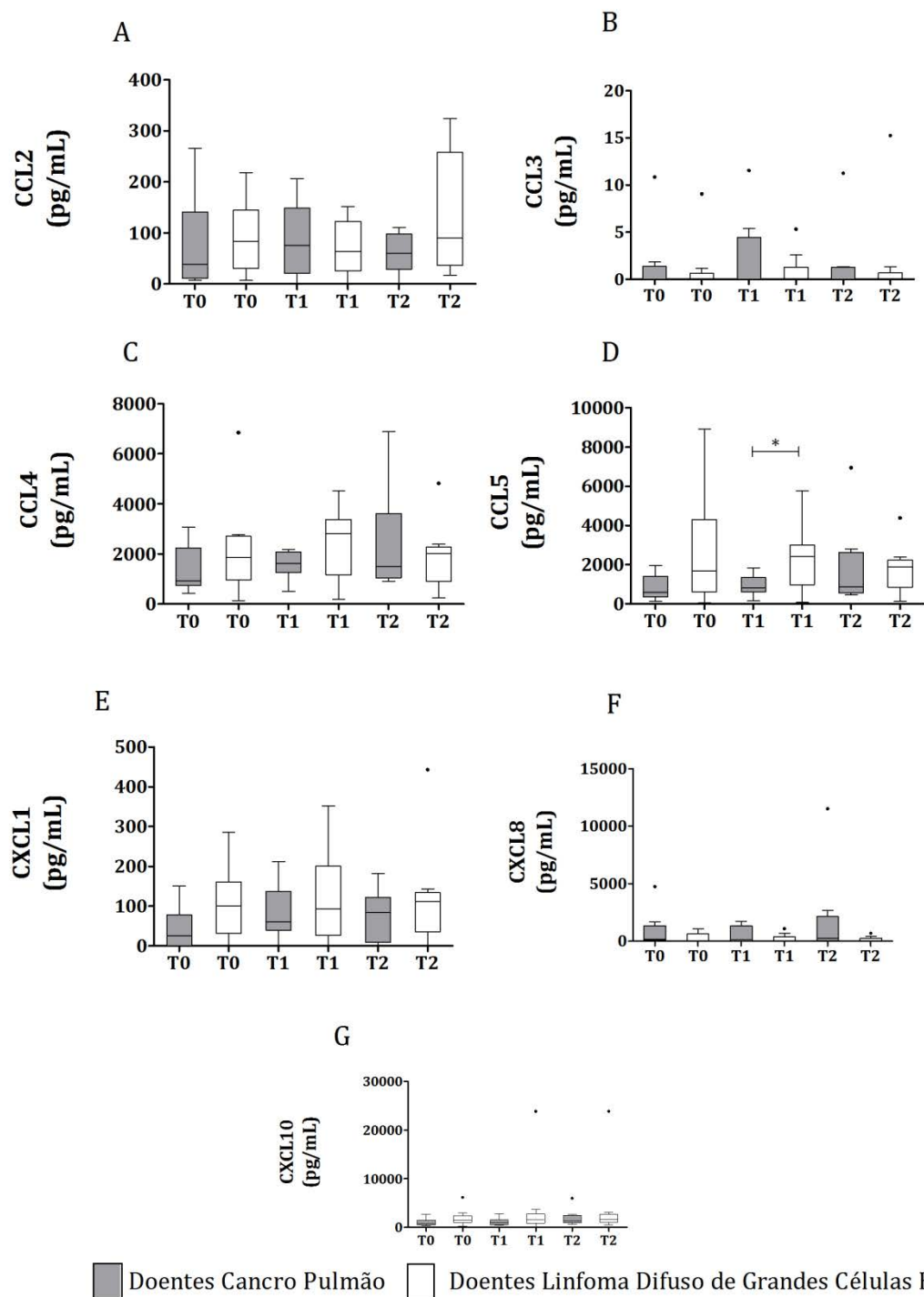


Figura 80: Comparação das quimiocinas relacionadas com os monócitos nomeadas a CCL 2 (A), a CCL 3 (B), a CCL4 (C), a CCL4 (D), a CXCL 1 (E), a CXCL8 (F) e a CXCL10 (G) nos tempos T0, T1 e T2 entre os doentes com cancro do pulmão e os doentes com linfoma difuso de grandes células B. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3). Os outliers estão representados por •. As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$.

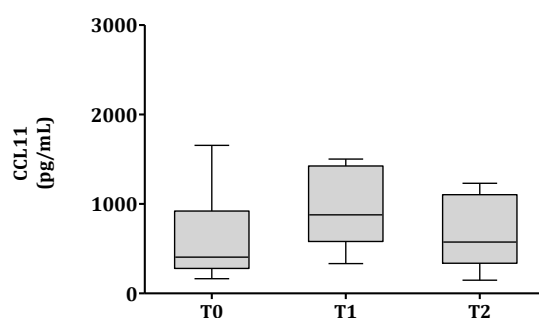


Figura 81: Quantificação da quimiocina CCL11 nos oito doentes com cancro do pulmão, nos momentos T0, T1 e T2, recorrendo ao ensaio *ProcartaPlex™ immunoassay*. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3).

Relativamente à expressão da quimiocina CCL11 dos doentes com linfoma representada na Figura 82 não se observaram diferenças significativas.

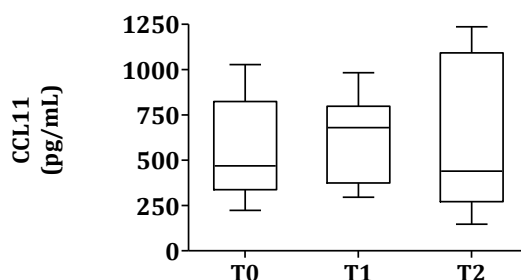


Figura 82: Quantificação da quimiocina CCL11 nos nove doentes com linfoma difuso de grandes células B, nos momentos T0, T1 e T2, recorrendo ao ensaio *ProcartaPlex™ immunoassay*. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3).

No que respeita à quimiocina CCL11 não se observaram diferenças significativas entre as duas patologias, como se pode verificar na Figura 83.

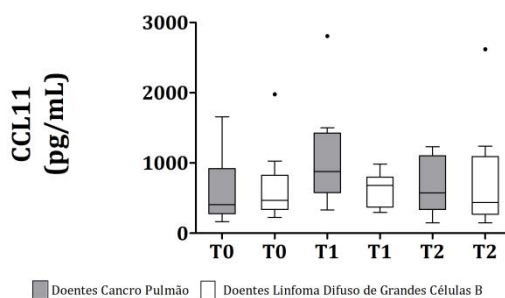


Figura 83: Comparação da quantificação da quimiocina CCL11 entre os doentes com cancro do pulmão e os doentes com linfoma difuso de grandes células B, nos momentos T0, T1 e T2, recorrendo ao ensaio *ProcartaPlex™ immunoassay*. Os resultados estão expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3). Os *outliers* estão representados por •.

No que concerne à quantificação da expressão da quimiocina CXCL12 dos doentes com cancro do pulmão está representada na Figura 84 e não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos diferentes momentos do estudo.

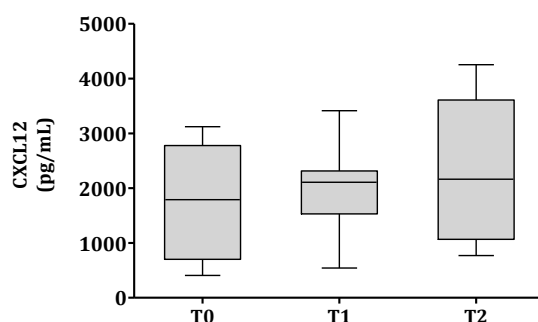


Figura 84: Quantificação da quimiocina CXCL12 nos oito doentes com cancro do pulmão, nos momentos T0, T1 e T2, recorrendo ao ensaio *ProcartaPlex™ immunoassay*. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3).

A quantificação da expressão da quimiocina CXCL12 dos doentes com linfoma difuso de grandes células B está representada na Figura 85 e não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos diferentes momentos do estudo.

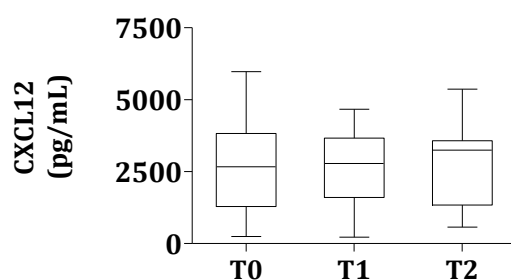


Figura 85: Quantificação da quimiocina CXCL12 nos nove doentes com linfoma difuso de grandes células B, nos momentos T0, T1 e T2, recorrendo ao ensaio *ProcartaPlex™ immunoassay*. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3).

No que respeita à quimiocina CXCL12 não se observaram diferenças significativas entre as duas patologias, como se pode verificar na Figura 86.

Relativamente à quantificação da expressão da IL-1RA dos doentes com cancro do pulmão está representada na Figura 87 e não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos diferentes momentos do estudo.

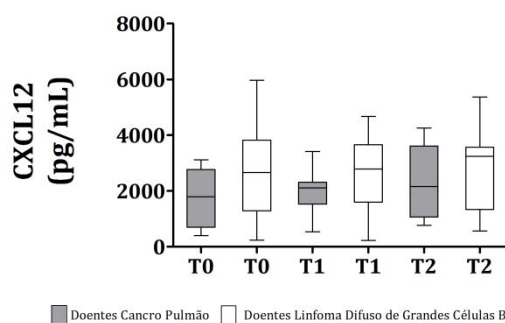


Figura 86: Comparação da quantificação da quimiocina CXCL12 entre os oito doentes com cancro do pulmão e os nove doentes com linfoma difuso de grandes células B, nos momentos T0, T1 e T2, recorrendo ao ensaio *ProcartaPlex™ immunoassay*. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3).

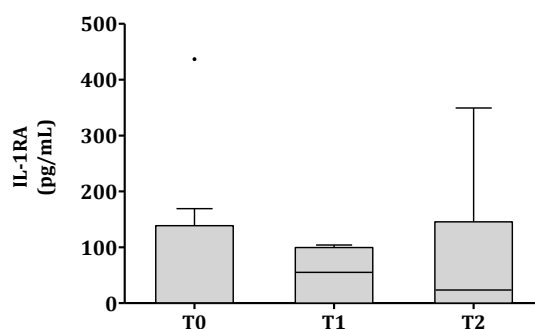


Figura 87: Quantificação da IL-1RA nos oito doentes com cancro do pulmão, nos momentos T0, T1 e T2, recorrendo ao ensaio *ProcartaPlex™ immunoassay*. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3). Os outliers estão representados por •.

A quantificação da expressão da IL-1RA dos doentes com linfoma difuso de grandes células B está representada na Figura 88 e não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos diferentes momentos do estudo.

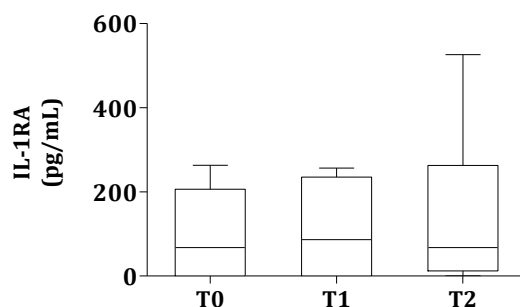


Figura 88: Quantificação da IL-1RA nos nove doentes com linfoma difuso de grandes células B, nos momentos T0, T1 e T2, recorrendo ao ensaio *ProcartaPlex™ immunoassay*. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3).

No que respeita à IL-1RA não se observaram diferenças significativas entre as duas patologias, como se pode verificar na Figura 89.

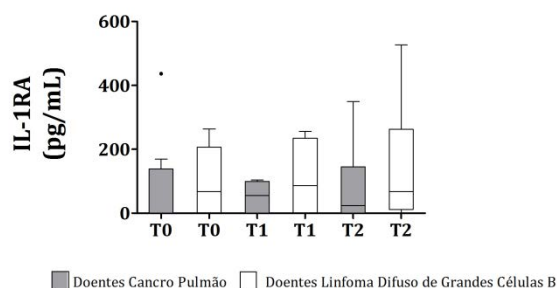


Figura 89: Comparação da quantificação da IL-1RA entre os oito doentes com cancro do pulmão e os nove doentes com linfoma difuso de grandes células B, nos momentos T0, T1 e T2, recorrendo ao ensaio *ProcartaPlex™ immunoassay*. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3). Os *outliers* estão representados por •.

Nos doentes com cancro do pulmão, para a quantificação da IL-27, no momento T0 obteve-se uma mediana de 0,00 pg/mL e uma amplitude interquartil de 3,16 pg/mL, inferior à do momento T1, onde se obteve uma mediana de 22,52 pg/mL com uma amplitude interquartil de 29,27 pg/mL ($p=0,024$), como se pode observar na Figura 90. Contudo, não se observaram diferenças significativas entre estes momentos e o momento T2 em que se obteve uma mediana de 0,00 pg/mL com uma amplitude interquartil de 12,64 pg/mL.

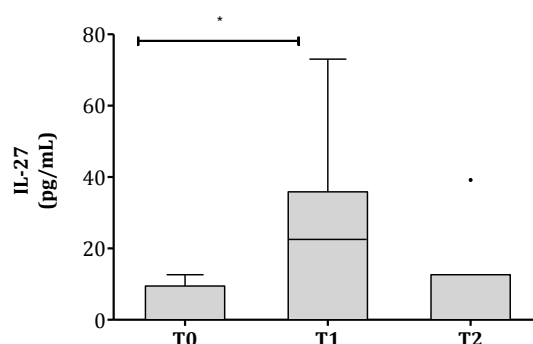


Figura 90: Quantificação da IL-27 nos oito doentes com cancro do pulmão, nos momentos T0, T1 e T2, recorrendo ao ensaio *ProcartaPlex™ immunoassay*. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3). As diferenças significativas estão representadas com * para $p<0,05$. Os *outliers* estão representados por •.

A quantificação da expressão de IL-27 dos doentes com linfoma difuso de grandes células B está representada na Figura 91 e não se observaram diferenças

estatisticamente significativas nos diferentes momentos do estudo.

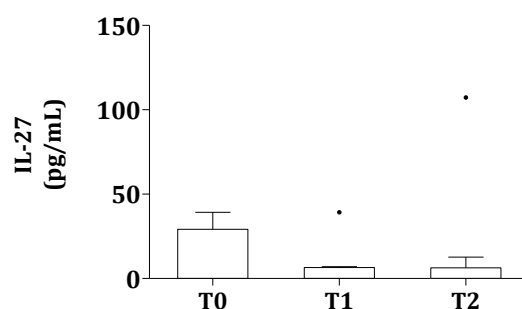


Figura 91: Quantificação da IL-27 nos nove doentes com linfoma difuso de grandes células B, nos momentos T0, T1 e T2, recorrendo ao ensaio *ProcartaPlex™ immunoassay*. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3). Os *outliers* estão representados por •.

No que respeita à IL-27 não se observaram diferenças significativas entre as duas patologias (Figura 92).

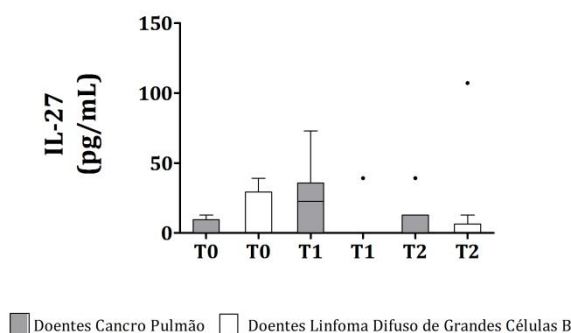


Figura 92: Comparação da quantificação da IL-27 entre os oito doentes com cancro do pulmão e os nove doentes com linfoma difuso de grandes células B, nos momentos T0, T1 e T2, recorrendo ao ensaio *ProcartaPlex™ immunoassay*. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3). Os *outliers* estão representados por •.

Nos doentes com cancro do pulmão observou-se um aumento significativo na expressão da IL-7 de T0, onde se obteve uma mediana de 9,55 pg/mL com uma amplitude interquartil de 28,09 pg/mL, para T1, onde se observou uma mediana de 108,0 pg/mL com uma amplitude interquartil de 126,59 pg/mL ($p=0,017$), e uma diminuição significativa para T2, em que se observou uma mediana de 32,48 pg/mL com uma amplitude interquartil de 71,93 pg/mL ($p=0,006$) como se pode observar na Figura 93. No entanto, não se observaram diferenças significativas entre o momento T0 e o momento T2.

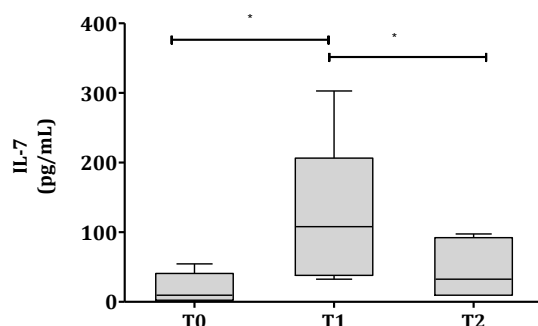


Figura 93: Determinação dos níveis de IL-7 nos oito doentes com cancro do pulmão, nos momentos T0, T1 e T2, recorrendo ao ensaio ProcartaPlex™ Immunoassay. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3). As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$.

A expressão de IL-7 nos doentes com linfoma difuso de grandes células B está representada na Figura 94 e não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os momentos em estudo.

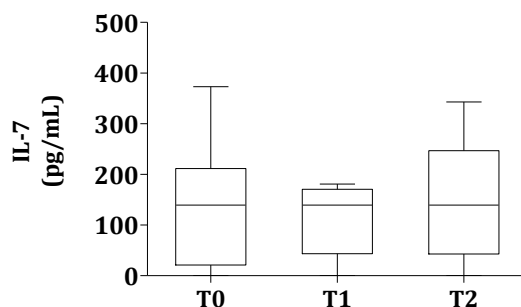


Figura 94: Determinação dos níveis de IL-7 nos nove doentes com linfoma difuso de grandes células B. Avaliado em três momentos diferentes T0, T1 e T2. Recorrendo ao ensaio ProcartaPlex™ immunoassay. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3).

Na análise da expressão da IL-7, foi possível verificar que os doentes com cancro do pulmão, no momento T0 apresentaram valores significativamente inferiores, quando comparados com os verificados nos doentes com linfoma difuso de grandes células B, onde se observou uma mediana de 139,45 pg/mL com uma amplitude interquartil de 168,90 pg/mL ($p = 0,029$), como se pode verificar na Figura 95. Não se observaram diferenças com significado no momento T1 e no momento T2.

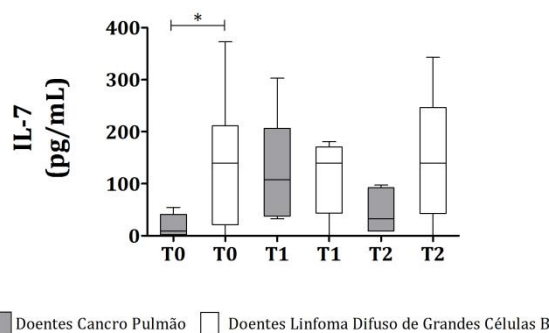


Figura 95: Comparação da quantificação da IL-7 entre os oito doentes com cancro do pulmão e os nove doentes com linfoma difuso de grandes células B, nos momentos T0, T1 e T2, recorrendo ao ensaio *ProcartaPlex™ Immunoassay*. Os resultados encontram-se expressos em pg/mL e representam a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3). As diferenças significativas estão representadas com * para $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

A contribuição do sistema imune é crítica na resposta às diferentes abordagens terapêuticas anticancerígenas. A radioterapia pode induzir vários tipos de morte das células tumorais. Dos resultados obtidos nos estudos *in vitro* realizados neste trabalho, observou-se uma inibição da proliferação celular dependente da dose, do tempo e da linha celular, em que a apoptose, tipo de morte suficientemente imunogénica para induzir uma resposta imunitária, prevaleceu. Paralelamente observou-se necrose nas linhas celulares de cancro do pulmão de não pequenas células e na linha celular de linfoma difuso de grandes células B após exposição às doses de radiação ionizante mais elevadas (30 e 60Gy). A irradiação determinou o bloqueio do ciclo celular na fase S ou na fase G₂/M, de forma que se relacionou com a expressão da proteína P53.

A morte de células tumorais está associada à libertação de antígenos derivados do tumor, bem como de sinais de perigo, referidos na literatura anglo-saxónica como *danger signals*, que desencadeiam a resposta imunitária antitumoral (Ma *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2011a). A apoptose pode induzir a expressão de padrões moleculares associados ao dano (DAMP, do inglês *damage-associated molecular*

patterns) na membrana plasmática ou segregados para o meio extracelular (Ma *et al.*, 2011c). Estas moléculas incluem um vasto número de proteínas tais como a proteína B1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1, do inglês *high mobility group protein B1*) e proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock proteins*) que podem estimular a produção de IL-1. Sabe-se que diversos tipos de stresse, como é o caso dos efeitos da radiação, resultam em acumulação de HSP (Garg *et al.*, 2010, 2012; Krysko *et al.*, 2013; Krysko *et al.*, 2011, 2012; Meyer & Silva, 1999). A HMGB1 atua como agente quimiotático e como fator de ativação de macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. A exposição de antígenos por células apresentadoras culmina em resposta imunitária específica contra o tumor (Ma *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2011a).

O mecanismo de vigilância imunológica no cancro é complexo. As células do sistema imunitário, nomeadamente as células T citotóxicas (CD8⁺) em conjunto com outras células efectoras, tais como as células *Natural Killer*, são fundamentais no controlo das células tumorais. No entanto, a vigilância diminui com a progressão da doença, com o aumento da tolerância imunológica, ou seja, com a diminuição da resposta do sistema imunológico a antígenos específicos. Neste contexto, alterações da expressão dos antígenos tumorais também podem induzir a tolerância pelo sistema imune. Desta forma, as células tumorais adquirem vantagem clonal e o tumor adquire capacidade de evasão (Domagala-kulawik *et al.*, 2014).

No presente estudo analisou-se o leucograma de doentes com cancro do pulmão e de doentes com linfoma difuso de grandes células B imediatamente antes do início da radioterapia (T0), a meio do tratamento (T1) e trinta dias após o fim do tratamento (T2). Nos doentes do cancro do pulmão destacou-se a diminuição significativa do valor absoluto dos leucócitos a meio do tratamento (T1) e a recuperação após o seu término (T2). Além disto, observou-se uma diminuição do número total de linfócitos (Figura 68). Como se sabe, as células vivas apresentam sensibilidades diferentes à radiação ionizante, comportamento que reflete a Lei Bergonie-Tribondeau (Makidono & Ito, 1997). Uma vez que os precursores das células sanguíneas estão em constante regeneração, e portanto apresentam uma radiosensibilidade aumentada, pode ocorrer uma leucopenia que justifica a diminuição observada a meio do tratamento (Jeremic, 2005; Formenti & Demaria, 2009). No que respeita aos monócitos, verificou-se um aumento destas células após

o tratamento, em relação ao tempo médio. De facto, num estudo recente que avaliou o efeito da radiação um mês após o tratamento também se verificou um aumento destas células (Heylmann *et al*, 2014).

No caso dos doentes com linfoma difuso de grandes células B não se observaram alterações significativas no leucograma antes, durante e após a radioterapia (Figura 69). De facto, ainda antes da radioterapia (T0) observaram-se valores significativamente superiores de leucócitos e de linfócitos totais nos doentes com cancro do pulmão (Figura 70). Esta diferença pode estar relacionada com as características que são inerentes a cada um destes tumores, um tumor sólido, o cancro do pulmão, e um hematopoético, nomeadamente no que concerne à angiogénese, hipoxia e localização.

As diferenças observadas entre as patologias podem estar relacionadas com as diferentes abordagens terapêuticas, prévias à radioterapia, indicadas para cada caso (Tabela 17 e Tabela 18). Todos os doentes com cancro do pulmão fizeram quimioterapia e no caso dos doentes com linfoma difuso de grandes células B é de considerar as alterações que a terapêutica com R-CHOP introduz no sistema sanguíneo.

Ainda no grupo de doentes com cancro do pulmão observou-se uma diminuição da frequência relativa de células B a meio do tratamento (T1) e a recuperação após o seu término (T2) (em relação à avaliação imediatamente antes do início da radioterapia) (Tabela 19). Num estudo recente Heylman e colaboradores obtiveram resultados sobreponíveis e descreveram na sua publicação que as *stem cells*, células T *helper*, células T citotóxicas, monócitos, neutrófilos e mais pronunciadamente as células B apresentam um fenótipo mais sensível à radiação (Heylmann *et al*, 2014). No que respeita à (doentes com cancro do pulmão) frequência relativa das células *Natural Killer* observou-se progressão semelhante, ou seja, uma diminuição significativa a meio do tratamento (T1) com recuperação para valores similares aos anteriores ao tratamento (T0) um mês após o mesmo (T2). Esta diminuição da frequência relativa, ainda que sem significado, das células *Natural Killer* no sangue periférico durante a radioterapia (T1) pode refletir o seu recrutamento ao tumor, devido à morte celular (Tabela 19)(Heylmann *et al*, 2014).

Os doentes com linfoma difuso de grandes células B apresentaram ao longo do

estudo valores diminuídos de células B em relação aos doentes com cancro do pulmão (Figura 71). O papel das células B no cancro e os mecanismos subjacentes continuam a ser explorados. Num estudo de Yang *et al.* foi demonstrado que as células B associadas a tumores com o gene *STAT3* ativado parecem contribuir para o desenvolvimento de tumores através da promoção da angiogénese tumoral (Yang *et al.*, 2013). As células B, com ou sem expressão do gene *STAT3*, proporcionam efeitos opostos sobre o crescimento tumoral e sobre a angiogénese. Outros ensaios *in vivo* mostraram que a produção de novos vasos sanguíneos no tumor pode ser mediada por células B, de forma dependente da indução da expressão do gene com função pró-angiogénica. Assim, é possível definir uma nova função para as células B, nomeadamente, a indução da progressão do tumor através de angiogénese. A identificação da ativação do gene *STAT3* nas células B pode constituir um potencial alvo para tratamento com base na terapia anti-angiogénica (Yang *et al.*, 2013). Por sua vez, os tumores hematopoéticos não precisam de promover angiogénese, que constitui um requisito para o crescimento sustentado e proliferação dos tumores sólidos (Marín-Ramos *et al.*, 2015).

Outra diferença observada entre as duas patologias, no que concerne à caracterização do sistema imunológico, refere-se às células *Natural Killer* que apresentaram valores absolutos superiores no cancro do pulmão um mês após o tratamento (T2), este facto pode refletir não só a maior radioresistência destas células, como no caso do cancro do pulmão, um tumor sólido, deixar de existir o recrutamento ao local do tumor destas células, aumentando assim na circulação periférica, refletindo ainda o observado no momento T0 para as duas patologias (Heylmann *et al.*, 2014).

Existem vários mecanismos de resposta imune antitumoral. As células T reguladoras destacam-se como fulcrais na regulação da resposta imunitária, tanto no microambiente do tumor, bem como no seu meio envolvente. Estas células estão relacionadas com a manutenção da tolerância imune periférica através de mecanismos de interação célula a célula e indução da libertação de diferentes citocinas, tais como as interleucinas (4 e 10, principalmente), e o fator de crescimento transformador β (TGF- β , do inglês *transforming growth factor β*). Estes sinais promovem a expressão de ectonucleotidases extracelulares, responsáveis

pela metabolização de nucleótidos tais como trifosfato de adenosina em locais onde ocorre a lesão, para produção de adenosina. A adenosina é fundamental na proteção de tecidos normais de lesão durante o processo de inflamação.

Dos diferentes subtipos de células T reguladoras, as células CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ que migram do timo como células T maduras totalmente funcionais, com função de supressão, são reconhecidas como um dos principais mecanismos de evasão tumoral ao sistema imunitário. O fator de transcrição Foxp3 atua como um *switch* na regulação e desenvolvimento de células T reguladoras CD4⁺, sendo que células T CD4⁺CD25^{hi} e células T Foxp3-transduced apresentam elevada atividade supressora (Kachikwu et al, 2011). A caracterização das células T reguladoras evidenciou as diferenças estatisticamente significativas nas células T reguladoras induzidas (CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺; Tabela 21 e Tabela 22). No que respeita aos doentes com linfoma difuso de grandes células B verificou-se uma alteração significativa das células T reguladoras entre os três momentos em estudo, verificando-se um aumento da frequência relativa a meio do tratamento (T1) (em relação à avaliação imediatamente antes do início da radioterapia) e uma diminuição após o seu término (T2) (Tabela 22). Este evento sugere a regulação do processo de inflamação durante o tratamento com radioterapia pelo recrutamento destas células ao local irradiado. Após diminuição ou eliminação do processo inflamatório as células retomam a valores similares aos basais. (Głowala-Kosińska et al, 2013)(Kachikwu et al, 2011; Liston & Gray, 2014).

A radiação ionizante promove a ativação de vários fatores de transcrição que modulam a expressão de diversos mediadores nas células tumorais, células do microambiente e do sistema imune podendo, assim, promover ou inibir o desenvolvimento do cancro (Multhoff & Radons, 2012). As células do sistema imunitário produzem mediadores solúveis, tais como metabolitos do ácido araquidónico, citocinas e quimiocinas que exercem a sua função através do recrutamento de células do sistema imunológico, de modo a induzir por exemplo a produção de mais espécies reativas.

As espécies reativas constituem mediadores-chave que podem ativar cascatas de transdução de sinais, bem como levar a alterações nos níveis de fatores de transcrição, como por exemplo o NF-κB, a STAT3, o HIF1-α, a AP-1, o *nuclear factor*

of activated T cells (NFAT) e o *NF-E2 related factor-2* (Nrf2). Existem vários processos descritos em resposta ao stresse oxidativo induzido pelo processo inflamatório, dos quais se destacam indução da ciclooxigenase-2 (COX-2), da óxido nítrico sintase induzível (iNOS, do inglês *inducible nitric oxide synthase*), da expressão aberrante de citocinas inflamatórias tais como a IL-1, a IL-6 e o TNF e de quimiocinas como o IL-8 e o recetor 4 de quimiocinas CXC (CXCR4, do inglês *CXC chemokine receptor 4*). Este microambiente inflamatório pode levar à formação de um ciclo de lesão de tecidos vizinhos e das células do estroma, e caso este microambiente se prolongue por um longo período de tempo, promover a carcinogénese, sendo esta inflamação crónica e persistente uma das marcas do cancro (Hanahan & Weinberg, 2011; Simone Reuter *et al*, 2011).

Para maior facilidade de interpretação das diferentes citocinas e quimiocinas estas foram agrupadas neste estudo em citocinas e moléculas de perfil Th1 (a IL-2, o INF- γ , o TNF- α , a IL-1 β a IL-18 e a IL-6), citocinas de perfil Th2 (a IL-4, a IL-5 e a IL-13), quimiocinas relacionadas com os monócitos (a CCL2, a CCL3, a CCL5, a CXCL1, a CXCL8 e a CXCL10).

A resposta imunitária, particularmente do tipo Th1 (tipo citotóxica) é um dos fatores de prognóstico mais importantes em termos de período de sobrevivência global livre de doença, em todas as fases da patologia. Dependendo de diferentes modelos, o seu efeito antitumoral depende de interferão- γ ou da capacidade citolítica (perforina, granzima, TRAIL, TNF- α , entre outros). A indução de imunidade Th1, específica contra o tumor, é crucial para a indução de células citotóxicas específicas. A terapia de radiação local juntamente com a resposta celular do tipo Th1 pode aumentar o recrutamento destas células ao tumor e ter impacto ao nível de metástases à distância (Friedman, 2002).

Nos doentes com cancro do pulmão não se observaram diferenças nas citocinas e moléculas do grupo do perfil Th1 (Figura 72). No entanto, nos doentes com linfoma difuso de grandes células B (Figura 73), observou-se um aumento do INF- γ a meio do tratamento (T0) e trinta dias após o seu término (T2), em relação ao momento imediatamente antes ao início da radioterapia (T0). Sabe-se que o INF- γ potencia a expressão de MHC-I pelas células tumorais, mantém e prolonga os efeitos iniciais da radiação e permite o reconhecimento e eliminação eficaz pelas células T. Para além

disso, células T efetoras podem ser recrutadas para o tumor devido à existência de um gradiente de quimiocinas. Este processo é amplificado pelo aumento de expressão de VCAM-1 no endotélio do tumor, que é mediado pelo INF- γ produzido pelas células T. Todos os doentes com linfoma difuso de grandes células B realizaram IFRT, portanto a irradiação dos nódulos pode induzir a produção de INF- γ pelas células T presentes (Formenti & Demaria, 2009). Além disto, a apoptose e inflamação inerente à terapêutica com R-CHOP pode também contribuir para o aumento da produção de IFN- γ .

As citocinas pró-inflamatórias atuam como potentes fatores na indução e suporte da angiogênese, característica dos tumores sólidos. As citocinas IL-1 e TNF- α são geradas pelos macrófagos imediatamente após a existência de um estímulo inflamatório, desempenhando um papel de grande importância no processo de angiogênese. Estes estímulos inflamatórios induzem a expressão de genes pró-inflamatórios em diversas células do estroma e células inflamatórias. Este processo leva a uma cascata de citocinas e moléculas efetoras de pequenas dimensões ao nível local, iniciando, propagando e mantendo a inflamação. A IL-1 e o TNF- α induzem o aumento da expressão de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais, promovendo desta forma a infiltração de leucócitos provenientes da corrente sanguínea para os tecidos inflamados, como são por exemplo os tecidos tumorais irradiados expostos à radiação ionizante (Voronov *et al*, 2014).

A atividade dos interferões baseia-se na indução e regulação de mecanismos imunes inatos e adquiridos. Ao ligar-se a recetores transmembranares, o interferão interage com as células-alvo, principalmente através da ativação da via JAK/STAT, mas também outras vias de sinalização com a ativação de muitos agentes antivirais, bem como numerosas vias apoptóticas (Bandurska *et al*, 2014). O IFN- γ estimula diversas vias bioquímicas relacionadas com efeitos anti-proliferativos, nomeadamente ativando os macrófagos e outros tipos de células, como as células T contra células tumorais. O IFN- γ intervém ainda, nas vias da óxido-nítrico-sintetase, da indoleamina (2,3)-dioxigenase (enzima envolvida na degradação do aminoácido essencial triptofano) e na produção de espécies reativas de oxigénio e neptarina em macrófagos e células dendríticas (Brandacher *et al*,

2006).

As células T ativadas são recrutadas para o tumor irradiado através de um gradiente de citocinas (Vatner *et al*, 2014). As células T induzem apoptose pela via FAS ou através da libertação de grânulos citotóxicos, que libertam novos antígenos tumorais, o que pode impulsionar a resposta do sistema imunológico, e contribuir para a imunidade antitumoral adquirida (Vatner *et al*, 2014).

No presente estudo observou-se que os doentes com cancro do pulmão apresentaram valores significativamente mais elevados de moléculas de perfil Th1, imediatamente antes do início do tratamento com radioterapia (T0) em comparação com os doentes com linfoma difuso de grandes células B, nomeadamente, IL-2, INF- γ e IL-1 β (Figura 74). De um modo geral, a exposição a uma agressão celular crónica, como é o hábito tabágico, no caso dos doentes com cancro do pulmão pode justificar o estado mais pró-inflamatório. Esta diferença também pode refletir as características inerentes a cada neoplasia, sólida ou hematopoiética, bem como a amplificação da resposta imune mediada pelo interferão- γ , tal como sugerido anteriormente por Formenti e Demaria (Formenti & Demaria, 2009).

A família IL-1 é constituída por moléculas agonistas, antagonistas e respetivos recetores. As principais proteínas agonistas são a IL-1 α e a IL-1 β . O antagonista do recetor IL1, o IL-1Ra, é um inibidor fisiológico de IL-1, que se liga aos recetores IL-1 o que determina a não transmissão de sinais de ativação. A IL-1 α , a IL-1 β e a IL-1Ra são produzidas por vários tipos de células como consequência da presença de microrganismos e seus derivados, citocinas ou outros estímulos ambientais, assim como devido à presença de produtos de tecidos alvos de lesão celular (Voronov *et al*, 2014). A IL-1 β não se encontra presente em situações de homeostasia, sendo a sua expressão e secreção induzidas apenas após sinais inflamatórios. No entanto, esta interleucina foi considerada uma das principais moléculas pró-inflamatórias. Em baixas concentrações, localmente, a IL-1 β induz respostas inflamatórias limitadas, seguidas por ativação de mecanismos imunitários específicos. Por outro lado em elevadas concentrações, IL-1 β induz uma inflamação alargada acompanhada por lesão nos tecidos e supressão imunitária (Voronov *et al*, 2014).

De facto, a inflamação crónica/persistente é considerada, como referido

anteriormente, um cofator na carcinogénese do pulmão e foi associada a polimorfismos do gene da *interleucina 1 beta* (IL-1 β). Esta associação está patente no caso do cancro de pulmão (Lind *et al*, 2005). Os doentes com cancro do pulmão, por estarem expostos a um processo de inflamação crónica e persistente, devido ao hábito tabágico, podem apresentar níveis de IL-1 β mais elevados do que os doentes de linfoma difuso de grandes células B (Figura 74).

Ao mesmo tempo sabe-se que uma imunovigilância insuficiente revela-se um dos fatores mais importantes nos eventos iniciais de tumorigénese e na patogénese de doença maligna. Em fases mais tardias do desenvolvimento tumoral, o desenvolvimento de imunodeficiência é considerado como um dos principais motivos de progressão da doença e, em última análise, um dos principais motivos que conduzem à morte (Brandacher *et al*, 2006).

O sistema imune atua de forma que o seu efeito anti-proliferativo leve à inibição do crescimento de células malignas. Contudo, poderá afetar também a resposta das células T e contribuir desta forma para o desenvolvimento de imunodeficiência. A degradação acelerada de triptofano e uma produção incrementada de nepterina são processos que se observam ao longo do desenvolvimento de doença maligna. Para além disso, níveis elevados destas alterações metabólicas estão correlacionados com um mau prognóstico e associado com o desenvolvimento de problemas tais como anemia, perda de peso e comportamento depressivo nos doentes de cancro. Alguns estudos têm vindo a sugerir que imunodeficiência em doentes de cancro poderá desenvolver-se como um efeito secundário a longo prazo provocado pelos mecanismos anti-proliferativos e pró-apoptóticos induzidos pela resposta imune tipo Th1. Nestes mecanismos, a produção aumentada da citocina pró-inflamatória IFN- γ aparenta desempenhar um papel crucial (Brandacher *et al*, 2006).

No contexto da doença oncológica o balanço de citocinas Th1 e Th2 revelou que o aumento das segundas (Th2) constitui um indicador da presença de neoplasia e de progressão tumoral. As citocinas do perfil Th2 contribuem para a inibição da resposta do sistema imunitário adaptativo potenciando através da expansão de células indutoras de tolerância, como as células T reguladoras ou diminuindo a resposta das células T citotóxicas (Becker, 2006).

Tanto nos doentes com cancro do pulmão (Figura 76) como nos doentes com

linfoma difuso de grandes células B, as citocinas de perfil Th2 IL-4, IL-5 e IL-13 mantiveram-se sem diferenças significativas ao longo do estudo. No entanto, verificou-se que a concentração da IL-5, antes do início da radioterapia (T0), foi superior nos doentes com cancro do pulmão. Contudo esta diferença deixou de se observar a meio do tratamento (T1) e um mês após o seu término (T2) (Figura 77).

A IL-5 foi implicada na patogénese de diversas doenças, tais como asma, atopia, síndromes hipereosinofílicas e infeções parasíticas. Para além disso, a IL-5 parece desempenhar um papel importante na biologia do cancro. A IL-5 poderá potenciar o adenocarcinoma induzido por efusão pleural maligna, uma característica de doença em progressão. Por outro lado, alguns estudos apontam que a IL-5 facilita a vigilância imune contra o fibrossarcoma induzido por carcinogénicos e melanoma. Em doentes em estado avançado de cancro do pulmão de não pequenas células foram detetados níveis elevados de IL-5 no soro e eosinofilia excessiva, o que poderá ser indicativo da importância desta interleucina na metastização no cancro do pulmão (Zaynagetdinov *et al*, 2015).

A IL-5 foi originalmente definida, através de estudo em modelo animal, como uma citocina derivada de células T que desencadeia as células B ativadas para a diferenciação terminal em células plasmáticas secretoras de anticorpos. A IL-5 foi reconhecida como o principal fator de diferenciação e maturação de eosinófilos. A sobre expressão desta interleucina aumenta significativamente os números de eosinófilos e os níveis de anticorpos *in vivo*. Por outro lado, ratinhos com deficiência do gene funcional de IL-5 ou do recetor de IL-5 cadeia alfa (IL-5R α) exibem uma série de deficiências de desenvolvimento e funcionais nas linhagens de células B e eosinófilos. Além do transdutor de sinal de Janus cinase-ativador e da via de transcrição, as tirosina-cinases Lyn e Btk (tirosina-cinase de Bruton agamaglobulinemia) estão envolvidas, e são ainda regulados por sinais extracelulares identificados por Ras GTPase-cinase (Ras-ERK). Estes são mecanismos importantes para a proliferação celular e sobrevivência dependente de IL-5. Assim a IL-5 regula a expressão de genes envolvidos na proliferação, a sobrevivência das células e funções efetoras e maturação de células B e eosinófilos, desempenhando um papel central nas respostas imunes inatas e adquiridas e eosinofilia.

De facto, os efeitos biológicos de IL-5 encontram-se melhor caracterizados para os eosinófilos (Takatsu *et al*, 2009). A IL-5 atua ao nível dos precursores de eosinófilos e eosinófilos maduros de forma a prolongar a maturação, sobrevivência e ativação (Takatsu, 2004; Kouro & Takatsu, 2009; Takatsu *et al*, 2009).

Nos doentes com cancro do pulmão quantificação de eosinófilos manteve-se estável antes, durante e após o término da radioterapia. Contudo, nos doentes com linfoma difuso de grandes células B, observou-se ao longo do tratamento um número inferior de eosinófilos imediatamente antes do início da radioterapia (T0), ainda que sem significado estatística, seguido de recuperação do valor ao longo do estudo até à avaliação realizada trinta dias após o término do tratamento (T2) (Figura 68 e Figura 69).

As quimiocinas são uma superfamília de pequenas citocinas que são geralmente quimiotáticas para os leucócitos. As quimiocinas constituem circuitos de amplificação de respostas polarizadas do tipo Th1 e Th2. A expressão do recetor é estritamente regulada durante a diferenciação, ativação e inativação de fagócitos mononucleares e de células dendríticas (Mukaida, 2000). Alguns estudos já demonstraram que metástases pulmonares de células de cancro da mama são promovidas por uma população de macrófagos, denominados por macrófagos associados a metástase (*MAM*, do inglês metastasis-associated macrophages), que são originados por monócitos inflamatórios recrutados pela CCL2. Neste estudo verificou-se que os doentes com linfoma difuso de grandes células B diminuíram a quantidade de CCL2 de T0 para T1 com posterior recuperação para T2 com significado estatístico (Figura 79). Estudos recentes demonstraram que através da ativação de recetor de CCL2 (CCR2), os *MAM* recrutados secretam o ligando de quimiocina CCL3. A deleção genética de CCL3 ou do seu recetor CCR1 nos macrófagos induz redução do número de metástases pulmonares, bem como do número de *MAM* acumulados nos pulmões dos animais em estudo. A transferência de monócitos inflamatórios *wild type* traduz-se no aumento do número reduzido de metástases pulmonares em ratinhos transgênicos deficientes em CCL3. A deficiência em CCR1 previne assim a retenção de *MAM* nos pulmões, reduzindo as interações entre *MAM* e células tumorais. Estes estudos permitiram concluir que a ativação da cascata que é iniciada pela quimiocina CCL2 em macrófagos promove a deposição

metastática de células de cancro da mama, amplificando assim a doença, demonstrando que a inibição de CCR1 poderá ter um contributo para um maior impacto terapêutico ao nível da doença metastática com uma menor toxicidade do que se fossem bloqueados intervenientes a montante da cascata de sinalização considerada (Kitamura *et al*, 2015), o que no caso dos doentes com linfoma difuso de grandes células B poderá significar que durante o tratamento há uma diminuição da produção desta quimiocina, favorável a um melhor prognóstico.

No presente estudo observou-se que os doentes com linfoma difuso de grandes células B, apesar de entre os diferentes momentos em estudo não se verificarem diferenças com significado, quando analisada a expressão de CCL5 entre patologias, verificou-se que esta se apresentou sempre em maior quantidade (pg/ μ l) nos doentes com linfoma difuso de grandes células B, com significado estatístico no momento T1, concomitantemente nestes doentes e para T1 observou-se um aumento das células T reguladoras (CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺), correspondendo a um perfil mais imunossupressor (Figura 80 e Tabela 22).

No caso da quimiocina promotora tumoral CCL5, esta tem sido implicada em mecanismos de transformação maligna em células epiteliais da mama, em diversos estudos cujo foco se centra em cancros da mama tipo basal. Contudo, estudos recentes avaliaram quais os efeitos provocados pela deleção de CCL5 num modelo de ratinhos transgênicos MMTV-PyMT, um modelo de cancro da mama luminal. Neste estudo, foi verificado uma redução nas metástases pulmonares e nos limites do tumor primário nos animais deficientes em CCL5. Este efeito foi causado por um défice em células Th2 (células T CD4⁺IL-4⁺). Para além disso, foi postulado que CCL5 ativa a CCR3, uma quimiocina largamente expressa em células T CD4⁺, promovendo assim o aumento da expressão de Gfi1, promovendo a diferenciação de células Th2. Estas, por sua vez, potenciam a atividade pró-metastática de células mielóides associadas ao tumor. Do ponto de vista clínico, foi verificada a polarização a favor de um fenótipo Th2 imunossupressivo em doentes com cancro da mama luminal avançado (Zhang *et al*, 2015a).

Sabe-se que o elevado número de células CD14⁺ em doentes com linfoma difuso de grandes células B no estroma tumoral, permite o aumento da sobrevivência das células B. Num estudo em que Mueller *et al*, realizou a co-cultura de monócitos com

células B provenientes do sangue periférico ou células de linfoma difuso de grandes células B as células de linfoma difuso de grandes células B, as células B proliferaram após a adição de fator ativador de célula B pertencente à família TNF (BAFF, do inglês *B cell-activating factor of the TNF family*) e IL-2, potenciando a divisão celular. Também neste estudo foi demonstrado que monócitos e células dendríticas possuíam atividade anti-apoptótica similar às células B normais, contudo, os seus efeitos na proliferação das células B revelaram-se distintos. Monócitos e células CD14⁺ derivadas de cordão promoveram proliferação das células B na presença de estímulos anti-CD40, onde as células dendríticas suportam a proliferação de células B quando ativadas através do recetor de células B (BCR, do inglês *B-cell receptor*). As células dendríticas e as células CD14⁺ são capazes de induzir diferenciação de plasmócitos. Por outro lado, quando as células B são ativadas por BCR ou CD40, libertam a C-C quimiocina recetora de tipo 5 (CCL5, do inglês *chemokine (C-C motif) ligand 5*). Esta quimiocina é uma das principais quimiocinas expressas em células de linfoma difuso de grandes células B, justificando assim as diferenças observadas no nosso estudo. Resultados de vários estudos apontam para que as células de linfoma difuso de grandes células B recrutem monócitos via CCL5 de forma a garantir a sobrevivência das células B e a sua proliferação (Mueller *et al*, 2007).

As quimiocinas são uma superfamília de pequenas citocinas que são geralmente quimiotáticas para os leucócitos. As quimiocinas constituem circuitos de amplificação de respostas polarizadas do tipo Th1 e Th2 (Mukaida, 2000).

Nos doentes com cancro do pulmão as quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5, CXCL1, CXCL8 e CXCL10 mantiveram-se sem alterações significativas antes, durante e trinta dias após o término do tratamento (Figura 78). Nos doentes com linfoma difuso de grandes células B (Figura 79) verificou-se que o nível de CCL2 diminuiu durante o tratamento (T1) em relação à avaliação imediatamente antes do início do tratamento (T0), com recuperação trinta dias após a radioterapia (T2).

Sabe-se que a CCL2 é responsável pelo recrutamento dos monócitos inflamatórios que estão na origem dos macrófagos associados a metástase (MAM, do inglês *metastasis-associated macrophages*). Os MAM potenciaram metástases pulmonares de cancro da mama (Kitamura *et al*, 2015).

A ativação de recetor de CCL2 (CCR2, do inglês *CCL2 receptor*) induz a secreção

do ligando de quimiocina CCL3 pelos MAM. A deleção de CCL3 ou do seu recetor, recetor 1 da quimiocina motivo C-C (CCR1, do inglês *chemokine (C-C Motif) Receptor 1*), nos macrófagos induziu redução do número de metástases pulmonares e do número de MAM nos pulmões dos modelos animais. Adicionalmente, a transferência de monócitos inflamatórios *wild type* traduziu-se no aumento do número de metástases pulmonares em ratinhos transgênicos deficientes em CCL3. A deficiência em CCR1 preveniu a retenção de MAM nos pulmões, reduzindo as interações entre MAM e células tumorais. Estas e outras evidências permitiram concluir que a ativação da cascata que é iniciada pela quimiocina CCL2 em macrófagos promove a deposição metastática de células de cancro da mama, e que a inibição de CCR1 pode ter impacto terapêutico ao nível da doença metastática (Kitamura *et al*, 2015). No caso dos doentes com linfoma difuso de grandes células B, com estas evidências, pode colocar-se a hipótese de a diminuição da produção desta quimiocina ser favorável a um melhor prognóstico.

No que respeita à quimiocina CCL5 verificou-se que a sua concentração foi superior no sangue periférico dos doentes com linfoma difuso de grandes células B do que nos doentes com cancro do pulmão (Figura 80). Esta diferença foi significativa na avaliação durante a radioterapia (T1). De facto, nos doentes com linfoma difuso de grandes células B observou-se de modo concomitante um aumento das células T reguladoras (CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺), o que corrobora o perfil imunossupressor.

A quimiocina CCL5 foi implicada em mecanismos de transformação maligna em células epiteliais da mama, particularmente em tumores do tipo basal. Contudo, estudos recentes avaliaram os efeitos da deleção de CCL5 num modelo de ratinhos transgênicos MMTV-PyMT, um modelo de cancro da mama do tipo luminal. Verificou-se uma redução no volume do tumor primário e número de metástases pulmonares nos animais deficientes em CCL5. Este efeito foi causado por um défice em células Th2 (células T CD4⁺IL-4⁺). Para além disso, postulou-se que a CCL5 ativa a CCR3, uma quimiocina largamente expressa em células T CD4⁺, promovendo assim o aumento da expressão de Gfi1 e diferenciação de células Th2. Estas, por sua vez, potenciam a atividade pró-metastática de células mielóides associadas ao tumor. Do ponto de vista clínico, verificou-se a polarização a favor do fenótipo Th2

imunossupressivo em doentes com cancro da mama avançado do tipo luminal (Zhang *et al*, 2015a).

Sabe-se que o elevado número de células CD14⁺ em doentes com linfoma difuso de grandes células B no estroma tumoral, permite o aumento da sobrevivência das células B. Num estudo em que Mueller *et al.* realizou a co-cultura de monócitos com células B ou com células de linfoma difuso de grandes células B, observou-se proliferação após a adição do fator ativador de célula B pertencente à família TNF (BAFF, do inglês *B cell-activating factor of the TNF family*) e de ÎL-2. Neste estudo também se demonstrou que os monócitos e as células dendríticas possuem atividade anti-apoptótica similar à das células B normais. Monócitos e células derivadas de cordão CD14⁺ promoveram proliferação das células B na presença de estímulos anti-CD40, onde as células dendríticas suportam a proliferação de células B quando ativadas através do recetor de células B (BCR, do inglês *B-cell receptor*). As células dendríticas e as células CD14⁺ são capazes de induzir diferenciação de plasmócitos. Por outro lado, quando as células B são ativadas por BCR ou CD40, libertam CCL5. De facto, esta quimiocina é uma das principais quimiocinas expressas em células de linfoma difuso de grandes células B, o que justifica as diferenças observadas. Várias evidências demonstram que as células de linfoma difuso de grandes células B recrutam monócitos via CCL5 de forma a garantir a sobrevivência das células B e a sua proliferação (Mueller *et al*, 2007).

A interleucina-27 é uma citocina heterodimérica multifacetada com função pró- e anti-inflamatória e imunorreguladora. É constituída por duas subunidades, designadas por p28/IL30 e pela *Epstein Bar virus-induced protein 3* (EBI3). A subunidade EBI3 atua como um recetor- α solúvel, e a IL-27 pode assim ativar diretamente as suas células alvo através de um heterodímero da glicoproteína 130 (gp130) e WSX-1. Sendo uma citocina heterodimérica que atua através da gp130, a IL-27 pertence às famílias das citocinas IL-6 e IL-12. Esta citocina foi originalmente identificada como sendo uma citocina do tipo IL-12, tendo a capacidade de induzir a proliferação de células T CD4⁺ e induzir a produção de IFN- γ . Contudo, estudos subsequentes demonstraram que a IL-27 desempenha um papel importante nos processos de inflamação, desenvolvimento tumoral e regulação e diferenciação de células imunitárias (Aparicio-Siegmund & Garbers, 2015).

Nos doentes com cancro do pulmão observou-se um aumento da concentração de IL-27 (Figura 90) durante a radioterapia (T1) em relação à avaliação imediatamente antes do início do tratamento (T0). Esta alteração coincide com a diminuição de células T CD8⁺ (em T1) e pode refletir a influência da IL-27 no recrutamento das células citotóxicas ao do tumor, no contexto da inflamação induzida pela radioterapia.

A interleucina-7 (IL-7) é uma potente citocina anti-apoptótica que aumenta a função celular efetora das células imunes, essencial para a sobrevivência dos linfócitos (Yuan *et al*, 2014). Gao *et al* postularam que a IL-7 tem a capacidade de antagonizar com a rede imunossupressora. Por norma, esta é constituída por citocinas inibidoras, células imunossupressoras como os células T reguladores e células supressoras mioelóide-derivadas (MDSC, do inglês *myeloid-derived suppressor cells*) (Gao *et al*, 2015).

A IL-7 é essencial para o sistema imunitário adaptativo, é importante para a homeostase e para a proliferação de células T, apresenta capacidade de regulação dos nódulos linfáticos por organogénese ao controlar a *pool* de tecido linfóide indutor de células. A IL-7 ativa várias vias de sinalização intracelulares, promove a sobrevivência e proliferação de células T *naïve* e de memória, desempenha uma função na manutenção do conjunto de células T *naïve* e na sobrevivência de células T memória (Gao *et al*, 2015).

Nos doentes com cancro do pulmão a concentração de IL-7 foi significativamente superior na avaliação durante o tratamento (T1) (em relação à avaliação imediatamente antes à radioterapia, T0) e trinta dias após o término do tratamento (T2) (Figura 93). Verificou-se também que a concentração de IL-7 foi significativamente superior nos doentes com linfoma difuso de grandes células B na avaliação imediatamente antes da radioterapia em comparação com o mesmo momento nos doentes com cancro do pulmão (Figura 95). Estes resultados podem estar na dependência dos doentes com linfoma difuso de grandes células B terem tido como primeira abordagem terapêutica anterior à radioterapia (IFRT) o R-CHOP. Além disto os doentes com cancro muitas vezes encontram-se num estado de imunossupressão, com contagens de células T mais baixas (Yuan *et al*, 2014), o que também se verificou no presente estudo.

No microambiente tumoral, o infiltrado de células imunes efetoras por norma é mais baixo, sendo este infiltrado predominantemente composto de células T citotóxicas exaustas, células T *helper* (Th2) e macrófagos (M2), sendo estes dois últimos tolerantes em relação ao tumor, existindo ainda, igualmente, mais células T reguladoras e células supressoras mieloide-derivadas, com potente capacidade para inibir as respostas imunes efetoras.

A IL-7 é considerada um alvo ideal para melhorar a função do sistema imunitário. Pode reconstituir o sistema imune, melhorar a função das células T *in vivo* e antagonizar a rede imunossupressora (Gao *et al*, 2015). Esta citocina tem a capacidade de recrutar várias células efetoras, tais como células T citotóxicas, células *Natural Killer* e as células NKT para se infiltrarem nos locais tumorais. As células T CD8⁺ podem então continuar a proliferar, mesmo sob condições em que o antigénio e outras citoquinas são limitados. Simultaneamente, o aumento da infiltração de células T citotóxicas induz a produção de mais IFN- γ em alguns modelos animais e potencia a expressão de granzima B. Assim as células T memória podem persistir a longo prazo e vigiar todo o organismo para células tumorais residuais (Gao *et al*, 2015). No presente estudo, as duas patologias apresentaram comportamentos similares quanto às células T CD8⁺, uma vez que, quer em frequência relativa quer em valores absolutos, diminuíram durante a radioterapia (T1) em relação à avaliação imediatamente antes ao início do tratamento (T0), com posterior recuperação em T2 (Tabela 19 e Tabela 20).

CONCLUSÕES

Neste estudo em patologia humana avaliou-se o reflexo periférico da radioterapia no sistema imunitário de doentes com cancro do pulmão e com linfoma difuso de grandes células B, através da caracterização das diferentes populações celulares do sistema imune e da determinação de mediadores de sinalização celular no sangue.

De forma geral pode concluir-se que o estado do sistema imunitário dos doentes

no início do tratamento, bem como o tipo de tumor, contribuem para diferenças observadas na resposta do organismo ao tratamento com radioterapia.

No caso do cancro do pulmão, representativo de um tumor sólido, a irradiação foi associada a alterações a nível do leucograma, nomeadamente nos leucócitos totais, nos linfócitos e nos monócitos, ao contrário do tumor hematopoiético linfoma difuso de grandes células B. As alterações no leucograma dos doentes com cancro do pulmão estão relacionadas com a maior dose de radiação ionizante a que foram expostos, bem como ao recrutamento das células do sistema imune ao local irradiado.

Nos doentes com cancro do pulmão verificou-se que a frequência relativa das células B, os valores absolutos das células *Natural Killer* e das células *Natural Killer* citotóxicas variaram durante o tratamento, possivelmente devido à maior radiosensibilidade das células B e à maior radiorresistência e recrutamento ao tumor das células *Natural Killer*.

A terapêutica prévia com R-CHOP, no caso dos doentes com linfoma difuso de grandes células B, deverá ter condicionado o reflexo periférico antes do início da radioterapia, na medida em que estes doentes apresentaram valores inferiores de leucócitos e particularmente das células B.

A alteração no número de células T reguladoras induzidas ($CD4^+CD25^{hi}CD127^{low}Foxp3^+$) nos doentes com linfoma difuso de grandes células B sugere a necessidade de minimizar a inflamação induzida pela radiação ionizante.

Os doentes com cancro do pulmão, no início do tratamento, apresentam um perfil Th1 mais acentuado do que os doentes com linfoma difuso de grandes células B, o que se concluiu pelos níveis superiores de IL-2, de INF- γ e de IL-1 β . A maior concentração de IL-5, associada ao perfil Th2, no sangue periférico destes doentes aponta para a regulação deste ambiente inflamatório.

A irradiação dos nódulos dos doentes com linfoma difuso de grandes células B e consequente diminuição do número de células B contribui para o decréscimo da produção de citocinas e de quimiocinas como a CCL2. Associadamente, a concentração da quimiocina CCL5, também associada à polarização Th2, superior à dos doentes com cancro do pulmão corrobora a regulação do sistema imune e provável diminuição da inflamação durante o tratamento com radioterapia.

Nos doentes com cancro do pulmão, a alteração da concentração de IL-27, com função imunorreguladora, pode estar relacionada com a indução da proliferação de células T e da produção de moléculas do perfil Th1, que contribuem para a resposta imunológica.

Nos doentes com cancro do pulmão a alteração na concentração de IL-7 sugere a regulação da morte celular induzida pela radiação nas células do sistema imune. A concentração desta interleucina foi superior no início do tratamento nos doentes com linfoma difuso de grandes células B, o que se justifica pelo tratamento prévio com R-CHOP.

No futuro, a possibilidade de induzir a polarização Th1 do sistema imunológico, associada à inflamação aguda durante o tratamento, pode contribuir para aumentar a eficácia da radioterapia na prática clínica.

PARTE III – DISCUSSÃO CONCLUSIVA

A radioterapia é considerada uma das formas mais eficazes de tratamento do cancro, sendo utilizada não só em diferentes tipos como em diferentes estádios desta patologia. Uma vez que esta terapêutica não é seletiva, obriga ao planeamento prévio do volume a irradiar, de modo a depositar a dose indicada no tumor e minimizar os efeitos nos tecidos saudáveis contíguos (Laws, 2006).

A lei de Bergonie e Tribondeau demonstra que a sensibilidade das células à radiação é diretamente proporcional à sua atividade proliferativa e inversamente proporcional ao seu grau de especialização (Thariat et al, 2013; Mendes et al, 2015a). As células cancerígenas apresentam maior radiosensibilidade que as células normais, porém, as últimas não deixam de sofrer os efeitos da radiação ionizante, facto que, aliás, pode estar na génese de efeitos secundários (Mendes et al, 2015a).

A radioterapia, para além das células tumorais, afeta igualmente o microambiente tumoral. O microambiente tumoral inclui células do sistema imunitário, células endoteliais sanguíneas e linfáticas, fibroblastos e matriz extracelular. Na consequência da irradiação são produzidas várias citocinas, quimiocinas e moléculas que conduzem à participação das células do sistema imunitário na resposta ao tratamento do cancro (Mendes et al, 2016). Estas propriedades imunomoduladoras da radiação ionizante perspetivam o potencial da sinergia entre a imunoterapia e a radioterapia como abordagem integrada no tratamento do cancro.

Os sinais de perigo são iniciadores da resposta imunitária no contexto de um ambiente inflamatório (Junger, 2011; Mendes et al, 2015a). As células dendríticas são atraídas para este microambiente, onde internalizam células apoptóticas e restos necróticos e medeiam a imunidade celular específica através da apresentação de antigénios às células T (Pfreundschuh et al, 2008a; Junger, 2011).

A indução de apoptose, de necrose, da secreção de moléculas e da alteração de moléculas da superfície celulares foi amplamente demonstrada *in vitro* e *in vivo* como consequência da exposição à radiação ionizante (Formenti & Demaria, 2009; Formenti, 2010; Vatner et al, 2014). A apoptose é mediada por várias vias de sinalização que culminam na morte celular sem exposição do conteúdo intracelular. A necrose frequentemente desencadeia um processo inflamatório local, com

exposição do conteúdo citoplasmático. Estes processos podem desencadear uma resposta imune antitumoral ou desencadear um processo de inflamação que pode ser seguido por libertação de fatores que promovam a progressão tumoral (Rock & Kono, 2008). Assim, o conhecimento dos mecanismos de morte desencadeados após a exposição à radiação ionizante é de extrema importância para a determinação do resultado terapêutico.

No trabalho de investigação conducente a esta Tese, verificou-se que a radiação ionizante induziu diminuição da proliferação e da viabilidade celular de forma dependente da dose, do tempo e da linha celular em estudo.

As linhas celulares selecionadas apresentaram perfis de expressão da proteína P53 distintos. A linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células A549 e a linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage apresentaram expressão normal de P53 enquanto a linha celular de cancro do pulmão de pequenas células H69 apresentou expressão de uma versão mutada da proteína e a linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células H1299 não a expressou (Mendes *et al*, 2015c).

As linhas celulares estudadas apresentaram diferenças na radiosensibilidade e na resposta à radiação que correspondeu a modelos de agressão celular distintos. Enquanto as linhas celulares A549 e H69 apresentaram uma resposta correspondente a um modelo de *um só alvo um só toque*, ou seja, uma correlação linear, as linhas celulares H1299 e Farage apresentaram uma resposta correspondente ao modelo linear quadrático (Mendes *et al*, 2015c).

O tipo de morte celular preferencial após exposição à radiação ionizante demonstrou ser dependente da dose e do perfil da expressão de P53 de cada linha celular (Mendes *et al*, 2015c). Deste modo, nas linhas celulares P53^{Wild} (A549 e Farage) a morte celular ocorreu preferencialmente por apoptose inicial ou por apoptose tardia/necrose, enquanto nas linhas celulares P53^{Mut} (H69) e P53^{Null} (H1299) se verificou morte celular principalmente por necrose com as doses elevadas (Mendes *et al*, 2015c).

Estas diferenças, em especial na radiosensibilidade, no ajuste ao modelo de agressão celular e nos tipos de morte, enfatizam a importância da componente molecular e fenotípica na resposta a radioterapia. Além disto, a exposição das células

a diferentes doses induziu a produção de níveis distintos de espécies reativas de oxigénio. Sabe-se que estas moléculas, indutoras de stresse oxidativo, podem atuar como segundos mensageiros e influenciar o microambiente tumoral (Mendes *et al*, 2015c). Assim, o estado pró ou anti inflamatório pode conduzir a uma participação mais exacerbada do sistema imunitário ou a um recrutamento de células que diminuam este estado contribuindo assim positivamente para a proliferação celular tumoral (Mendes *et al*, 2015c).

As células dendríticas são atraídas para este microambiente onde podem mediar a imunidade celular específica através da apresentação de antigénio às células T. Por exemplo, o processo de infiltração de linfócitos em tumores pode resultar na aquisição de imunidade tumor-específica com impacto tanto no tumor primário como nas metástases (Perez *et al*, 2009; Heylmann *et al*, 2014).

No trabalho de investigação em patologia humana conducente a esta Tese, avaliaram-se amostras de sangue periférico de doentes com cancro do pulmão e com linfoma difuso de grandes células B obtidas imediatamente antes do início da radioterapia, a meio do tratamento independentemente da sua duração total e trinta dias após o seu término, quanto ao reflexo da radiação no sistema imunitário.

A avaliação do leucograma mostrou que a radioterapia influenciou as populações celulares de leucócitos totais, de linfócitos e de monócitos em doentes com cancro do pulmão, ao contrário do tumor hematopoiético linfoma difuso de grandes células B, em que a terapêutica prévia com R-CHOP parece ter condicionado o reflexo periférico (Jeremic, 2005; Formenti & Demaria, 2009). As alterações no número de células B, de células *Natural Killer* e de células *Natural Killer* citotóxicas nos doentes de cancro do pulmão parecem estar associadas com à radiorresistência intrínseca destas células e ao seu recrutamento ao tumor. Por outro lado, a diminuição das células T reguladoras no sangue periférico aponta para o controlo do ambiente pró-inflamatório gerado pelo tratamento com radioterapia. Neste grupo de doentes a variação na concentração de IL-27 aponta para a indução da proliferação das células T e da produção de IFN- γ , por forma a manter a resposta imunológica e o recrutamento de células imunitárias para o microambiente tumoral. Associadamente a concentração de IL-7 indica a regulação da morte celular induzida pela radiação (Gao *et al*, 2015).

Nos doentes com linfoma difuso de grandes células B expostos a uma menor dose total de radiação ionizante, uma vez as populações de células neoplásicas são mais radiosensíveis, as alterações nas células T reguladoras sugerem a regulação do estado inflamatório e o aumento de INF- γ pode significar uma resposta mais citotóxica com o aumento da dose (Kachikwu *et al*, 2011; Głowala-Kosińska *et al*, 2013; Liston & Gray, 2014). Paralelamente, nos estudos *in vitro*, verificou-se que a linha celular de linfoma difuso de grandes células B foi a mais radiosensível e que apresentou a dose letal média mais baixa. Além disto, verificaram-se níveis mais elevados de espécies reativas de oxigénio e, para a exposição às doses mais elevadas, morte celular por apoptose tardia/necrose e necrose. Destaca-se a diminuição de CCL2, molécula associada à deposição metastática de células cancerígenas, pode contribuir para um melhor prognóstico (Kitamura *et al*, 2015).

No início do tratamento, os doentes com cancro do pulmão apresentaram um perfil Th1 mais acentuado, com níveis superiores de IL-2, INF- γ e IL-1 β do que os doentes com linfoma difuso de grandes células B. Observou-se o mesmo para a IL-5, associada ao estágio avançado de cancro do pulmão de não pequenas células. Por outro lado a concentração de CCL5, associada a uma polarização Th2, foi superior nos doentes com linfoma difuso de grandes células B grupo de doentes em que também se observou um aumento de células T reguladoras em circulação (Zhang *et al*, 2015a).

De uma forma geral, apesar do reduzido número de doentes envolvidos neste estudo, foi possível concluir que o estado do sistema imunitário no início do tratamento, bem como o tipo de tumor (sólido ou hematopoiético), contribuem para diferenças na resposta ao tratamento com radioterapia.

Perspetivas futuras

É emergente a melhor compreensão da interação complexa entre células em morte, o seu microambiente e o sistema imunitário. Este novo conhecimento suporta uma possível mudança de paradigma na interpretação da resposta à radioterapia nos doentes com cancro, através do reconhecimento do papel ativo desempenhado pelo sistema imunitário.

Assim, são necessários mais estudos acerca da vasta rede de interações entre o sistema imunitário e o cancro, com vista a otimizar a dose de radiação ionizante como forma de potenciar a imunidade celular antígeno-específica contra o tumor, contribuindo para tratamentos mais eficazes e maior qualidade da vida e sobrevivência dos doentes com neoplasia.

No seguimento deste estudo experimental *in vitro* e em patologia humana que permitiu elucidar os efeitos celulares e moleculares da radiação ionizante no cancro do pulmão e linfoma difuso de grandes células B, assim como o reflexo periférico em doentes com estas patologias, pretende-se ampliar a outras vertentes de investigação.

No que respeita aos estudos *in vitro*, o modelo de irradiação constitui uma plataforma otimizada que pode permitir a continuação desta investigação. O próximo desafio passa pelo estabelecimento de culturas primárias a partir de biopsias representativas destas patologias e pela expansão de células do sistema imune, colhidas por amostragem do sangue periférico, com vista ao estudo, através de co-culturas e de outras tecnologias, das interações entre estas células no contexto da radioterapia.

No que concerne ao estudo em patologia humana é fundamental a sua continuidade no sentido de aumentar a amostra. Paralelamente, o estudo de biomarcadores relacionados com a exaustão das células efetoras do sistema imune antes, durante e após a radioterapia é uma perspetiva que se pode translacionar para a prática clínica a nível do diagnóstico, da avaliação da resposta à terapêutica e do seguimento.

PARTE IV – REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

Achanta G, Huang P, Agents S (2004) Role of p53 in Sensing Oxidative DNA Damage in Response to Reactive Oxygen Species-Generating Agents Role of p53 in Sensing Oxidative DNA Damage in Response to Reactive Oxygen. **53**: 6233–6239.

Aggarwal BB, Vijayalekshmi R V., Sung B (2009) Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: Short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res* **15**: 425–430, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0149.

Aichinger H, Dierker J, Joite-Barfuß S, Säbel M (2012) Production and Measurement of X-Rays. In *Radiation Exposure and Image Quality in X-Ray Diagnostic Radiology*, pp. 13–20.

Alizadeh a a, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald a, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**: 503–511, doi:10.1038/35000501.

Almeida S, Sarmiento-ribeiro AB, Januário C, Rego AC, Oliveira CR (2008) Evidence of apoptosis and mitochondrial abnormalities in peripheral blood cells of Huntington ' s disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* **374**: 599–603, doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.009.

Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C and, Pijnenborg R (2007) The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum Reprod* **22**: 1304–1309, doi:10.1093/humrep/dem011.

Alves R, Fonseca AR, Gonçalves AC, Ferreira-Teixeira M, Lima J, Abrantes AM, Alves V, Rodrigues-Santos P, Jorge L, Matoso E, Carreira IM, Botelho MF, Sarmiento-Ribeiro AB (2015) Drug transporters play a key role in the complex process of Imatinib resistance in vitro. *Leuk Res* **39**: 355–360, doi:10.1016/j.leukres.2014.12.008.

American Cancer Society, American Cancer Society., American Cancer Society, American Cancer Society. (2015) *Cancer Facts & Figures 2015* (Atlanta).

Anazetti MC, Melo PS (2007) Morte Celular por Apoptose : uma visão bioquímica e molecular Apoptosis Cell Death : biochemistry and molecular aspects. *Metrocamp Pesqui* **1**: 37–58.

André M, Mounier N, Leleu X, Sonet A, Brice P, Henry-Amar M, Tilly H, Coiffier B, Bosly A, Morel P, Haioun C, Gaulard P, Reyes F, Gisselbrecht C (2004) Second cancers and late toxicities after treatment of aggressive non-Hodgkin lymphoma with the ACVBP regimen: A GELA cohort study on 2837 patients. *Blood* **103**: 1222–1228, doi:10.1182/blood-2003-04-1124.

Andreo P, Burns DT, Hohlfield S, Huq MS, Kanai T, Laitano F, Vynckier S V. (2011) Absorbed Dose Determination in External Beam Radiotherapy: An International Code of Practice for Dosimetry based on Standards of Absorbed Dose to Water (Vienna, Austria).

Andreu P, Johansson M, Affara NI, Pucci F, Tan T, Junankar S, Korets L, Lam J, Tawfik D, DeNardo DG, Naldini L, de Visser KE, De Palma M, Coussens LM (2010) FcRγ Activation Regulates Inflammation-Associated Squamous Carcinogenesis. *Cancer Cell* **17**: 121–134, doi:10.1016/j.ccr.2009.12.019.

Anscher MS (2010) Targeting the TGF-beta1 pathway to prevent normal tissue injury after cancer therapy. *Oncologist* **15**: 350–359, doi:10.1634/theoncologist.2009-S101.

Antoniceilli A, Cafarotti S, Indini A, Galli A, Russo A, Cesario A, Lococo FM, Russo P, Mainini AF, Bonifati LG, Nosotti M, Santambrogio L, Margaritora S, Granone PM, Dutly AE

(2013) EGFR-Targeted Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer : Focus on EGFR Oncogenic Mutation. *Int J Med Sci* **10**: 320–330, doi:10.7150/ijms.4609.

Aparicio-Siegmund S, Garbers C (2015) The biology of interleukin-27 reveals unique pro- and anti-inflammatory functions in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.008.

Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira J-P, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, André F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* **13**: 1050–1059, doi:10.1038/nm1622.

Apraiz A, Boyano MD, Asumendi A (2011) Cell-centric view of apoptosis and apoptotic cell death-inducing antitumoral strategies. *Cancers (Basel)* **3**: 1042–1080, doi:10.3390/cancers3011042.

Arriagada R, Le Chevalier T, Rivièrè a., Chomy P, Monnet I, Bardet E, Santos-Miranda J a., Le Péchoux C, Tarayre M, Benhamou S, Laplanche a., Le Péhoux C, Tarayre M, Benhamou S, Laplanche a. (2002) Patterns of failure after prophylactic cranial irradiation in small-cell lung cancer: Analysis of 505 randomized patients. *Ann Oncol* **13**: 748–754, doi:10.1093/annonc/mdf123.

Asami K, Atagi S (2014) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for non-small cell lung cancer. *World J Clin Oncol* **5**: 646–659, doi:10.5306/wjco.v5.i4.646.

Ashman LK (1987) The immunogenicity of tumour cells. *Immunol Cell Biol* **65 (Pt 4)**: 271–277, doi:10.1038/icb.1987.31.

Avilés A, Delgado S, Nambo MJ, Alatraste S, Díaz-Maqueo J (1994) Adjuvant radiotherapy to sites of previous bulky disease in patients stage iv diffuse large cell lymphoma. *Int J Radiat Oncol* **30**: 799–803, doi:10.1016/0360-3016(94)90352-2.

Avilés A, Fernández R, Pérez F, Nambo MJ, Neri N, Talavera A, Castañeda C, González M, Cleto S (2004) Adjuvant Radiotherapy in Stage IV Diffuse Large Cell Lymphoma Improve Outcome. *Leuk Lymphoma* **45**: 1385–1389, doi:10.1080/10428190410001667712.

Avilés A, Neri N, Delgado S, Pérez F, Nambo MJ, Cleto S, Talavera A, Huerta-Guzmán J (2005) Residual disease after chemotherapy in aggressive malignant lymphoma: the role of radiotherapy. *Med Oncol* **22**: 383–387, doi:10.1385/MO:22:4:383.

Awan U, Siddiqui N, SaadUllah M, Bashir H, Farooqui ZS, Muzaffar N, Mahmood MT (2013) FDG-PET scan in assessing lymphomas and the application of Deauville Criteria. *J Pak Med Assoc* **63**: 725–730.

Ba C (2013) The Role of Radiation Therapy in the Treatment of Stage I-II Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep* **8** : 236–242, doi:10.1007/s11899-013-0170-5.

Baggarley S, Lu JJ (2013) The Physics of Radiation Oncology. In *Radiation Oncology in Palliative Cancer Care*, (John Wiley and Sons), pp. 22–30.

Balça-Silva J, Matias D, do Carmo A, Girão H, Moura-Neto V, Sarmiento-Ribeiro AB, Lopes MC (2015) Tamoxifen in combination with temozolomide induce a synergistic inhibition of PKC-pan in GBM cell lines. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **1850**: 722–732, doi:10.1016/j.bbagen.2014.12.022.

Balça-Silva J, Neves SS, Gonçalves AC, Abrantes AM, Casalta-Lopes J, Botelho MF, Sarmiento-Ribeiro AB, Silva HC (2012) Effect of miR-34b overexpression on the radiosensitivity of non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Res* **32**: 1603–1610.

- Balcer-Kubiczek EK (2012) Apoptosis in radiation therapy: a double-edged sword. *Exp Oncol* **34**: 277–285.
- Baldwin DR, White B, Schmidt-Hansen M, Champion AR, Melder AM (2011) Diagnosis and treatment of lung cancer: summary of updated NICE guidance. *Br Med J* **342**: d2110, doi:10.1136/bmj.d2110.
- Balkwill F (2009) Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* **9**: 361–371, doi:10.1038/nrc2628.
- Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**: 539–545, doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0.
- Ballonoff A, Rusthoven KE, Schwer A, McCammon R, Kavanagh B, Bassetti M, Newman F, Rabinovitch R (2008) Outcomes and Effect of Radiotherapy in Patients With Stage I or II Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Surveillance, Epidemiology, and End Results Analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **72**: 1465–1471, doi:10.1016/j.ijrobp.2008.02.068.
- Balogh A, Persa E, Bogdándi EN, Benedek A, Hegyesi H, Sáfrány G, Lumniczky K (2013) The effect of ionizing radiation on the homeostasis and functional integrity of murine splenic regulatory T cells. *Inflamm Res* **62**: 201–212, doi:10.1007/s00011-012-0567-y.
- Bandurska K, Król I, Myga-Nowak M (2014) Interferons: between structure and function. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **68**: 428–440, doi:10.5604/17322693.1101229.
- Barcellos-hoff MH, Nguyen DH (2010) Irradiated Tissues Become Tumors ? *Heal (San Fr)* **97**: 446–457, doi:10.1097/HP.0b013e3181b08a10.RADIATION.
- Barnard S (2004) Lung cancer. *Surg* **22**: 97–100, doi:10.1383/surg.22.5.97.33386.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP (2006) Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova* **29**: 113–123, doi:10.1590/S0100-40422006000100021.
- Barrington SF, Mikhaeel NG, Kostakoglu L, Meignan M, Hutchings M, Mueller SP, Schwartz LH, Zucca E, Fisher RI, Trotman J, Hoekstra OS, Hicks RJ, O'Doherty MJ, Hustinx R, Biggi A, Cheson BD (2014) Role of Imaging in the Staging and Response Assessment of Lymphoma: Consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol* **32**: 3048–3058, doi:10.1200/JCO.2013.53.5229.
- Bartek J, Lukas C, Lukas J (2004) Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 792–804, doi:10.1038/nrm1493.
- Bartek J, Lukas J (2001) Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 738–747, doi:10.1016/S0955-0674(00)00280-5.
- Baruch M, Hochberg M, Gabay C, Ben-Bassat H, Shlomai Z, Laskov R (1996) Molecular characterization of an unusual non-Hodgkin's B-lymphoma cell line ('Farage') lacking the ability to produce immunoglobulin polypeptide chains. *Leuk Lymphoma* **21**: 485–495, doi:10.3109/10428199609093448.
- Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK (2001) CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* **14**: 303–313.
- Bayman N a., Sheikh H, Kularatne B, Lorigan P, Blackhall F, Thatcher N, Faivre-Finn C (2009) Radiotherapy for small-cell lung cancer-Where are we heading? *Lung Cancer* **63**: 307–314, doi:10.1016/j.lungcan.2008.06.013.
- Bearz a., Berretta M, Lleshi a., Tirelli U (2011) Target therapies in lung cancer. *J Biomed Biotechnol* **2011**: 921231, doi:10.1155/2011/921231.
- Beau-Faller M, Gaub MP, Schneider a., Guérin E, Meyer N, Ducrocq X, Massard G, Gasser B, Kessler R, Weitzenblum E, Wihlm JM, Quoix E, Oudet P (2003) Allelic imbalance at loci

containing FGFR, FGF, c-Met and HGF candidate genes in non-small cell lung cancer subtypes, implication for progression. *Eur J Cancer* **39**: 2538–2547, doi:10.1016/S0959-8049(03)00623-3.

Becker Y (2006) Molecular immunological approaches to biotherapy of human cancers--a review, hypothesis and implications. *Anticancer Res* **26**: 1113–1134.

Begg AC, Stewart F a, Vens C (2011) Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer* **11**: 239–253, doi:10.1038/nrc3007.

Béguelin W, Popovic R, Teater M, Jiang Y, Bunting K, Rosen M, Shen H, Yang S, Wang L, Ezponda T, Martinez-Garcia E, Zhang H, Zheng Y, Verma S, McCabe M, Ott H, VanAller G, Kruger R, Liu Y, McHugh C, Scott D, Chung Y, Kelleher N, Shaknovich R, Creasy C, Gascoyne R, Wong KK, Cerchetti L, Levine R, Abdel-Wahab O, Licht J, Elemento O, Melnick A (2013) EZH2 Is Required for Germinal Center Formation and Somatic EZH2 Mutations Promote Lymphoid Transformation. *Cancer Cell* **23**: 677–692, doi:10.1016/j.ccr.2013.04.011.

Belka C, Schmid B, Marini P, Durand E, Rudner J, Faltin H, Bamberg M, Schulze-Osthoff K, Budach W (2001) Sensitization of resistant lymphoma cells to irradiation-induced apoptosis by the death ligand TRAIL. *Oncogene* **20**: 2190–2196, doi:10.1038/sj.onc.1204318.

Bernier J, Hall EJ, Giaccia A (2004) Timeline: Radiation oncology: a century of achievements. *Nat Rev Cancer* **4**: 737–747, doi:10.1038/nrc1451.

Bieging KT, Mello SS, Attardi LD (2014) Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **14**: 359–370, doi:10.1038/nrc3711.

Bindea G, Mlecnik B, Fridman W-H, Pagès F, Galon J (2010) Natural immunity to cancer in humans. *Curr Opin Immunol* **22**: 215–222, doi:10.1016/j.coi.2010.02.006.

Bindra RS, Yahalom J (2011) The important role of radiation therapy in early-stage diffuse large B-cell lymphoma: time to review the evidence once again. *Expert Rev Anticancer Ther* **11**: 1367–1378, doi:10.1586/era.11.88.

Bitomsky N, Hofmann TG (2009) Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling - Roles of p53, p73 and HIPK2. *FEBS J* **276**: 6074–6083, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07331.x.

Bonadonna G, Bonfante V, Viviani S, Di Russo A, Villani F, Valagussa P (2004) ABVD plus subtotal nodal versus involved-field radiotherapy in early-stage Hodgkin's disease: long-term results. *J Clin Oncol* **22**: 2835–2841, doi:10.1200/JCO.2004.12.170.

Bonnet C, Fillet G, Mounier N, Ganem G, Molina TJ, Thiéblemont C, Fermé C, Quesnel B, Martin C, Gisselbrecht C, Tilly H, Reyes F (2007) CHOP alone compared with CHOP plus radiotherapy for localized aggressive lymphoma in elderly patients: A study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* **25**: 787–792, doi:10.1200/JCO.2006.07.0722.

Bortfeld T, Jeraj R (2011) The physical basis and future of radiation therapy.

Boyle J, Beaven AW, Diehl LF, Prosnitz LR, Kelsey CR (2014) Improving Outcomes in Advanced DLBCL: Systemic Approaches and Radiotherapy. *Oncology (Williston Park)* **28**:

Boyle P (1997) Cancer, cigarette smoking and premature death in Europe: a review including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting, Helsinki, October 1996. *Lung Cancer* **17**: 1–60, doi:10.1016/S0169-5002(97)00648-X.

Bozcuk H, Uslu G, Samur M, Yildiz M, Ozben T, Ozdoğan M, Artaç M, Altunbaş H, Akan I, Savaş B (2004) Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6, and fasting serum insulin correlate with clinical outcome in metastatic breast cancer patients treated with

chemotherapy. *Cytokine* **27**: 58–65, doi:10.1016/j.cyto.2004.04.002.

Brambilla E, Negoescu a, Gazzeri S, Lantuejoul S, Moro D, Brambilla C, Coll JL (1996) Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. *Am J Pathol* **149**: 1941–1952.

Brambilla E, Travis WD, Colby T V., Corrin B, Shimosato Y (2001) The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* **18**: 1059–1068, doi:10.1183/09031936.01.00275301.

Brandacher G, Winkler C, Schroecksadel K, Margreiter R, Fuchs D (2006) Antitumoral Activity of Interferon- γ Involved in Impaired Immune Function in Cancer Patients. *Curr Drug Metab* **7**: 599–612, doi:10.2174/138920006778017768.

Breen L, Murphy L, Keenan J, Clynes M (2008) Development of taxane resistance in a panel of human lung cancer cell lines. *Toxicol Vitr* **22**: 1234–1241, doi:10.1016/j.tiv.2008.04.005.

Buch K, Peters T, Nawroth T, Sanger M, Schmidberger H, Langguth P (2012) Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - A comparative study. *Radiat Oncol* **7**: 1, doi:10.1186/1748-717X-7-1.

Budanov A V (2014) The role of tumor suppressor p53 in the antioxidant defense and metabolism. *Subcell Biochem* **85**: 337–358, doi:10.1007/978-94-017-9211-0_18.

Bullock a N, Henckel J, DeDecker BS, Johnson CM, Nikolova P V, Proctor MR, Lane DP, Fersht a R (1997) Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 14338–14342, doi:10.1073/pnas.94.26.14338.

Burnet M (1957) Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J* **1**: 841–847, doi:10.1136/bmj.1.5023.841.

Caganova M, Carrisi C, Varano G, Mainoldi F, Zanardi F, Germain PL, George L, Alberghini F, Ferrarini L, Talukder AK, Ponzoni M, Testa G, Nojima T, Doglioni C, Kitamura D, Toellner KM, Su IH, Casola S (2013) Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *J Clin Invest* **123**: 5009–5022, doi:10.1172/JCI70626.

Campbell B a, Connors JM, Gascoyne RD, Morris WJ, Pickles T, Sehn LH (2012) Limited-stage diffuse large B-cell lymphoma treated with abbreviated systemic therapy and consolidation radiotherapy: involved-field versus involved-node radiotherapy. *Cancer* **118**: 4156–4165, doi:10.1002/cncr.26687.

Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES (2011) The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: Evolving concepts and practical applications. *Blood* **117**: 5019–5032, doi:10.1182/blood-2011-01-293050.

Camus M, Tosolini M, Mlecnik B, Pages F, Kirilovsky A, Berger A, Costes A, Bindea G, Charoentong P, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman W-H, Galon J (2009) Coordination of Intratumoral Immune Reaction and Human Colorectal Cancer Recurrence. *Cancer Res* **69**: 2685–2693, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2654.

Cao W, Bover L, Cho M, Wen X, Hanabuchi S, Bao M, Rosen DB, Wang Y-H, Shaw JL, Du Q, Li C, Arai N, Yao Z, Lanier LL, Liu Y-J (2009) Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J Exp Med* **206**: 1603–1614, doi:10.1084/jem.20090547.

Cao X (2009) Regulatory T cells and immune tolerance to tumors. *Immunol Res* **46**: 79–93, doi:10.1007/s12026-009-8124-7.

Carson KR, Bartlett NL, McDonald JR, Luo S, Zeringue A, Liu J, Fu Q, Chang SH, Colditz G

a. (2012) Increased body mass index is associated with improved survival in United States veterans with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* **30**: 3217–3222, doi:10.1200/JCO.2011.39.2100.

Castedo M, Kroemer G (2004) Mitotic catastrophe: a special case of apoptosis. *J Soc Biol* **198**: 97–103.

Cerchiotti LC, Ghetu AF, Zhu X, Da Silva GF, Zhong S, Matthews M, Bunting KL, Polo JM, Farès C, Arrowsmith CH, Yang SN, Garcia M, Coop A, MacKerell AD, Privé GG, Melnick A (2010) A Small-Molecule Inhibitor of BCL6 Kills DLBCL Cells In Vitro and In Vivo. *Cancer Cell* **17**: 400–411, doi:10.1016/j.ccr.2009.12.050.

Ceresoli GL (2012) FDG PET/CT metabolic tumour volume in small-cell lung cancer: Better staging and prognostic stratification for an improved therapeutic strategy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **39**: 921–924, doi:10.1007/s00259-012-2094-z.

Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin J-P, Boireau W, Rouleau A, Simon B, Lanneau D, De Thonel A, Multhoff G, Hamman A, Martin F, Chauffert B, Solary E, Zitvogel L, Garrido C, Ryffel B, Borg C, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F (2010) Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest* **120**: 457–471, doi:10.1172/JCI40483.

Chan T, Chen Z, Hao S, Xu S, Yuan J, Saxena A, Qureshi M, Zheng C, Xiang J (2007) Enhanced T-cell immunity induced by dendritic cells with phagocytosis of heat shock protein 70 gene-transfected tumor cells in early phase of apoptosis. *Cancer Gene Ther* **14**: 409–420, doi:10.1038/sj.cgt.7701025.

Chang BD, Broude E V, Dokmanovic M, Zhu H, Ruth A, Xuan Y, Kandel ES, Lausch E, Christov K, Roninson IB (1999) A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res* **59**: 3761–3767.

Chang BD, Broude E V, Fang J, Kalinichenko T V, Abdryashitov R, Poole JC, Roninson IB (2000) p21Waf1/Cip1/Sdi1-induced growth arrest is associated with depletion of mitosis-control proteins and leads to abnormal mitosis and endoreduplication in recovering cells. *Oncogene* **19**: 2165–2170, doi:10.1038/sj.onc.1203573.

Chapman JD (2003) Single-hit mechanism of tumour cell killing by radiation. *Int J Radiat Biol* **79**: 71–81.

Chaudhuri D, Suriano R, Mittelman A, Tiwari RK (2009) Targeting the immune system in cancer. *Curr Pharm Biotechnol* **10**: 166–184, doi:10.2174/138920109787315114.

Chen J, Zheng X, Liu D, Zhao Q, Wu Y, Tan F, Wang Y, Jiang J, Hu P (2014a) Therapeutic Effects and Adverse Drug Reactions are Affected by Icotinib Exposure and CYP2C19 and EGFR Genotypes in Chinese Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Asiian Pac J Cancer Prev* **15**: 7195–7200.

Chen L, Chen R, Zhu Z, Zhang Y, Wen Z, Li Y, Li X, Luo Y, Ma L, Lin S, Chen X (2014b) Predictive factors associated with gefitinib response in patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Chin J Cancer Res* **26**: 466–470, doi:10.3978/j.issn.1000-9604.2014.08.09.

Chen N, Karantza-Wadsworth V (2009) Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1793**: 1516–1523, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.12.013.

Chen Q, Chai Y-C, Mazumder S, Jiang C, Macklis RM, Chisolm GM, Almasan A (2003) The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ*

10: 323–334, doi:10.1038/sj.cdd.4401148.

Chen X, Liao C, Chu Q, Zhou G, Lin X, Li X, Lu H, Xu B, Yue Z (2014c) Dissecting the molecular mechanism of ionizing radiation-induced tissue damage in the feather follicle. *PLoS One* **9**: e89234, doi:10.1371/journal.pone.0089234.

Cheng L, Alexander RE, Maclennan GT, Cummings OW, Montironi R, Lopez-beltran A, Cramer HM, Davidson DD (2012) Molecular pathology of lung cancer : key to personalized medicine. *Mod Pathol* **25**: 347–369, doi:10.1038/modpathol.2011.215.

Cheng X, Yu X, Ding Y-J, Fu Q-Q, Xie J-J, Tang T-T, Yao R, Chen Y, Liao Y-H (2008) The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol* **127**: 89–97, doi:10.1016/j.clim.2008.01.009.

Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, Lister T a. (2014) Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. *J Clin Oncol* **32**: 3059–3067, doi:10.1200/JCO.2013.54.8800.

Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, Coiffier B, Fisher RI, Hagenbeek A, Zucca E, Rosen ST, Stroobants S, Lister TA, Hoppe RT, Dreyling M, Tobinai K, Vose JM, Connors JM, Federico M, Diehl V (2007) Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* **25**: 579–586, doi:10.1200/JCO.2006.09.2403.

Chin CF, Yeong FM (2010) Safeguarding entry into mitosis: the antephase checkpoint. *Mol Cell Biol* **30**: 22–32, doi:10.1128/MCB.00687-09.

Chu K, Teele N, Dewey MW, Albright N, Dewey WC (2004) Computerized video time lapse study of cell cycle delay and arrest, mitotic catastrophe, apoptosis and clonogenic survival in irradiated 14-3-3sigma and CDKN1A (p21) knockout cell lines. *Radiat Res* **162**: 270–286.

Chung TW, Tan K, Chan H, Lai M, Yen C, Li Y, Lin SH, Lin C (2014) Induction of Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) Enzymatic Activity Contributes to Interferon-Gamma Induced Apoptosis and Death Recetor 5 Expression in Human Non-small Cell Lung Cancer Cells. *Asian Pacific J Cancer Prev* **15**: 7995–8001.

Clarke MF, Fuller M (2006) Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* **124**: 1111–1115, doi:10.1016/j.cell.2006.03.011.

Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P, Gisselbrecht C (2002) CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma.

Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula S V, Brahmachary M, Shen Q, Bertoni F, Ponzoni M, Scandurra M, Califano A, Bhagat G, Chadburn A, Dalla-Favera R, Pasqualucci L (2009) Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* **459**: 717–721, doi:10.1038/nature07968.

Coronella JA, Spier C, Welch M, Trevor KT, Stopeck AT, Villar H, Hersh EM (2002) Antigen-Driven Oligoclonal Expansion of Tumor-Infiltrating B Cells in Infiltrating Ductal Carcinoma of the Breast. *J Immunol* **169**: 1829–1836, doi:10.4049/jimmunol.169.4.1829.

Crowe NY, Coquet JM, Berzins SP, Kyparissoudis K, Keating R, Pellicci DG, Hayakawa Y, Godfrey DI, Smyth MJ (2005) Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J Exp Med* **202**: 1279–1288, doi:10.1084/jem.20050953.

Cunningham D, Hawkes E a., Jack A, Qian W, Smith P, Mouncey P, Pocock C, Ardeschna KM, Radford J a., McMillan A, Davies J, Turner D, Kruger A, Johnson P, Gambell J, Linch D (2013) Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in

patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: A phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *Lancet* **381**: 1817–1826, doi:10.1016/S0140-6736(13)60313-X.

D'Addario G, Früh M, Reck M, Baumann P, Klepetko W, Felip E (2010) Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and followup. *Ann Oncol* **21**: v116–v119, doi:10.1093/annonc/mdq189.

Dacic S (2011) Molecular Diagnostics of Lung Carcinomas. *Arch Pathol Lab Med* **135**: 622–629.

Dal C (2008) alamarBlue® Cell Viability Reagent. *Cell* 1–10.

Dalerba P, Cho RW, Clarke MF (2007) Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* **58**: 267–284, doi:10.1146/annurev.med.58.062105.204854.

Danial NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* **116**: 205–219.

Daniel PT, Wieder T, Sturm I, Schulze-Osthoff K (2001) The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK* **15**: 1022–1032, doi:10.1038/sj.leu.2402169.

Darlison L (2009) NICE guidelines for the diagnosis and treatment of lung cancer. *Nurs Times* **101**: 47–48.

Darrasse-Jèze G, Bergot A-S, Durgeau A, Billiard F, Salomon BL, Cohen JL, Bellier B, Podsypanina K, Klatzmann D (2009) Tumor emergence is sensed by self-specific CD44hi memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *J Clin Invest* **119**: 2648–2662, doi:10.1172/JCI36628.

Davey R a., Locke VL, Henness S, Harvie RM, Davey MW (2004) Cellular Models of Drug- and Radiation-resistant Small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res* **24**: 465–471.

Davis R, Ngo V, Lenz G, Tolar P (2010) Chronic Active B cell receptor signaling in diffuse large B cell lymphoma. *Nature* **463**: 88–92, doi:10.1038/nature08638.Chronic.

Deans DAC, Wigmore SJ, Gilmour H, Paterson-Brown S, Ross JA, Fearon KCH (2006) Elevated tumour interleukin-1 β is associated with systemic inflammation: a marker of reduced survival in gastro-oesophageal cancer. *Br J Cancer* **95**: 1568–1575, doi:10.1038/sj.bjc.6603446.

Deckbar D, Jeggo P a, Löbrich M (2011) Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **46**: 271–283, doi:10.3109/10409238.2011.575764.

Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M (2005) The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer* **104**: 1129–1137, doi:10.1002/cncr.21324.

Delarue R, Tilly H, Mounier N, Petrella T, Salles G, Thieblemont C, Bologna S, Ghesquière H, Hacini M, Fruchart C, Ysebaert L, Fermé C, Casasnovas O, Van Hoof A, Thyss A, Delmer A, Fitoussi O, Molina TJ, Haioun C, Bosly A (2013) Dose-dense rituximab-CHOP compared with standard rituximab-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (the LNH03-6B study): A randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* **14**: 525–533, doi:10.1016/S1470-2045(13)70122-0.

Delneste Y, Magistrelli G, Gauchat J-F, Haeuw J-F, Aubry J-P, Nakamura K, Kawakami-Honda N, Goetsch L, Sawamura T, Bonnefoy J-Y (2002) Involvement of LOX-1 in Dendritic Cell-Mediated Antigen Cross-Presentation. *Immunity* **17**: 353–362, doi:10.1016/S1074-7613(02)00388-6.

Delves PJ, Roitt IM (2000) The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* **343**:

37–49, doi:10.1056/NEJM200007063430107.

Demetri GD, Antonia S, Benjamin RS, Bui MM, Casper ES, Iii EUC, Delaney TF, Ganjoo KN, Heslin MJ, Hutchinson RJ, Iii JMK, Letson GD, Mcgarry S V, Donnell RJO, Paz IB, Pfeifer JD, Mehren M Von, Wayne J (2010) Clinical Practice Guidelines in Oncology. **8**: 630–674.

Deng C-X (2006) BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res* **34**: 1416–1426, doi:10.1093/nar/gkl010.

Deorukhkar A, Krishnan S (2010) Targeting inflammatory pathways for tumor radiosensitization. *Biochem Pharmacol* **80**: 1904–1914, doi:10.1016/j.bcp.2010.06.039.

DeVita VT, Chu E (2008) A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* **68**: 8643–8653, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6611.

Dienstmann R, Martinez P, Felip E (2011) Personalizing therapy with targeted agents in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **2**: 165–177.

Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD (1994) Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors. *Immunity* **1**: 447–456, doi:10.1016/1074-7613(94)90087-6.

Diller L, Kassel J, Nelson CE, Gryka M a, Litwak G, Gebhardt M, Bressac B, Ozturk M, Baker SJ, Vogelstein B (1990) P53 Functions As a Cell Cycle Control Protein in Osteosarcomas. *Mol Cell Biol* **10**: 5772–5781, doi:10.1128/MCB.10.11.5772.

Dipaola RS (2002) To Arrest or Not To G 2 -M Cell-Cycle Arrest : Commentary re : A . K . Tyagi et al . , Silibinin Strongly Synergizes Human Prostate Carcinoma DU145 Cells to Doxorubicin-induced Res . , 8 : 3512 – 3519 , 2002 . To Arrest or Not To G 2 -M Cell-Cycle Arrest. *Clin Cancer Res* **8**: 3311–3314.

Domagala-Kulawik J, Osinska I, Hoser G (2014) Mechanisms of immune response regulation in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* **3**: 15–22, doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2013.11.03.

Dong HP, Elstrand MB, Holth A, Silins I, Berner A, Trope CG, Davidson B, Risberg B (2006) NK- and B-cell infiltration correlates with worse outcome in metastatic ovarian carcinoma. *Am J Clin Pathol* **125**: 451–458.

Dörr W (2009) Pathogenesis of normal tissue side- effects. In Basic Clinical Radiobiology, pp. 169–190.

Dorth J a, Prosnitz LR, Broadwater G, Beaven AW, Kelsey CR (2012a) Radiotherapy dose–response analysis for diffuse large B-cell lymphoma with a complete response to chemotherapy. *Radiat Oncol* **7**: 100, doi:10.1186/1748-717X-7-100.

Dorth J a., Prosnitz LR, Broadwater G, Diehl LF, Beaven AW, Coleman RE, Kelsey CR (2012b) Impact of consolidation radiation therapy in stage III-IV diffuse large B-cell lymphoma with negative post-chemotherapy radiologic imaging. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **84**: 762–767, doi:10.1016/j.ijrobp.2011.12.067.

Drake MT, Maurer MJ, Link BK, Habermann TM, Ansell SM, Micallef IN, Kelly JL, Macon WR, Nowakowski GS, Inwards DJ, Johnston PB, Singh RJ, Allmer C, Slager SL, Weiner GJ, Witzig TE, Cerhan JR (2010) Vitamin D insufficiency and prognosis in non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* **28**: 4191–4198, doi:10.1200/JCO.2010.28.6674.

Dranoff G (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**: 11–22, doi:10.1038/nrc1252.

Duarte RLDM, Paschoal MEM (2006) Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. *J Bras Pneumol* **32**: 56–65, doi:10.1590/S1806-37132006000100012.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**: 991–998, doi:10.1038/ni1102-991.

Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KCF, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, Diamond MS, Koebel CM, Arthur C, White JM, Schreiber RD (2005) A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol* **6**: 722–729, doi:10.1038/ni1213.

Durante M, Reppingen N, Held KD (2013) Immunologically augmented cancer treatment using modern radiotherapy (Elsevier Ltd).

Eberhard D a., Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, Ince WL, Jänne P a., Januario T, Johnson DH, Klein P, Miller V a., Ostland M a., Ramies D a., Sebisanoovic D, Stinson J a., Zhang YR, Seshagiri S, Hillan KJ (2005) Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* **23**: 5900–5909, doi:10.1200/JCO.2005.02.857.

Edge SB, Compton CC (2010) The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* **17**: 1471–1474, doi:10.1245/s10434-010-0985-4.

Edwards BK, Brown ML, Wingo P a., Howe HL, Ward E, Ries LAG, Schrag D, Jamison PM, Jemal A, Wu XC, Friedman C, Harlan L, Warren J, Anderson RN, Pickle LW (2005) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* **97**: 1407–1427, doi:10.1093/jnci/dji289.

Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z (2010) Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* **18**: 884–901, doi:10.1016/j.devcel.2010.05.012.

Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**: 495–516, doi:10.1080/01926230701320337.

Elsner L, Flügge PF, Lozano J, Muppala V, Eiz-Vesper B, Demiroglu SY, Malzahn D, Herrmann T, Brunner E, Bickeböller H, Multhoff G, Walter L, Dressel R (2010) The endogenous danger signals HSP70 and MICA cooperate in the activation of cytotoxic effector functions of NK cells. *J Cell Mol Med* **14**: 992–1002, doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00677.x.

Engel AM, Svane IM, Mouritsen S, Rygaard J, Clausen J, Werdelin O (1996) Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression. *APMIS* **104**: 629–639.

Engel AM, Svane IM, Rygaard J, Werdelin O (1997) MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice. *Scand J Immunol* **45**: 463–470.

Ettinger DS (2012) Ten years of progress in non-small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw* **10**: 292–295.

Ettinger DS, Akerley W, Borghaei H, Chang A, Cheney RT, Chirieac LR (2012) NCCN Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Small Cell Lung Cancer. *Cancer*.

Fehérvári Z, Sakaguchi S (2004) CD4⁺ Tregs and immune control. *J Clin Invest* **114**: 1209–1217, doi:10.1172/JCI23395.

Fengling M, Fenju L, Wanxin W, Lijia Z, Jiandong T, Zu W, Xin Y, Qingxiang G (2009) Rituximab sensitizes a Burkitt lymphoma cell line to cell killing by X-irradiation. *Radiat Environ Biophys* **48**: 371–378, doi:10.1007/s00411-009-0237-9.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**: E359–E386, doi:10.1002/ijc.29210.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, S Parkin, Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray 2013, Forman D, Bray F (2013) Lung Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.

Ferrajoli A, Keating MJ, Manshour T, Giles FJ, Dey A, Estrov Z, Koller CA, Kurzrock R, Thomas DA, Faderl S, Lerner S, O'Brien S, Albitar M (2002) The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **100**: 1215–1219.

Ferreri a J, Dell'Oro S, Reni M, Ceresoli GL, Cozzarini C, Ponzoni M, Villa E (2000) Consolidation radiotherapy to bulky or semibulky lesions in the management of stage III-IV diffuse large B cell lymphomas. *Oncology* **58**: 219–226, doi:12104.

Feugier P, Van Hoof a, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Fermé C, Christian B, Lepage E, Tilly H, Morschhauser F, Gaulard P, Salles G, Bosly a, Gisselbrecht C, Reyes F, Coiffier B (2005) Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* **23**: 4117–4126, doi:10.1200/JCO.2005.09.131.

Finlay C a, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine a J (1988) Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* **8**: 531–539, doi:10.1128/MCB.8.2.531.

Finn JO (2008) Cancer immunology. *N Engl J Med* **13**: 2704–2715.

Flatmark K, Nome R V, Folkvord S, Bratland A, Rasmussen H, Ellefsen MS, Fodstad Ø, Ree AH (2006) Radiosensitization of colorectal carcinoma cell lines by histone deacetylase inhibition. *Radiat Oncol* **1**: 25, doi:10.1186/1748-717X-1-25.

Forde P, Ettinger D (2014) Targeted therapy for non-small-cell lung cancer: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther* **13**: 745–758, doi:10.1586/era.13.47.Targeted.

Formenti SC (2010) Immunological aspects of local radiotherapy: clinical relevance. *Discov Med* **9**: 119–124.

Formenti SC, Demaria S (2009) Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncol* **10**: 718–726, doi:10.1016/S1470-2045(09)70082-8.

Franken N a P, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* **1**: 2315–2319, doi:10.1038/nprot.2006.339.

Fridman JS, Lowe SW (2003) Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**: 9030–9040, doi:10.1038/sj.onc.1207116.

Friedman E (2002) Immune Modulation by Ionizing Radiation and its Implications for Cancer Immunotherapy. *Curr Pharm Des* **8**: 1765–1780, doi:10.2174/1381612023394089.

Früh M (2011) Lung Cancer The search for improved systemic therapy of non-small cell lung cancer — What are today's options? *Lung Cancer* **72**: 265–270, doi:10.1016/j.lungcan.2011.02.020.

Früh M, De Ruyscher D, Popat S, Crinò L, Peters S, Felip E, Früh M., De Ruyscher D., Popat S. Crinò L., Peters S. FE, Früh M, De Ruyscher D, Popat S, Crinò L, Peters S, Felip E (2013) Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **24**: vi99–vi105, doi:10.1093/annonc/mdt178.

Gabrivovich D, Nagaraj S (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*.

Gadepalli VS, Deb SP, Deb S, Rao RR (2014) Lung cancer stem cells, p53 mutations and

MDM2. *Subcell Biochem* **85**: 359–370, doi:10.1007/978-94-017-9211-0_19.

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* **64**: 7011–7021, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1364.

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc P-H, Trajanoski Z, Fridman W-H, Pagès F (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **313**: 1960–1964, doi:10.1126/science.1129139.

Gang a. O, Strøm C, Pedersen M, d'Amore F, Pedersen LM, Bukh a., Pedersen B, Moeller MB, Mortensen LS, Gadeberg O V., Ingeberg S, Mourits-Andersen T, Pulczynski S, Nully Brown P (2012) R-choep-14 improves overall survival in young high-risk patients with diffuse large b-cell lymphoma compared with r-chop-14. a population-based investigation from the danish lymphoma group. *Ann Oncol* **23**: 147–153, doi:10.1093/annonc/mdr058.

Gao J, Zhao L, Wan YY, Zhu B (2015) Mechanism of Action of IL-7 and Its Potential Applications and Limitations in Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci* **16**: 10267–10280, doi:10.3390/ijms160510267.

Gao Y, Yang W, Pan M, Scully E, Girardi M, Augenlicht LH, Craft J, Yin Z (2003) Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J Exp Med* **198**: 433–442, doi:10.1084/jem.20030584.

Garcia LM, Wilkins DE, Raaphorst GP (2007) α/β ratio: A dose range dependence study. *Int J Radiat Oncol* **67**: 587–593, doi:10.1016/j.ijrobp.2006.10.017.

Garg AD, Krysko D V, Verfaillie T, Kaczmarek A, Ferreira GB, Marysael T, Rubio N, Firczuk M, Mathieu C, Roebroek AJM, Annaert W, Golab J, de Witte P, Vandenabeele P, Agostinis P (2012) A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J* **31**: 1062–1079, doi:10.1038/emboj.2011.497.

Garg AD, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko D V., Agostinis P (2010) Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: An emerging amalgamation. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* **1805**: 53–71, doi:10.1016/j.bbcan.2009.08.003.

Gaughan EM, Cryer SK, Yeap BY, Jackman DM, Costa DB (2013) Family history of lung cancer in never smokers with non-small-cell lung cancer and its association with tumors harboring EGFR mutations. *Lung Cancer* **79**: 193–197, doi:10.1016/j.lungcan.2012.12.002.

Gazda MJ, Coia LR (1941) Principles of Radiation Therapy.

Gerber DE, Chan TA (2008) Recent advances in radiation therapy. *Am Fam Physician* **78**: 1254–1262.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**: 1417–1423.

Gibbons DL, Byers LA, Kurie JM (2014) Smoking, p53 mutation, and lung cancer. *Mol Cancer Res* **12**: 3–13, doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0539.

Gibbons JP (2001) Monitor Unit Calculations for External Photon and Electron Beams. In AAPM Annual Meeting Refresher Course, (Salt Lake City), pp. 1–10.

Girard N (2013) Other signalization targets. *Targ Oncol* **8**: 69–77, doi:10.1007/s11523-012-0246-5.

Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B,

Tigelaar RE, Hayday AC (2001) Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* **294**: 605–609, doi:10.1126/science.1063916.

Girinsky T, van der Maazen R, Specht L, Aleman B, Poortmans P, Lievens Y, Meijnders P, Ghalibafian M, Meerwaldt J, Noordijk E (2006) Involved-node radiotherapy (INRT) in patients with early Hodgkin lymphoma: Concepts and guidelines. *Radiother Oncol* **79**: 270–277, doi:10.1016/j.radonc.2006.05.015.

Gisselbrecht C (1993) Aggressive lymphomas. *Rev Prat* **43**: 1648–1653, doi:10.1056/NEJMra0807082.

Gloeckner H, Jonuleit T, Lemke HD (2001) Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue???. *J Immunol Methods* **252**: 131–138, doi:10.1016/S0022-1759(01)00347-7.

Głowala-Kosińska M, Chwieduk A, Nieckula J, Saduś-Wojciechowska M, Grosicki S, Rusin A, Nowara E, Giebel S (2013) Association of circulating regulatory T cell number with the incidence and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol* **91**: 122–128, doi:10.1111/ejh.12144.

Goldstraw P, Ball D, Jett JR, Le Chevalier T, Lim E, Nicholson AG, Shepherd F a. (2011) Non-small-cell lung cancer. *Lancet* **378**: 1727–1740, doi:10.1016/S0140-6736(10)62101-0.

Golstein P, Kroemer G (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* **32**: 37–43, doi:10.1016/j.tibs.2006.11.001.

Gomez-Casal R, Bhattacharya C, Ganesh N, Bailey L, Basse P, Gibson M, Epperly M, Levina V (2013) Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes. *Mol Cancer* **12**: 94, doi:10.1186/1476-4598-12-94.

Gonçalves AC, Alves V, Silva T, Carvalho C, Oliveira CR De, Sarmiento-Ribeiro AB (2013a) Oxidative stress mediates apoptotic effects of ascorbate and dehydroascorbate in human Myelodysplasia cells in vitro. *Toxicol Vitro* **27**: 1542–1549, doi:10.1016/j.tiv.2013.03.009.

Gonçalves AC, Barbosa-Ribeiro A, Alves V, Silva T, Sarmiento-Ribeiro AB (2013b) Selenium Compounds Induced ROS-Dependent Apoptosis in Myelodysplasia Cells. *Biol Trace Elem Res* **154**: 440–447, doi:10.1007/s12011-013-9749-x.

Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G (2009) Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* **9**: 353–363, doi:10.1038/nri2545.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**: 883–899, doi:10.1016/j.cell.2010.01.025.

Grivennikov SI, Karin M (2011) Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. *Ann Rheum Dis* **70 Suppl 1**: i104–i108, doi:10.1136/ard.2010.140145.

Grivicich V, Regner A, Rocha AB (2007) Morte Celular por Apoptose. *Rev Bras Cancerol* **53**: 335–343, doi:10.1590/S0102-311X2003000200031.

Groeger a. M, Esposito V, De Luca a., Cassandro R, Tonini G, Ambrogi V, Baldi F, Goldfarb R, Mineo TC, Baldi a., Wolner E (2004) Prognostic value of immunohistochemical expression of p53, bax, Bcl-2 and Bcl-xL in resected non-small-cell lung cancers. *Histopathology* **44**: 54–63, doi:10.1111/j.1365-2559.2004.01750.x.

Groh V, Wu J, Yee C, Spies T (2002) Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* **419**: 734–738,

doi:10.1038/nature01112.

Gudkov A V, Komarova E a (2003) The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer* **3**: 117–129, doi:10.1038/nrc992.

Gudkov A V., Komarova E a. (2010) Radioprotection: Smart games with death. *J Clin Invest* **120**: 2270–2273, doi:10.1172/JCI43794.

Habermann TM, Weller E a., Morrison V a., Gascoyne RD, Cassileth P a., Cohn JB, Dakhil SR, Woda B, Fisher RI, Peterson B a., Horning SJ (2006) Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* **24**: 3121–3127, doi:10.1200/JCO.2005.05.1003.

Hald SM, Bremnes RM, Al-Shibli K, Al-Saad S, Andersen S, Stenvold H, Busund L-TT, Donnem T (2013) CD4/CD8 co-expression shows independent prognostic impact in resected non-small cell lung cancer patients treated with adjuvant radiotherapy. *Lung Cancer* **80**: 209–215, doi:10.1016/j.lungcan.2012.12.026.

Hall EJ (1985) Radiation biology.

Hall EJ (2000) Radiobiology for the Radiologist (Lippicott Williams & Wilkins).

Halliwell B (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* **35**: 1147–1150, doi:10.1042/BST0351147.

Hammerschmidt S, Wirtz H (2009) Lung Cancer: Current Diagnosis and Treatment. *Dtsch Arztebl Int* **106**: 809–820, doi:10.3238/arztebl.2009.0809.

Han JY, Chung YJ, Park SW, Kim JS, Rhyu MG, Kim HK, Lee KS (1999) The relationship between cisplatin-induced apoptosis and p53, bcl-2 and bax expression in human lung cancer cells. *Korean J Intern Med* **14**: 42–52.

Han Y, Wang Y, Xu HT, Yang LH, Wei Q, Liu Y, Zhang Y, Zhao Y, Dai SD, Miao Y, Yu JH, Zhang JY, Li G, Yuan XM, Wang EH (2009) X-Radiation Induces Non-Small-Cell Lung Cancer Apoptosis by Upregulation of Axin Expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **75**: 518–526, doi:10.1016/j.ijrobp.2009.05.040.

Hanahan D, Weinberg R a. (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**: 57–70, doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

Hanahan D, Weinberg R a. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**: 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hansakul P, Aree K, Tanuchit S, Itharat A (2014) Growth arrest and apoptosis via caspase activation of dioscoreanone in human non-small-cell lung cancer A549 cells. *BMC Complement Altern Med* **14**: 413, doi:10.1186/1472-6882-14-413.

Hansen MH, Nielsen H, Ditzel HJ (2001) The tumor-infiltrating B cell response in medullary breast cancer is oligoclonal and directed against the autoantigen actin exposed on the surface of apoptotic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12659–12664, doi:10.1073/pnas.171460798.

Hawley L (2013) Principles of radiotherapy. In *British Journal of Hospital Medicine* (London, England : 2005), G. Bonnadona, and R. della C. G, eds. pp. C166–C169.

Held G, Murawski N, Ziepert M, Fleckenstein J, Poschel V, Zwick C, Bittenbring J, Hanel M, Wilhelm S, Schubert J, Schmitz N, Loffler M, Rube C, Pfreundschuh M (2014) Role of radiotherapy to bulky disease in elderly patients with aggressive B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* **32**: 1112–1118, doi:10.1200/JCO.2013.51.4505.

Held KD (2010) Basic clinical radiobiology. *Int J Radiat Biol* **86**: 996, doi:10.3109/09553002.2010.496030.

Herber DL, Cao W, Nefedova Y, Novitskiy S V, Nagaraj S, Tyurin VA, Corzo A, Cho H-I, Celis E, Lennox B, Knight SC, Padhya T, McCaffrey T V, McCaffrey JC, Antonia S, Fishman M, Ferris RL, Kagan VE, Gabilovich DI (2010) Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nat Med* **16**: 880–886, doi:10.1038/nm.2172.

Herrmann MK a, Bloch E, Overbeck T, Koerber W, Wolff H a, Hille a, Vorwerk H, Hess CF, Muller M, Christiansen H, Pradier O (2011) Mediastinal radiotherapy after multidrug chemotherapy and prophylactic cranial irradiation in patients with SCLC--treatment results after long-term follow-up and literature overview. *Cancer Radiother* **15**: 81–88, doi:10.1016/j.canrad.2010.03.017.

Heuvers ME, Aerts JG, Cornelissen R, Groen H, Hoogsteden HC (2012) Patient-tailored modulation of the immune system may revolutionize future lung cancer treatment. *BMC Cancer* **580**: 1–12.

Heylmann D, Rödel F, Kindler T, Kaina B (2014) Radiation sensitivity of human and murine peripheral blood lymphocytes, stem and progenitor cells. *Biochim Biophys Acta* **1846**: 121–129, doi:10.1016/j.bbcan.2014.04.009.

Hiraoka K, Miyamoto M, Cho Y, Suzuoki M, Oshikiri T, Nakakubo Y, Itoh T, Ohbuchi T, Kondo S, Katoh H (2006) Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *Br J Cancer* **94**: 275–280, doi:10.1038/sj.bjc.6602934.

Hong F, Habermann TM, Gordon LI, Hochster H, Gascoyne RD, Morrison V a., Fisher RI, Bartlett NL, Stiff PJ, Cheson BD, Crump M, Horning SJ, Kahl BS (2014) The role of body mass index in survival outcome for lymphoma patients: US intergroup experience. *Ann Oncol* **25**: 669–674, doi:10.1093/annonc/mdt594.

Horning SJ, Weller E, Kim K, Earle JD, O'Connell MJ, Habermann TM, Glick JH (2004) Chemotherapy with or without radiotherapy in limited-stage diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma: Eastern Cooperative Oncology Group Study 1484. *J Clin Oncol* **22**: 3032–3038, doi:10.1200/JCO.2004.06.088.

Horwitz SM, Negrin RS, Blume KG, Breslin S, Stuart MJ, Stockerl-Goldstein KE, Johnston LJ, Wong RM, Shizuru J a., Horning SJ (2004) Rituximab as adjuvant to high-dose therapy and autologous hematopoietic cell transplantation for aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **103**: 777–783, doi:10.1182/blood-2003-04-1257.

Howington JA, Blum MG, Chang AC, Balekian AA, Murthy SC (2013a) Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* **143**: e278S – 313S, doi:10.1378/chest.12-2359.

Howington JA, Blum MG, Chang AC, Balekian AA, Murthy SC, Scott WJ, Howington JA, Feigenberg S, Movsas B, Pisters K (2013b) Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* **132**: e278S – 313S, doi:10.1378/chest.12-2359.

Huang T-C, Hsiao C-Y, Chien C-R, Liang J-A, Shih T-C, Zhang GG (2013) IMRT treatment plans and functional planning with functional lung imaging from 4D-CT for thoracic cancer patients. *Radiat Oncol* **8**: 3, doi:10.1186/1748-717X-8-3.

Hubers a J, Prinsen CFM, Sozzi G, Witte BI, Thunnissen E (2013) Molecular sputum analysis for the diagnosis of lung cancer. *Br J Cancer* **109**: 530–537, doi:10.1038/bjc.2013.393.

Hudson B, Hudson G, Maclennan K, Anderson L, Linch D (1994) Clinical Stage-1 Non-Hodgkins-Lymphoma - Long-Term Follow-Up of Patients Treated By the British National Lymphoma Investigation With Radiotherapy Alone As Initial Therapy. *Bristish J Cancer*

1088–1093.

Ikushima H (2010) Radiation therapy: state of the art and the future. *J Med Investig* **57**: 1–11, doi:10.2152/jmi.57.1.

Illidge T (2011) X. When should radiotherapy be used in lymphoma? *Ann Oncol* **22**: iv57–iv60, doi:10.1093/annonc/mdr176.

Illidge T, Tolan S (2008) Current treatment approaches for diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* **49**: 663–676, doi:10.1080/10428190701882187.

Inoue HK, Nakajima A, Sato H, Noda S, Saitoh J, Suzuki Y (2015) Image Fusion for Radiosurgery, Neurosurgery and Hypofractionated Radiotherapy. *Cureus* **7**: e252, doi:10.7759/cureus.252.

Invitrogen Corporation (1996) alamarBlue ® Assay.

Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, Johnson N a., Vose JM, Greiner TC, Connors JM, Staudt LM, Rimsza L, Jaffe E, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Campo E, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Gascoyne RD, Armitage JO, Weisenburger DD, Chan WC (2011) BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin Cancer Res* **17**: 7785–7795, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0267.

Isa N (2014) Evidence based radiation oncology with existing technology. *Reports Pract Oncol Radiother J Gt Cancer Cent Poznań Polish Soc Radiat Oncol* **19**: 259–266, doi:10.1016/j.rpor.2013.09.002.

Jackman DM, Johnson BE (2005) Small-cell lung cancer. *Lancet* **366**: 1385–1396, doi:10.1016/S0140-6736(05)67569-1.

Jain M, Kasetty S, Khan S, Desai A (2014) An Insight to Apoptosis. *J Res Pract Dent* **2014**: 1–12, doi:10.5171/2014.372284.

Janjan N, Miller M, Schusterman MA (2006) Therapeutic principles and options in radiation oncology.

Jassem J (2007) The role of radiotherapy in lung cancer: Where is the evidence? *Radiother Oncol* **83**: 203–213, doi:10.1016/j.radonc.2007.04.004.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**: 69–90, doi:10.3322/caac.20107.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ (2009) Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* **59**: 225–249, doi:10.3322/caac.20006.

Jeremic B (2005) *Advances in Radiation Oncology in Lung Cancer* (Berlin/Heidelberg: Springer).

Jerusalem G, Beguin Y, Fassotte MF, Najjar F, Paulus P, Rigo P, Fillet G (1999) Whole-body positron emission tomography using 18F-fluorodeoxyglucose for posttreatment evaluation in Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma has higher diagnostic and prognostic value than classical computed tomography scan imaging. *Blood* **94**: 429–433.

Jinushi M, Hodi FS, Dranoff G (2008) Enhancing the clinical activity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor cell vaccines. *Immunol Rev* **222**: 287–298, doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00618.x.

Johnson BBEB, Crawford J, Downey RJR, Ettinger DS, Fossella F, Grecula JC, Jahan T, Kalemkerian GP, Kessinger A, Koczywas M, Langer CJ, Martins R, Marymont MH, Niell HB, Ramnath N, Robert F, Williams CC (2006) Small cell lung cancer clinical practice guidelines in oncology. *Cancer Netw* **4**: 602–622.

Joiner M, Kogel A van der (2009) *Basic Clinical Radiobiology* (London).

- Jones B, Tan LT, Dale RG (1995) Derivation of the optimum dose per fraction from the linear quadratic model. *Br J Radiol* **68**: 894–902, doi:10.1259/0007-1285-68-812-894.
- Jorgensen TJ (2009) Enhancing radiosensitivity: Targeting the DNA repair pathways. *Cancer Biol Ther* **8**: 665–670, doi:10.4161/cbt.8.8.8304.
- Junger WG (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* **11**: 201–212, doi:10.1038/nri2938.
- Juweid ME, Cheson BD (2005) Role of positron emission tomography in lymphoma. *J Clin Oncol* **23**: 4577–4580, doi:10.1200/JCO.2005.01.904.
- Juweid ME, Stroobants S, Hoekstra OS, Mottaghy FM, Dietlein M, Guermazi A, Wiseman G a., Kostakoglu L, Scheidhauer K, Buck A, Naumann R, Spaepen K, Hicks RJ, Weber W a., Reske SN, Schwaiger M, Schwartz LH, Zijlstra JM, Siegel B a., Cheson BD (2007) Use of positron emission tomography for response assessment of lymphoma: Consensus of the imaging subcommittee of international harmonization project in lymphoma. *J Clin Oncol* **25**: 571–578, doi:10.1200/JCO.2006.08.2305.
- Juweid ME, Wiseman G a., Vose JM, Ritchie JM, Menda Y, Wooldridge JE, Mottaghy FM, Rohren EM, Blumstein NM, Stolpen A, Link BK, Reske SN, Graham MM, Cheson BD (2005) Response assessment of aggressive non-Hodgkin's lymphoma by integrated International Workshop Criteria and fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Clin Oncol* **23**: 4652–4661, doi:10.1200/JCO.2005.01.891.
- Kachikwu EL, Iwamoto KS, Liao YP, Demarco JJ, Agazaryan N, Economou JS, McBride WH, Schaefer D (2011) Radiation enhances regulatory T cell representation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **81**: 1128–1135, doi:10.1016/j.ijrobp.2010.09.034.
- Kalemkerian GP, Akerley W, Bogner P, Borghaei H, Chow LQ, Downey RJ, Gandhi L, Kishor A, Ganti P, Govindan R, Grecula JC, Hayman J, Heist RS, Horn L, Jahan T, Koczywas M, Jr BWL, Merritt RE, Moran C a., Niell HB, O'Malley J, Patel JD, Ready N, Rudin CM, Jr CCW, Gregory K, Hughes M (2006) Small cell lung cancer clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Cancer Netw* **11**: 78–98.
- Kamath SS, Marcus RB, Lynch JW, Mendenhall NP (1999) The impact of radiotherapy dose and other treatment-related and clinical factors on in-field control in stage I and II non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **44**: 563–568, doi:10.1016/S0360-3016(99)00051-6.
- Kaminski MS, Coleman CN, Colby T V., Cox RS, Rosenberg S a. (1986) Factors predicting survival in adults with stage I and II large-cell lymphoma treated with primary radiation therapy. *Ann Intern Med* **104**: 747–756.
- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD (1998) Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7556–7561.
- Kastan MB, Bartek J (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**: 316–323, doi:10.1038/nature03097.
- Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Muto S, Tamura A, Iio M, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinai K, Nakagama H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S (2009) Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* **459**: 712–716, doi:10.1038/nature07969.
- Kazarian M, Laird-Offringa I a (2011) Small-cell lung cancer-associated autoantibodies: potential applications to cancer diagnosis, early detection, and therapy. *Mol Cancer* **10**: 33, doi:10.1186/1476-4598-10-33.

Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G (2011) Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **10**: 221–237, doi:10.1038/nrd3373.

Kerr KM (2012) Personalized medicine for lung cancer : new challenges for pathology. *Histopathology* **60**: 531–546, doi:10.1111/j.1365-2559.2011.03854.x.

Khan FM, Stathakis S (2010) *The Physics of Radiation Therapy* (Lippincott Williams & Wilkins).

Kim HS, Mitsudomi T, Soo RA, Cho BC (2013) Personalized therapy on the horizon for squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* **80**: 249–255, doi:10.1016/j.lungcan.2013.02.015.

Kim R, Emi M, Tanabe K (2007) Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **121**: 1–14, doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x.

Kirkpatrick JP, Brenner DJ, Orton CG (2009) The linear-quadratic model is inappropriate to model high dose per fraction effects in radiosurgery. *Med Phys* **36**: 3381, doi:10.1118/1.3157095.

Kirkpatrick JP, Meyer JJ, Marks LB (2008) The Linear-Quadratic Model Is Inappropriate to Model High Dose per Fraction Effects in Radiosurgery. *Semin Radiat Oncol* **18**: 240–243, doi:10.1016/j.semradonc.2008.04.005.

Kitamura T, Qian B-Z, Soong D, Cassetta L, Noy R, Sugano G, Kato Y, Li J, Pollard JW (2015) CCL2-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages. *J Exp Med* **212**: 1043–1059, doi:10.1084/jem.20141836.

Klages K, Mayer CT, Lahl K, Loddenkemper C, Teng MWL, Ngiow SF, Smyth MJ, Hamann A, Huehn J, Sparwasser T (2010) Selective Depletion of Foxp3+ Regulatory T Cells Improves Effective Therapeutic Vaccination against Established Melanoma. *Cancer Res* **70**: 7788–7799, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1736.

Klimstra DS (2005) In Reply: *J Clin Oncol* **23**: 4796–4797, doi:10.1200/JCO.2005.05.705.

Kobayashi K, Hagiwara K (2013) Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation and personalized therapy in advanced nonsmall cell lung cancer (NSCLC). *Targ Oncol* **8**: 27–33, doi:10.1007/s11523-013-0258-9.

Kocher M, Treuer H, Voges J, Hoevels M, Sturm V, Müller RP (2000) Computer simulation of cytotoxic and vascular effects of radiosurgery in solid and necrotic brain metastases. *Radiother Oncol* **54**: 149–156.

Kollar L, Rengan R (2014) Stereotactic Body Radiotherapy. *Semin Oncol* **41**: 776–789, doi:10.1053/j.seminoncol.2014.09.022.

Kortylewski M, Yu H (2008) Role of Stat3 in suppressing anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* **20**: 228–233, doi:10.1016/j.coi.2008.03.010.

Kouro T, Takatsu K (2009) IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *Int Immunol* **21**: 1303–1309, doi:10.1093/intimm/dxp102.

Krämer A, Lukas J, Bartek J (2004) Checking out the centrosome. *Cell Cycle* **3**: 1390–1393, doi:10.4161/cc.3.11.1252.

Kruiswijk F, Labuschagne CF, Vousden KH (2015) P53 in Survival, Death and Metabolic Health: a Lifeguard With a Licence To Kill. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**: 393–405, doi:10.1038/nrm4007.

Krysko D V, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P (2012) Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **12**: 860–875,

doi:10.1038/nrc3380.

Krysko D V., Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, Vandenabeele P (2011) Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol* **32**: 157–164, doi:10.1016/j.it.2011.01.005.

Krysko O, Løve Aaes T, Bachert C, Vandenabeele P, Krysko D V (2013) Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell Death Dis* **4**: e631, doi:10.1038/cddis.2013.156.

Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh W V, Kastan MB (1992) Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 7491–7495.

Lababede O, Meziane M, Rice T (2011) Seventh edition of the cancer staging manual and stage grouping of lung cancer: quick reference chart and diagrams. *Chest* **139**: 183–189, doi:10.1378/chest.10-1099.

Ladoire S, Mignot G, Dabakuyo S, Arnould L, Apetoh L, Rébé C, Coudert B, Martin F, Bizollon MH, Vanoli A, Coutant C, Fumoleau P, Bonnetain F, Ghiringhelli F (2011) In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. *J Pathol* **224**: 389–400, doi:10.1002/path.2866.

Lamelas IP, Arca JA, Fírvida L (2012) Directed Therapies in Lung Cancer : New Hope ? *Elsevier Doyma* **48**: 367–371.

Landberg TG, Håkansson LG, Möller TR, Mattsson WK, Landys KE, Johansson BG, Killander DC, Molin BF, Westling PF, Lenner PH, Dahl OG (1979) CVP-remission-maintenance in stage I or II non-Hodgkin's lymphomas: preliminary results of a randomized study. *Cancer* **44**: 831–838.

Laranjo M, Serra AC, Abrantes M, Piñeiro M, Gonçalves AC, Casalta-Lopes J, Carvalho L, Sarmiento-Ribeiro AB, Rocha-Gonsalves A, Botelho F (2013) 2-Bromo-5-hydroxyphenylporphyrins for photodynamic therapy: Photosensitization efficiency, subcellular localization and in vivo studies. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **10**: 51–61, doi:10.1016/j.pdpdt.2012.05.003.

Laws JW (2006) The Royal College of Radiologists Radiotherapy and oncology. *Br J Radiol* **48**: 960–960, doi:10.1259/0007-1285-48-575-960-a.

Lee JH, Kim SY, Kil IS, Park J-W (2007) Regulation of ionizing radiation-induced apoptosis by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* **282**: 13385–13394, doi:10.1074/jbc.M700303200.

Lenz G, Davis RE, Ngo VN, Lam L, George TC, Wright GW, Dave SS, Zhao H, Xu W, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Chan WC, Staudt LM (2008a) Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* **319**: 1676–1679, doi:10.1126/science.1153629.

Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, Xu W, Tan B, Goldschmidt N, Iqbal J, Vose J, Bast M, Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Armitage JO, Kyle a, May L, Gascoyne RD, Connors JM, Troen G, Holte H, Kvaloy S, Dierickx D, Verhoef G, Delabie J, Smeland EB, Jares P, Martinez a, Lopez-Guillermo a, Montserrat E, Campo E, Braziel RM, Miller TP, Rimsza LM, Cook JR, Pohlman B, Sweetenham J, Tubbs RR, Fisher RI, Hartmann E, Rosenwald a, Ott G, Muller-Hermelink H-K, Wrench D, Lister T a, Jaffe ES, Wilson WH, Chan WC, Staudt LM (2008b) Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* **359**: 2313–2323, doi:10.1056/NEJMoa0802885.

Lenz G, Wright GW, Emre NCT, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, Carty S, Lam LT, Shaffer a L, Xiao W, Powell J, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Rimsza LM, Fisher RI, Weisenburger

DD, Chan WC, Staudt LM (2008c) Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 13520–13525, doi:10.1073/pnas.0804295105.

Leone FT, Evers-Casey S, Toll BA, Vachani A (2013) Treatment of tobacco use in lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* **143**: e61S – 77S, doi:10.1378/chest.12-2349.

Li N, Grivennikov SI, Karin M (2011) The unholy trinity: inflammation, cytokines, and STAT3 shape the cancer microenvironment. *Cancer Cell* **19**: 429–431, doi:10.1016/j.ccr.2011.03.018.

Li X, Kostareli E, Suffner J, Garbi N, Hämmerling GJ (2010) Efficient Treg depletion induces T-cell infiltration and rejection of large tumors. *Eur J Immunol* **40**: 3325–3335, doi:10.1002/eji.201041093.

Lien J-C, Huang C-C, Lu T-J, Tseng C-H, Sung P-J, Lee H-Z, Bao B-Y, Kuo Y-H, Lu T-L (2015) Naphthoquinone derivative PPE8 induces endoplasmic reticulum stress in p53 null H1299 cells. *Oxid Med Cell Longev* **2015**: 453679, doi:10.1155/2015/453679.

Lima JJP de (2014) Biofísica médica (Coimbra).

Lind H, Zienolddiny S, Ryberg D, Skaug V, Phillips DH, Haugen A (2005) Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism and risk of lung cancer: A possible interaction with polymorphisms in the interleukin 1 beta gene. *Lung Cancer* **50**: 285–290, doi:10.1016/j.lungcan.2005.07.003.

Liston A, Gray DHD (2014) Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nat Rev Immunol* **14**: 154–165, doi:10.1038/nri3605.

Little CD, Nau MM, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* **306**: 194–196.

Liu R, Liu X, Zheng Y, Gu J, Xiong S, Jiang P, Jiang X, Huang E, Yang Y, Ge D, Chu Y (2014) MicroRNA-7 sensitizes non-small cell lung cancer cells to paclitaxel. *Oncol Lett* **8**: 2193–2200, doi:10.3892/ol.2014.2500.

Loriot Y, Mordant P, Dugue D, Geneste O, Gombos A, Opolon P, Guegan J, Perfettini J-L, Pierre A, Berthier LK, Kroemer G, Soria JC, Depil S, Deutsch E (2014) Radiosensitization by a novel Bcl-2 and Bcl-XL inhibitor S44563 in small-cell lung cancer. *Cell Death Dis* **5**: e1423, doi:10.1038/cddis.2014.365.

Lowery DM, Mohammad DH, Elia AEH, Yaffe MB (2004) The Polo-Box Domain and its role in cell cycle regulation. *Therapy* **3**: 128–131.

Lowry L, Smith P, Qian W, Falk S, Benstead K, Illidge T, Linch D, Robinson M, Jack A, Hoskin P (2011) Reduced dose radiotherapy for local control in non-Hodgkin lymphoma: A randomised phase III trial. *Radiother Oncol* **100**: 86–92, doi:10.1016/j.radonc.2011.05.013.

Lukas J, Lukas C, Bartek J (2004) Mammalian cell cycle checkpoints: Signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* **3**: 997–1007, doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.006.

Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB (2005) Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 439–448, doi:10.1038/nrm1660.

Lutschg JH (2009) Lung cancer. (Blackwell).

Ma Y, Aymeric L, Locher C, Kroemer G, Zitvogel L (2011a) The dendritic cell-tumor cross-talk in cancer. *Curr Opin Immunol* **23**: 146–152, doi:10.1016/j.coi.2010.09.008.

Ma Y, Aymeric L, Locher C, Mattarollo SR, Delahaye NF, Pereira P, Boucontet L, Apetoh

L, Ghiringhelli F, Casares N, Lasarte JJ, Matsuzaki G, Ikuta K, Ryffel B, Benlagha K, Tesnière A, Ibrahim N, Déchanet-Merville J, Chaput N, Smyth MJ, Kroemer G, Zitvogel L (2011b) Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J Exp Med* **208**: 491–503, doi:10.1084/jem.20100269.

Ma Y, Conforti R, Aymeric L, Locher C, Kepp O, Kroemer G, Zitvogel L (2011c) How to improve the immunogenicity of chemotherapy and radiotherapy. *Cancer Metastasis Rev* **30**: 71–82, doi:10.1007/s10555-011-9283-2.

Macip S (2002) Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J* **21**: 2180–2188, doi:10.1093/emboj/21.9.2180.

Macip S, Kosoy A, Lee SW, O'Connell MJ, Aaronson SA (2006) Oxidative stress induces a prolonged but reversible arrest in p53-null cancer cells, involving a Chk1-dependent G2 checkpoint. *Oncogene* **25**: 6037–6047, doi:10.1038/sj.onc.1209629.

Maehata Y, Onishi H, Kuriyama K, Aoki S, Araya M, Saito R, Tominaga L, Oguri M, Araki T (2013) Immune responses following stereotactic body radiotherapy for stage I primary lung cancer. *Biomed Res Int* **2013**: 731346, doi:10.1155/2013/731346.

Makidono R, Ito A (1997) Radioresistant CD4+ T cells in normal, unprimed mice: with verification of the Bergonie-Tribondeau law. *Nihon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* **57**: 815–817.

Mamede AC, Pires AS, Abrantes AM, Tavares SD, Gonçalves AC, Casalta-Lopes JE, Sarmiento-Ribeiro AB, Maia JM, Botelho MF (2012) Cytotoxicity of Ascorbic Acid in a Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (WiDr): In Vitro and In Vivo Studies. *Nutr Cancer* **64**: 1049–1057, doi:10.1080/01635581.2012.713539.

Maraldo M V, Aznar MC, Vogelius IR, Petersen PM, Specht L (2013) Involved node radiation therapy: an effective alternative in early-stage hodgkin lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **85**: 1057–1065, doi:10.1016/j.ijrobp.2012.08.041.

Marín-Ramos NI, Alonso D, Ortega-Gutiérrez S, Ortega-Nogales FJ, Balabasquer M, Vázquez-Villa H, Andradas C, Blasco-Benito S, Pérez-Gómez E, Canales Á, Jiménez-Barbero J, Marquina A, del Prado JM, Sánchez C, Martín-Fontecha M, López-Rodríguez ML (2015) New inhibitors of angiogenesis with antitumor activity in vivo. *J Med Chem* **58**: 3757–3766, doi:10.1021/jm5019252.

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

Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J (2008) Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch Toxicol* **82**: 273–299, doi:10.1007/s00204-008-0304-z.

Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**: 1160–1166, doi:10.1126/science.1140321.

Maurer MJ, Ghesquières H, Jais JP, Witzig TE, Haioun C, Thompson C a., Delarue R, Micallef IN, Peyrade F, Macon WR, Molina TJ, Ketterer N, Syrbu SI, Fitoussi O, Kurtin PJ, Allmer C, Nicolas-Virelizier E, Slager SL, Habermann TM, Link BK, Salles G, Tilly H, Cerhan JR (2014) Event-free survival at 24 months is a robust end point for disease-related outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *J Clin Oncol* **32**: 1066–1073, doi:10.1200/JCO.2013.51.5866.

Maurer MJ, Micallef INM, Cerhan JR, Katzmann J a., Link BK, Colgan JP, Habermann TM, Inwards DJ, Markovic SN, Ansell SM, Porrata LF, Johnston PB, Nowakowski GS, Thompson C a., Gupta M, Syrbu SI, Kurtin PJ, Macon WR, Nikcevich D a., Witzig TE (2011) Elevated serum free light chains are associated with event-free and overall survival in two independent cohorts of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* **29**: 1620–1626, doi:10.1200/JCO.2010.29.4413.

Mazzone P, Mekhail T (2012) Current and emerging medical treatments for non-small cell lung cancer: A primer for pulmonologists. *Respir Med* **106**: 473–492, doi:10.1016/j.rmed.2011.10.016.

McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, Liu Y, Graves AP, Iii ADP, Diaz E, LaFrance L V., Mellinger M, Duquette C, Tian X, Kruger RG, McHugh CF, Brandt M, Miller WH, Dhanak D, Verma SK, Tummino PJ, Creasy CL (2012) EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* **492**: 108–112, doi:10.1038/nature11606.

McIlwrath AJ, Vasey P a, Ross GM, McIlwrath AJ, Brown R (1994) Cell Cycle Arrests and Radiosensitivity of Human Tumor Cell Lines: Dependence on Wild-Type p53 for Radiosensitivity Advances in Brief Cell Cycle Arrests and Radiosensitivity of Human Tumor Cell Lines: Dependence on Wild-Type p53 for Radiosensitivity'. *Cancer Res* 3718–3722.

Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**: 428–435, doi:10.1038/nature07201.

Medzhitov R, Janeway C (2000) Innate immunity. *N Engl J Med* **343**: 338–344, doi:10.1056/NEJM200008033430506.

Meek DW (2015) Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem J* **469**: 325–346, doi:10.1042/BJ20150517.

Mello RA De, Costa BM, Reis RM, Hespanhol V (2012) Insights into Angiogenesis in Non-Small Cell Lung Cancer: Molecular Mechanisms, Polymorphic Genes, and Targeted Therapies. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **7**: 118–131.

Mendes F, Antunes C, Abrantes AM, Gonçalves A, Nobre-Gois I, Sarmento-Ribeiro AB, Botelho MF, Rosa MS (2015a) Lung cancer: the immune system and radiation. *Br J Biomed Sci* **72**: 78–84.

Mendes F, Domingues C, Rodrigues-Santos P, Abrantes AM, Gonçalves AC, Estrela J, Encarnação J, Pires AS, Laranjo M, Alves V, Teixeira R, Sarmento AB, Botelho MF, Rosa MS (2016) The role of immune system exhaustion on cancer cells escape and anti-tumor immune induction after irradiation. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* doi:10.1016/j.bbcan.2016.02.002.

Mendes F, Domingues C, Teixeira R, Abrantes AM, Gonçalves AC, Nobre-Gois I, Jacobetty M, Sarmento AB, Botelho MF, Rosa MS (2015b) The importance of radiotherapy on diffuse large B cell lymphoma treatment: a current review. *Cancer Metastasis Rev* **34**: 511–525, doi:10.1007/s10555-015-9581-1.

Mendes F, Sales T, Domingues C, Schugk S, Abrantes AM, Gonçalves AC, Teixeira R, Silva R, Casalta-Lopes J, Rocha C, Laranjo M, Simões PC, Sarmento Ribeiro AB, Botelho MF, Rosa MS (2015c) Effects of X-radiation on lung cancer cells: the interplay between oxidative stress and P53 levels. *Med Oncol* **32**: 1–9, doi:10.1007/s12032-015-0712-x.

Menetrier-Caux C, Gobert M, Caux C (2009) Differences in Tumor Regulatory T-Cell Localization and Activation Status Impact Patient Outcome. *Cancer Res* **69**: 7895–7898, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1642.

Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS de, Cruvinel W de M, Andrade

LEC, Silva NP da (2010) Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reumatol* **50**: 552–580, doi:10.1590/S0482-50042010000500008.

Meyer TN, Silva a. L Da (1999) Resposta celular ao estresse. *Rev Assoc Med Bras* **45**: 181–188, doi:10.1590/S0104-42301999000200016.

Mikhaeel NG, Hutchings M, Fields P a., O'Doherty MJ, Timothy a. R (2005) FDG-PET after two to three cycles of chemotherapy predicts progression-free and overall survival in high-grade non-Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol* **16**: 1514–1523, doi:10.1093/annonc/mdi272.

Mikhaeel NG, Timothy a R, O'Doherty MJ, Hain S, Maisey MN (2000) 18-FDG-PET as a prognostic indicator in the treatment of aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma-comparison with CT. *Leuk Lymphoma* **39**: 543–553, doi:10.3109/10428190009113384.

Miller TP, Dahlberg S, Cassady JR, Adelstein DJ, Spier CM, Grogan TM, LeBlanc M, Carlin S, Chase E, Fisher RI (1998) Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized intermediate- and high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* **339**: 21–26, doi:10.1056/NEJM199807023390104.

Mirski SE, Gerlach JH, Cole SP (1987) Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer Res* **47**: 2594–2598.

Mitchell JB, Choudhuri R, Fabre K, Sowers AL, Citrin D, Zabludoff SD, Cook J a. (2010) In vitro and in vivo radiation sensitization of human tumor cells by a novel checkpoint kinase inhibitor, AZD7762. *Clin Cancer Res* **16**: 2076–2084, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-3277.

Mohiuddin K, Haneuse S, Sofer T, Gill R, Jaklitsch MT, Colson YL, Wee J, Bueno R, Mentzer SJ, Sugarbaker DJ, Swanson SJ (2014) Relationship between margin distance and local recurrence among patients undergoing wedge resection for small (≤ 2 cm) non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* **147**: 1169–1175; discussion 1175–1177, doi:10.1016/j.jtcvs.2013.11.056.

Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei A a (2008) Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* **83**: 584–594, doi:10.4065/83.5.584.

Molinari M, Mercurio C, Dominguez J, Goubin F, Draetta GF (2000) Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Rep* **1**: 71–79, doi:10.1093/embo-reports/kvd018.

Monfardini S, Banfi a, Bonadonna G, Rilke F, Milani F, Valagussa P, Lattuada a (1980) Improved five year survival after combined radiotherapy-chemotherapy for stage I-II non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **6**: 125–134, doi:10.1016/0360-3016(80)90189-3.

Montero J, Dutta C, van Bodegom D, Weinstock D, Letai A (2013) p53 regulates a non-apoptotic death induced by ROS. *Cell Death Differ* **20**: 1465–1474, doi:10.1038/cdd.2013.52.

Moreira AL, Thornton RH (2012) Personalized Medicine for Non – Small-Cell Lung Cancer : Implications of Recent Advances in Tissue Acquisition for Molecular and Histologic Testing. *CLLC* **13**: 334–339, doi:10.1016/j.clc.2012.01.004.

Morin RD, Johnson N a, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, Paul JE, Boyle M, Woolcock BW, Kuchenbauer F, Yap D, Humphries RK, Griffith OL, Shah S, Zhu H, Kimbara M, Shashkin P, Charlot JF, Tcherpakov M, Corbett R, Tam A, Varhol R, Smailus D, Moksa M, Zhao Y, Delaney A, Qian H, Birol I, Schein J, Moore R, Holt R, Horsman DE, Connors JM, Jones S,

Aparicio S, Hirst M, Gascoyne RD, Marra M a (2010) Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* **42**: 181–185, doi:10.1038/ng.518.

Mortaza S, Allameh A, Mortaz E, Garssen J, Folkerts G, Barnes PJ, Adcock IM (2015) Pharmacogenomics and targeted therapy of cancer : Focusing on non-small cell lung cancer. *Eur J Pharmacol* **754**: 82–91, doi:10.1016/j.ejphar.2015.02.029.

Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS (2006) Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* **107**: 265–276, doi:10.1182/blood-2005-06-2508.

Mougiakakos D, Johansson CC, Trocme E, All-Ericsson C, Economou MA, Larsson O, Seregard S, Kiessling R (2010) Intratumoral forkhead box P3-positive regulatory T cells predict poor survival in cyclooxygenase-2-positive uveal melanoma. *Cancer* **116**: 2224–2233, doi:10.1002/cncr.24999.

Mueller CG, Boix C, Kwan W-H, Daussy C, Fournier E, Fridman WH, Molina TJ (2007) Critical role of monocytes to support normal B cell and diffuse large B cell lymphoma survival and proliferation. *J Leukoc Biol* **82**: 567–575, doi:10.1189/jlb.0706481.

Mukaida N (2000) The roles of cytokine receptors in diseases. *Rinsho Byori* **48**: 409–415.

Müller C, Murawski N, Wiesen MHJ, Held G, Poeschel V, Zeynalova S, Wenger M, Nickenig C, Peter N, Lengfelder E, Metzner B, Rixecker T, Zwick C, Pfreundschuh M, Reiser M (2012) The role of sex and weight on rituximab clearance and serum elimination half-life in elderly patients with DLBCL. *Blood* **119**: 3276–3284, doi:10.1182/blood-2011-09-380949.

Multhoff G, Radons J (2012) Radiation, Inflammation, and Immune Responses in Cancer. *Front Oncol* **2**: 58, doi:10.3389/fonc.2012.00058.

Murray AW (2004) Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. *Cell* **116**: 221–234, doi:10.1016/S0092-8674(03)01080-8.

Murshid A, Gong J, Calderwood SK (2010) Heat Shock Protein 90 Mediates Efficient Antigen Cross Presentation through the Scavenger Receptor Expressed by Endothelial Cells-I. *J Immunol* **185**: 2903–2917, doi:10.4049/jimmunol.0903635.

Nagaraj S, Gabrilovich DI (2008) Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* **68**: 2561–2563, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6229.

Nakakubo Y, Miyamoto M, Cho Y, Hida Y, Oshikiri T, Suzuoki M, Hiraoka K, Itoh T, Kondo S, Katoh H (2003) Clinical significance of immune cell infiltration within gallbladder cancer. *Br J Cancer* **89**: 1736–1742, doi:10.1038/sj.bjc.6601331.

Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z (1997) Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods* **204**: 205–208, doi:10.1016/S0022-1759(97)00043-4.

National Cancer Institute Adult Non-Hodgkin Lymphoma Treatment (PDQ®) <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/adult-non-hodgkins/Patient/page2> (accessed: 25/03/2015).

NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line supplement. (1996) *J Cell Biochem Suppl* **24**: 1–291.

Neville A (2005) Lung cancer. (Chelsea House).

Ng AK (2007) Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Semin Radiat Oncol* **17**: 169–175,

doi:10.1016/j.semradonc.2007.02.002.

NICE Clinical Guideline 121 (2011) The Diagnosis and treatment of lung cancer.

Nishino, Mizuki; Jagannathan, Jyothi P; Krajewski, Katherine M; O'Regan, Kevin; Hatabu, Hiroto; Shapiro, Geoffrey; Ramaiya NH (2012) Personalized Tumor Response Assessment in the Era of Molecular Medicine: Cancer-Specific and Therapy-Specific Response Criteria to Complement Pitfalls of RECIST. *AJR Am J Roentgenol* **198**: 737–745, doi:10.2214/AJR.11.7483.Personalized.

Nissen NI, Ersbøll J, Hansen HS, Walbom-Jørgensen S, Pedersen-Bjergaard J, Hansen MM, Rygård J (1983) A randomized study of radiotherapy versus radiotherapy plus chemotherapy in stage I-II non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer* **52**: 1–7.

Nome R V, Bratland A, Harman G, Fodstad O, Andersson Y, Ree AH (2005) Cell cycle checkpoint signaling involved in histone deacetylase inhibition and radiation-induced cell death. *Mol Cancer Ther* **4**: 1231–1238, doi:10.1158/1535-7163.MCT-04-0304.

Noordijk EM, Carde P, Dupouy N, Hagenbeek A, Krol ADG, Kluin-Nelemans JC, Tirelli U, Monconduit M, Thomas J, Eghbali H, Aleman BMP, Bosq J, Vovk M, Verschueren TAM, Pény A-M, Girinsky T, Raemaekers JMM, Henry-Amar M (2006) Combined-modality therapy for clinical stage I or II Hodgkin's lymphoma: long-term results of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer H7 randomized controlled trials. *J Clin Oncol* **24**: 3128–3135, doi:10.1200/JCO.2005.05.2746.

Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini J-L, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Métivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G (2007) Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* **13**: 54–61, doi:10.1038/nm1523.

Okamoto M, Koga S, Tatsuka M (2010) Differential regulation of caspase-9 by ionizing radiation- and UV-induced apoptotic pathways in thymic cells. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* **688**: 78–87, doi:10.1016/j.mrfmmm.2010.03.012.

Okimoto RA, Bivona TG (2014) Recent Advances in Personalized Lung Cancer Medicine. *Per Med* **3**: 309–321.

Olive PL, Banáth JP (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* **1**: 23–29, doi:10.1038/nprot.2006.5.

Olive PL, Banáth JP, Durand RE (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the 'comet' assay. *Radiat Res* **122**: 86–94.

Oliveira CDE, Oliveira HMDE (2001) ' CI. 277–283.

Oliveira L, Paiva A, Carvalheiro T, Velada I, António N, Osório N (2013) Regulatory T cells, TGF- β , FoxP3 in acute myocardial infarction. *Labmed* 308–314.

Orlova V V, Choi EY, Xie C, Chavakis E, Bierhaus A, Ihanus E, Ballantyne CM, Gahmberg CG, Bianchi ME, Nawroth PP, Chavakis T (2007) A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *EMBO J* **26**: 1129–1139, doi:10.1038/sj.emboj.7601552.

Ostrand-Rosenberg S (2008) Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev* **18**: 11–18, doi:10.1016/j.gde.2007.12.007.

Ostrand-Rosenberg S, Sinha P (2009) Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* **182**: 4499–4506, doi:10.4049/jimmunol.0802740.

Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc P-H, Trajanoski Z, Fridman W-H,

Galon J (2005) Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* **353**: 2654–2666, doi:10.1056/NEJMoa051424.

Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean M-C, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman W-H (2010) Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* **29**: 1093–1102, doi:10.1038/onc.2009.416.

Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman W-H, Galon J (2009) In Situ Cytotoxic and Memory T Cells Predict Outcome in Patients With Early-Stage Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* **27**: 5944–5951, doi:10.1200/JCO.2008.19.6147.

Panaretakis T, Joza N, Modjtahedi N, Tesniere A, Vitale I, Durchschlag M, Fimia GM, Kepp O, Piacentini M, Froehlich K-U, van Endert P, Zitvogel L, Madeo F, Kroemer G (2008) The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ* **15**: 1499–1509, doi:10.1038/cdd.2008.67.

Panel chair et. al. (2015) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Guideline Small Cell Lung Cancer Version 1.2016 NCCN.org (accessed: 31/07/2015).

Panel-Chair (2015) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Guideline Non-Small Cell Lung Cancer Version 7.2015. NCCN.org (accessed: 31/07/2015).

Paracha UZ, Hayat K, Ali M, Qadir MI (2015) Review: New diagnostic and therapeutic avenues for mesothelioma. *Pak J Pharm Sci* **28**: 1425–1432.

Parente Lamelas I, Abal Arca J, Fírvida Pérez JL (2012) Terapias dirigidas en el cáncer de pulmón: ¿una nueva esperanza? *Arch Bronconeumol* **48**: 367–371, doi:10.1016/j.arbres.2012.03.007.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1999) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **49**: 1,33–64, doi:10.3322/caac.20107.Available.

Parrilla-Castellar ER, Arlander SJH, Karnitz L (2004) Dial 9-1-1 for DNA damage: The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA Repair (Amst)* **3**: 1009–1014, doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.032.

Pasqualucci L (2013) The genetic basis of diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Opin Hematol* **20**: 336–344, doi:10.1097/MOH.0b013e3283623d7f.

Patwardhan RS, Sharma D, Checker R, Thoh M, Sandur SK (2015) Spatio-temporal changes in glutathione and thioredoxin redox couples during ionizing radiation-induced oxidative stress regulate tumor radio-resistance. *Inf Healthc* 1–15.

Pawlik TM, Keyomarsi K (2004) Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **59**: 928–942, doi:10.1016/j.ijrobp.2004.03.005.

Pazdur R, Coia L, Hoskins WJ (2009) Cancer Management: A Multidisciplinary Approach.

Le Péchoux C, Dunant A, Senan S, Wolfson A, Quoix E, Faivre-Finn C, Ciuleanu T, Arriagada R, Jones R, Wanders R, Lerouge D, Laplanche A (2009) Standard-dose versus higher-dose prophylactic cranial irradiation (PCI) in patients with limited-stage small-cell lung cancer in complete remission after chemotherapy and thoracic radiotherapy (PCI 99-01, EORTC 22003-08004, RTOG 0212, and IFCT 99-01): a r. *Lancet Oncol* **10**: 467–474, doi:10.1016/S1470-2045(09)70101-9.

Pecorino L (2008) Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics (Ashford Colour Press Ltd.).

Pedroza-Gonzalez A, Xu K, Wu T-C, Aspord C, Tindle S, Marches F, Gallegos M, Burton

EC, Savino D, Hori T, Tanaka Y, Zurawski S, Zurawski G, Bover L, Liu Y-JY-J, Banchereau J, Palucka AK (2011) Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation. *J Exp Med* **208**: 479–490, doi:10.1084/jem.20102131.

Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, Bronte V (2010) Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol* **22**: 238–244, doi:10.1016/j.coi.2010.01.021.

Perez C a, Brady LW, Halperin EC (2013) Principles and Practice of Radiation Oncology (Philadelphia: {Lippincott Williams & Wilkins}).

Perez CA, Fu A, Onishko H, Hallahan DE, Geng L (2009) Radiation induces an antitumour immune response to mouse melanoma. *Int J Radiat Biol* **85**: 1126–1136, doi:10.3109/09553000903242099.

Perez CA, Fu A, Onishko H, Hallahan DE, Geng L (2010) Radiation induces an antitumour immune response to mouse melanoma.

Perrot S, Duterte-Catella H, Martin C, Rat P, Warnet JM (2003) Resazurin metabolism assay is a new sensitive alternative test in isolated pig cornea. *Toxicol Sci* **72**: 122–129, doi:10.1093/toxsci/kfg014.

Persky DO, Miller TP (2009) Localized large cell lymphoma: is there any need for radiation therapy? *Curr Opin Oncol* **21**: 401–406, doi:10.1097/CCO.0b013e32832f3c8b.

Persky DO, Unger JM, Spier CM, Stea B, LeBlanc M, McCarty MJ, Rimsza LM, Fisher RI, Miller TP (2008) Phase II study of rituximab plus three cycles of CHOP and involved-field radiotherapy for patients with limited-stage aggressive B-cell lymphoma: Southwest Oncology Group Study 0014. *J Clin Oncol* **26**: 2258–2263, doi:10.1200/JCO.2007.13.6929.

Pervez N, El-Gehani F, Joseph K, Dechaphunkul a., Kamal M, Pertschy D, Venner P, Ghosh S, North S (2013) Genitourinary small-cell carcinoma: A single-institution experience. *Curr Oncol* **20**: 258–264, doi:10.3747/co.20.1338.

Peters S, Adjei a. a., Gridelli C, Reck M, Kerr K, Felip E (2012) Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **23**: vii56–vii64, doi:10.1093/annonc/mds226.

Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M (2012) Raw data ALL DEVELOPED COUNTRIES : 2005. **2005.**:

Petrich AM, Leshchenko V, Kuo PY, Xia B, Thirukonda VK, Ulahannan N, Gordon S, Fazzari MJ, Ye BH, Sparano J a., Parekh S (2012) Akt inhibitors MK-2206 and nelfinavir overcome mTOR inhibitor resistance in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* **18**: 2534–2544, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1407.

Pfeifer M, Grau M, Lenze D, Wenzel S-S, Wolf A, Wollert-Wulf B, Dietze K, Nogai H, Storek B, Madle H, Dörken B, Janz M, Dirnhofer S, Lenz P, Hummel M, Tzankov A, Lenz G (2013) PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 12420–12425, doi:10.1073/pnas.1305656110.

Pflaum J, Schlosser S, Müller M (2014) p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol* **4**: 285, doi:10.3389/fonc.2014.00285.

Pfreundschuh M, Ho AD, Cavallin-Stahl E, Wolf M, Pettengell R, Vasova I, Belch A, Walewski J, Zinzani PL, Mingrone W, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Corrado C, Scheliga A, Loeffler M, Kuhnt E (2008a) Prognostic significance of maximum tumour (bulk) diameter in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: an exploratory analysis of the MabThera International Trial Group . *Lancet Oncol* **9**: 435–444, doi:10.1016/S1470-

2045(08)70078-0.

Pfreundschuh M, Kuhnt E, Trümper L, Österborg A, Trneny M, Shepherd L, Gill DS, Walewski J, Pettengell R, Jaeger U, Zinzani PL, Shpilberg O, Kvaloy S, de Nully Brown P, Stahel R, Milpied N, López-Guillermo A, Poeschel V, Grass S, Loeffler M, Murawski N (2011) CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol* **12**: 1013–1022, doi:10.1016/S1470-2045(11)70235-2.

Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, Schmits R, Mohren M, Lengfelder E, Reiser M, Nickenig C, Clemens M, Peter N, Bokemeyer C, Eimermacher H, Ho A, Hoffmann M, Mertelsmann R, Trümper L, Balleisen L, Liersch R, Metzner B, Hartmann F, Glass B, Poeschel V, Schmitz N, Ruebe C, Feller AC, Loeffler M (2008b) Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol* **9**: 105–116, doi:10.1016/S1470-2045(08)70002-0.

Pfreundschuh M, Trümper L, Österborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, Ma D, Gill D, Walewski J, Zinzani PL, Stahel R, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Lehtinen T, López-Guillermo A, Corrado C, Scheliga A, Milpied N, Mendila M, Rashford M, Kuhnt E, Loeffler M (2006) CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol* **7**: 379–391, doi:10.1016/S1470-2045(06)70664-7.

Phan J, Mazloom A, Medeiros LJ, Zreik TG, Wogan C, Shihadeh F, Rodriguez MA, Fayad L, Fowler N, Reed V, Horace P, Dabaja BS (2010) Benefit of consolidative radiation therapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol* **28**: 4170–4176, doi:10.1200/JCO.2009.27.3441.

Pinho L, Mendes F, Rodrigues MM, Estrela J, Teixeira R, Santos Cruz R (2015) Molecular Targets in Lung Cancer Therapy: A Current Review. *J Integr Oncol* **04**: doi:10.4172/2329-6771.1000148.

Pittet MJ (2009) Behavior of immune players in the tumor microenvironment. *Curr Opin Oncol* **21**: 53–59, doi:10.1097/CCO.0b013e32831bc38a.

Planchard D (2013) Identification of driver mutations in lung cancer: first step in personalized cancer. *Target Oncol* **8**: 3–14, doi:10.1007/s11523-013-0263-z.

Podgorsak EB, Hendee WR (2006) Radiation Physics for Medical Physicists.

Pontes L, Bento M, Serrão B, Castro C, Antunes L (2008) Registo Oncológico Regional do Norte – 2008. *Inst Port Oncol do Porto, ed. 28*.

Porrata LF, Ristow KM, Habermann TM, Witzig TE, Colgan JP, Inwards DJ, Ansell SM, Micallef IN, Johnston PB, Nowakowski G, Thompson C a, Markovic SN (2014) Peripheral blood absolute lymphocyte/monocyte ratio during rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone treatment cycles predicts clinical outcomes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* **55**: 2728–2738, doi:10.3109/10428194.2014.893313.

Qu Z, Song A, Feng W, Teng R, Gao J, Yi X (2014) Grandinin down-regulates phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *Int J Clin Exp Pathol* **7**: 5888–5894.

Rafehi H, Orłowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC (2011) Clonogenic assay: adherent cells. *J Vis Exp* **49**: 15–17, doi:10.3791/2573.

Ramalingam SS, Kotsakis a., Tarhini a. a., Heron DE, Smith R, Friedland D, Petro DP,

Raez LE, Brahmer JR, Greenberger JS, Dacic S, Hershberger P, Landreneau RJ, Luketich JD, Belani CP, Argiris a. (2013) A multicenter phase II study of cetuximab in combination with chest radiotherapy and consolidation chemotherapy in patients with stage III non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **81**: 416–421, doi:10.1016/j.lungcan.2013.06.002.

Ramalingam SS, Owonikoko TK, Khuri FR (2011) Lung Cancer : New Biological Insights and Recent Therapeutic Advances. *Cancer* **61**: 91–112, doi:10.3322/caac.20102.Available.

Rami-Porta R, Bolejack V, Goldstraw P (2011) The new tumor, node, and metastasis staging system. *Semin Respir Crit Care Med* **32**: 44–51, doi:10.1055/s-0031-1272868.

Ramos A da C (2008) Evaluation of ADAMTS-8 expression in breast cancer cell lines.

Raparia K, Villa C, DeCamp MM, Patel JD, Mehta MP (2013) Molecular profiling in non-small cell lung cancer: a step toward personalized medicine. *Arch Pathol Lab Med* **137**: 481–491, doi:10.5858/arpa.2012-0287-RA.

Ray MR, Jablons D, He B (2010) Lung cancer therapeutics that target signaling pathways: an update. *Expert Rev Respir Med* **4**: 631–645, doi:10.1586/ers.10.64.

Récher C, Coiffier B, Haioun C, Molina TJ, Fermé C, Casasnovas O, Thiéblemont C, Bosly A, Laurent G, Morschhauser F, Ghesquires H, Jardin F, Bologna S, Fruchart C, Corront B, Gabarre J, Bonnet C, Janvier M, Canioni D, Jais JP, Salles G, Tilly H (2011) Intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab versus standard CHOP plus rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (LNH03-2B): An open-label randomised phase 3 trial. *Lancet* **378**: 1858–1867, doi:10.1016/S0140-6736(11)61040-4.

Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees J a., Yaffe MB (2007) p53-Deficient Cells Rely on ATM- and ATR-Mediated Checkpoint Signaling through the p38MAPK/MK2 Pathway for Survival after DNA Damage. *Cancer Cell* **11**: 175–189, doi:10.1016/j.ccr.2006.11.024.

Reinhardt HC, Yaffe MB (2013) Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**: 563–580, doi:10.1038/nrm3640.

Reyes F, Lepage E, Ganem G, Molina TJ, Brice P, Coiffier B, Morel P, Ferme C, Bosly A, Lederlin P, Laurent G, Tilly H (2005) ACVBP versus CHOP plus radiotherapy for localized aggressive lymphoma. *N Engl J Med* **352**: 1197–1205, doi:10.1056/NEJMoa042040.

Rezaei N (2015) Cancer Immunology (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

Richardson RB (2013) p53 mutations associated with aging-related rise in cancer incidence rates. *Cell Cycle* **12**: 2468–2478, doi:10.4161/cc.25494.

Rivera MP, Mehta AC (2007) Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* **132**: 131S – 148S, doi:10.1378/chest.07-1357.

Robertson C, Robertson AG, Hendry JH, Roberts SA, Slevin NJ, Duncan WB, MacDougall RH, Kerr GR, O’Sullivan B, Keane TJ (1998) Similar decreases in local tumor control are calculated for treatment protraction and for interruptions in the radiotherapy of carcinoma of the larynx in four centers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **40**: 319–329.

Rock KL, Kono H (2008) The Inflammatory Response to Cell Death. *Annu Rev Pathol Mech Dis* **3**: 99–126, doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456.

Rodriguez E, Lilenbaum RC (2010) Small cell lung cancer: Past, present, and future. *Curr Oncol Rep* **12**: 327–334, doi:10.1007/s11912-010-0120-5.

Roh MS, Ph D (2014) Molecular Pathology of Lung Cancer : Current Status and Future Directions. *Korean Acad Tuberc Respir Dis* **3536**: 49–54.

Roitt I, Delves P, Martin S, Burton D (2011) Roitt’s Essential Immunology.

Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH (2014) Diffuse large B-cell lymphoma-treatment approaches in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol* **11**: 12–23, doi:10.1038/nrclinonc.2013.197.

Rosenberg I (2008) Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students (Nature Publishing Group).

Rosenberg SA (1977) Validity of the Ann Arbor staging classification for the non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Treat Rep* **61**: 1023–1027.

Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltnane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, López-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM (2002) The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* **346**: 1937–1947, doi:10.1056/NEJMoa012914.

Ross GM (1999) Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer* **6**: 41–44, doi:10.1677/erc.0.0060041.

Rossi A, Martelli O, Di Maio M (2013) Treatment of patients with small-cell lung cancer: From meta-analyses to clinical practice. *Cancer Treat Rev* **39**: 498–506, doi:10.1016/j.ctrv.2012.09.006.

Rosti G, Bevilacqua G, Bidoli P, Portalone L, Santo a., Genestreti G (2006) Small cell lung cancer. *Ann Oncol* **17**: ii5–ii10, doi:10.1093/annonc/mdj910.

Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer OL, Rabinovich GA (2004) Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection. *Cancer Cell* **5**: 241–251, doi:10.1016/S1535-6108(04)00024-8.

Rupnarain C, Dlamini Z, Naicker S, Bhoola K (2004) Colon cancer: genomics and apoptotic events 1. *BiolChem* **385**: 449–464.

Sabattini E, Bacci F, Sagrmoso C, Pileri S a. (2010) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: An overview. *Pathologica* **102**: 83–87.

Saeed I, Anderson J (2011) Cancer of the lung: staging, radiology, surgery. *Surgery* **29**: 221–226, doi:10.1016/j.mpsur.2011.02.003.

Sak A, Stuschke M, Groneberg M, Kübler D, Pöttgen C, Eberhardt WEE (2012) Inhibiting the aurora B kinase potently suppresses repopulation during fractionated irradiation of human lung cancer cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **84**: 492–499, doi:10.1016/j.ijrobp.2011.12.021.

Sakaguchi S (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* **6**: 345–352, doi:10.1038/ni1178.

Santos K, Laranjo M, Abrantes AM, Brito AF, Gonçalves C, Sarmiento Ribeiro AB, Botelho MF, Soares MILL, Oliveira ASRR, Pinho e Melo TMVDVD, Abrantes M (2014) Targeting triple-negative breast cancer cells with 6,7-bis(hydroxymethyl)-1H,3H-pyrrolo[1,2-c]thiazoles. *Eur J Med Chem* **79**: 273–281, doi:10.1016/j.ejmech.2014.04.008.

Sato M, Shames DS, Gazdar AF, Minna JD (2007) A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Oncol* **2**: 327–343, doi:10.1097/01.JTO.0000263718.69320.4c.

Saunders M, Dische S, Barrett A, Harvey A, Gibson D, Parmar M (1997) Continuous

hyperfractionated accelerated radiotherapy (CHART) versus conventional radiotherapy in non-small-cell lung cancer: A randomised multicentre trial. *Lancet* **350**: 161–165, doi:10.1016/S0140-6736(97)06305-8.

Saunders M, Dische S, Barrett A, Harvey A, Griffiths G, Palmar M (1999) Continuous, hyperfractionated, accelerated radiotherapy (CHART) versus conventional radiotherapy in non-small cell lung cancer: mature data from the randomised multicentre trial. CHART Steering committee. *Radiother Oncol* **52**: 137–148.

Schaake-Koning C (1995) Radiotherapy in non-small cell lung cancer: Optimal doses and schedules. *Lung Cancer* **12**: S119–S123, doi:10.1016/0169-5002(95)00427-3.

Schlembach PJ, Wilder RB, Tucker SL, Ha CS, Rodriguez M a., Hess M a., Cabanillas FF, Cox JD (2000) Impact of involved field radiotherapy after CHOP-based chemotherapy on stage III-IV, intermediate grade and large-cell immunoblastic lymphomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **48**: 1107–1110, doi:10.1016/S0360-3016(00)00760-4.

Schmid K, Kuwert T, Drexler H (2010) Radon in indoor spaces: an underestimated risk factor for lung cancer in environmental medicine. *Dtsch Arztebl Int* **107**: 181–186, doi:10.3238/arztebl.2010.0181.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**: 1565–1570, doi:10.1126/science.1203486.

Schuchert MJ, Abbas G, Pennathur A, Nason KS, Wilson DO, Luketich JD, Landreneau RJ (2010) Sublobar resection for early-stage lung cancer. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* **22**: 22–31, doi:10.1053/j.semtcvs.2010.04.004.

Schuchert MJ, Kilic A, Pennathur A, Nason KS, Wilson DO, Luketich JD, Landreneau RJ (2011) Oncologic outcomes after surgical resection of subcentimeter non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* **91**: 1681–1687; discussion 1687–1688, doi:10.1016/j.athoracsur.2011.01.010.

Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, Schlag PM, Röefzaad C, Ro C, Schlag PM (2001) Prognostic Significance of Activated CD8 + T Cell Infiltrations within Esophageal Carcinomas. *Cancer Res* **61**: 3932–3936.

Scott WJ, Howington J, Feigenberg S, Movsas B, Pisters K (2007) Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* **132**: doi:10.1378/chest.07-1378.

Sehn LH (2012) Chemotherapy Alone for Localized Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Cancer J* **18**: 421–426, doi:10.1097/PP0.0b013e31826c5907.

Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, Klasa R, Savage KJ, Shenkier T, Sutherland J, Gascoyne RD, Connors JM (2007) The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* **109**: 1857–1861, doi:10.1182/blood-2006-08-038257.

Sehn LH, Gascoyne RD (2014) Diffuse large B-cell lymphoma : optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood* **125**: 22–32, doi:10.1182/blood-2014-05-577189.

Sehn LH, Scott DW, Chhanabhai M, Berry B, Ruskova A, Berkahn L, Connors JM, Gascoyne RD (2011) Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol* **29**: 1452–1457, doi:10.1200/JCO.2010.33.3419.

Serra AC, Rocha Gonsalves AMD a, Laranjo M, Abrantes AM, Gonçalves AC, Sarmiento-

Ribeiro AB, Botelho MF (2012) Synthesis of new 2-galactosylthiazolidine-4-carboxylic acid amides. Antitumor evaluation against melanoma and breast cancer cells. *Eur J Med Chem* **53**: 398–402, doi:10.1016/j.ejmech.2012.04.003.

Shabnam MS, Srinivasan R, Wali A, Majumdar S, Joshi K, Behera D (2004) Expression of p53 protein and the apoptotic regulatory molecules Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in locally advanced squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* **45**: 181–188, doi:10.1016/j.lungcan.2004.01.021.

Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS (1999) Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect* **107**: 5–24, doi:10.1289/ehp.99107s15.

Shackelford RE, Vora M, Mayhall K, Cotelingam J (2014) ALK-rearrangements and testing methods in non-small cell lung cancer: a review. *Genes Cancer* **5**: 1–14.

Shaffer AL, Young RM, Staudt LM (2012) Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol* **30**: 565–610, doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075027.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD (2001) IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**: 1107–1111, doi:10.1038/35074122.

Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, Riely GJ, Varella-Garcia M, Shapiro GI, Costa DB, Doebele RC, Le LP, Zheng Z, Tan W, Stephenson P, Shreeve SM, Tye LM, Christensen JG, Wilner KD, Clark JW, Iafrate a. J (2014) Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 140927034510006, doi:10.1056/NEJMoa1406766.

She Q, Bode AM, Ma W (2001) Resveratrol-induced Activation of p53 and Apoptosis Is Mediated by Extracellular- Signal-regulated Protein Kinases and p38 Kinase Resveratrol-induced Activation of p53 and Apoptosis Is Mediated by Extracellular-. 1604–1610.

Shenkier TN, Voss N, Fairey R, Gascoyne RD, Hoskins P, Klasa R, Klimo P, O'Reilly SE, Sutcliffe S, Connors JM (2002) Brief chemotherapy and involved-region irradiation for limited-stage diffuse large-cell lymphoma: An 18-year experience from the British Columbia Cancer Agency. *J Clin Oncol* **20**: 197–204, doi:10.1200/JCO.20.1.197.

Shepherd F a, Bunn P a, Paz-Ares L (2013) Lung cancer in 2013: state of the art therapy for metastatic disease. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* **33**: 339–346, doi:10.1200/EdBook_AM.2013.33.339.

Shi Z, Das S, Okwan-Duodu D, Esiashvili N, Flowers C, Chen Z, Wang X, Jiang K, Nastoupil LJ, Khan MK (2013) Patterns of failure in advanced stage diffuse large b-cell lymphoma patients after complete response to r-chop immunochemotherapy and the emerging role of consolidative radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **86**: 569–577, doi:10.1016/j.ijrobp.2013.02.007.

Shiao SL, Coussens LM (2010) The tumor-immune microenvironment and response to radiation therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**: 411–421, doi:10.1007/s10911-010-9194-9.

Shimm DS (2008) Perez and Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology. *Int J Radiat Oncol* **72**: 1268, doi:10.1016/j.ijrobp.2008.07.047.

Shipp MA, Harrington DP, Anderson JR, Bonadonna G, Brittinger G, Cabanillas F, Canellhos GP (1993) A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project.

Shojaei F, Wu X, Zhong C, Yu L, Liang X-H, Yao J, Blanchard D, Bais C, Peale F V, van Bruggen N, Ho C, Ross J, Tan M, Carano RAD, Meng YG, Ferrara N (2007) Bv8 regulates

myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis. *Nature* **450**: 825–831, doi:10.1038/nature06348.

Sieben M, Herzer K, Zeidler M, Heinrichs V, Leuchs B, Schuler M, Cornelis JJ, Galle PR, Rommelaera J, Moehler M (2008) Killing of p53-deficient hepatoma cells by parvovirus H-1 and chemotherapeutics requires promyelocytic leukemia protein. *World J Gastroenterol* **14**: 3819–3828, doi:10.3748/wjg.14.3819.

Simone Reuter BBA, Simone R, Gupta S, Madan C, Aggarwal B (2011) Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* **49**: 1603–1616, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.Oxidative.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**: 5821–5828.

Śłodkowska J, Rojo MG (2011) Digital pathology in personalized cancer therapy. *Folia Histochem Cytobiol* **49**: 570–578.

Slotman B, Faivre-Finn C, Kramer G, Rankin E, Snee M, Hatton M, Postmus P, Collette L, Musat E, Senan S (2007) Prophylactic cranial irradiation in extensive small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **357**: 664–672, doi:10.1056/NEJMoa071780.

Slotman BJ, van Tinteren H, Praag JO, Knegjens JL, El Sharouni SY, Hatton M, Keijser A, Faivre-Finn C, Senan S (2015) Use of thoracic radiotherapy for extensive stage small-cell lung cancer: a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* **385**: 36–42, doi:10.1016/S0140-6736(14)61085-0.

Smith MJ, Dale I, Godfrey (2000) NKT cells and tumor immunity — a double-edged sword. *Nat Immunol* **1**: 1–2.

Smith PJ, Wiltshire M, Chin SF, Rabbitts P, Souès S (1999) Cell cycle checkpoint evasion and protracted cell cycle arrest in X-irradiated small-cell lung carcinoma cells. *Int J Radiat Biol* **75**: 1137–1147, doi:10.1080/095530099139610.

Smyth MJ (2008) NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol* **13**: 631–631, doi:10.1093/intimm/dxn028.

Smyth MJ, Crowe NY, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Godfrey DI (2002) NKT cells — conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol* **14**: 165–171, doi:10.1016/S0952-7915(02)00316-3.

Smyth MJ, Thia KYT, Street SEA, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY, Godfrey DI (2000a) Differential Tumor Surveillance by Natural Killer (Nk) and Nkt Cells. *J Exp Med* **191**: 661–668, doi:10.1084/jem.191.4.661.

Smyth MJ, Thia KYT, Street SEA, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA (2000b) Perforin-Mediated Cytotoxicity Is Critical for Surveillance of Spontaneous Lymphoma. *J Exp Med* **192**: 755–760, doi:10.1084/jem.192.5.755.

Sneeringer CJ, Scott MP, Kuntz KW, Knutson SK, Pollock RM, Richon VM, Copeland R a (2010) Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 20980–20985, doi:10.1073/pnas.1012525107.

Son CH, Jimenez R, Niemierko A, Loeffler JS, Oh KS, Shih HA (2012) Outcomes After Whole Brain Reirradiation in Patients With Brain Metastases. *Int J Radiat Oncol* **82**: e167–e172, doi:10.1016/j.ijrobp.2011.03.020.

Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, Dayton BD, Ding H, Enschede SH, Fairbrother WJ, Huang DCS, Hymowitz SG, Jin S, Khaw SL, Kovar PJ, Lam LT,

Lee J, Maecker HL, Marsh KC, Mason KD, Mitten MJ, Nimmer PM, Oleksijew A, Park CH, Park C-M, Phillips DC, Roberts AW, Sampath D, Seymour JF, Smith ML, Sullivan GM, Tahir SK, Tse C, Wendt MD, Xiao Y, Xue JC, Zhang H, Humerickhouse R a, Rosenberg SH, Elmore SW (2013) ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* **19**: 202–208, doi:10.1038/nm.3048.

Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R (2011) Is there a biological plausability for p53 codon 72 polymorphism influence on cervical cancer development? *Acta Med Port* **24**: 127–134.

Spaepen K, Stroobants S, Dupont P, Van Steenweghen S, Thomas J, Vandenberghe P, Vanuysel L, Bormans G, Balzarini J, De Wolf-Peeters C, Mortelmans L, Verhoef G (2001) Prognostic value of positron emission tomography (PET) with fluorine-18 fluorodeoxyglucose ([¹⁸F]FDG) after first-line chemotherapy in non-Hodgkin's lymphoma: Is [¹⁸F]FDG-PET a valid alternative to conventional diagnostic methods? *J Clin Oncol* **19**: 414–419.

Spiotto MT, Rowley DA, Schreiber H (2004) Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors. *Nat Med* **10**: 294–298, doi:10.1038/nm999.

Spisek R, Dhodapkar M V (2007) Towards a better way to die with chemotherapy: role of heat shock protein exposure on dying tumor cells. *Cell Cycle* **6**: 1962–1965.

Stahel R, Thatcher N, Früh M, Le Péchoux C, Postmus PE, Sorensen JB, Felip E (2011) 1st ESMO consensus conference in lung cancer; Lugano 2010: Small-cell lung cancer. *Ann Oncol* **22**: 1973–1980, doi:10.1093/annonc/mdr313.

Stewart BW, Wild CP (2014) World Cancer Report 2014 (World Health Organization).

Stewart DJ (2012) Lung Cancer. A. Leary, ed. (West Sussex, UK, UK: John Wiley & Sons, Ltd.), p. 203.

Stuschke M, Sak a, Wurm R, Sinn B, Wolf G, Stüben G, Budach V (2002) Radiation-induced apoptosis in human non-small-cell lung cancer cell lines is secondary to cell-cycle progression beyond the G2-phase checkpoint. *Int J Radiat Biol* **78**: 807–819, doi:10.1080/0955300021014890.

Sugihara AQ, Rolle CE, Lesniak MS (2009) Regulatory T cells actively infiltrate metastatic brain tumors. *Int J Oncol* **34**: 1533–1540.

Suntharalingam N, Podgorsak EB, Hendry JH (2007) Chapter 14 Basic Radiobiology. In *Radiation Oncology*, pp. 1–44.

Suzuki M (2004) RNA Interference-Mediated Knockdown of DNA Methyltransferase 1 Leads to Promoter Demethylation and Gene Re-Expression in Human Lung and Breast Cancer Cells. *Cancer Res* **64**: 3137–3143, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3046.

Swann JB, Hayakawa Y, Zerafa N, Sheehan KCF, Scott B, Schreiber RD, Hertzog P, Smyth MJ (2007) Type I IFN Contributes to NK Cell Homeostasis, Activation, and Antitumor Function. *J Immunol* **178**: 7540–7549, doi:10.4049/jimmunol.178.12.7540.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL E Al (2008) World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Lyon).

Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR (2006) Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer* **42**: 745–750, doi:10.1016/j.ejca.2006.01.012.

Takahashi H, Ogata H, Nishigaki R, Broide DH, Karin M (2010) Tobacco Smoke Promotes Lung Tumorigenesis by Triggering IKK??- and JNK1-Dependent Inflammation. *Cancer Cell* **17**: 89–97, doi:10.1016/j.ccr.2009.12.008.

Takatsu K (2004) Role of interleukin-5 in immune regulation and inflammation. *Nihon*

Rinsho **62**: 1941–1951.

Takatsu K, Kouro T, Nagai Y (2009) Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response. *Adv Immunol* **101**: 191–236, doi:10.1016/S0065-2776(08)01006-7.

Tanaka T, Munshi A, Brooks C, Liu J, Hobbs ML, Meyn RE (2008) Gefitinib radiosensitizes non-small cell lung cancer cells by suppressing cellular DNA repair capacity. *Clin Cancer Res* **14**: 1266–1273, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1606.

Taylor WR, Stark GR (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* **20**: 1803–1815, doi:10.1038/sj.onc.1204252.

Teng MWL, Swann JB, von Scheidt B, Sharkey J, Zerafa N, McLaughlin N, Yamaguchi T, Sakaguchi S, Darcy PK, Smyth MJ (2010) Multiple Antitumor Mechanisms Downstream of Prophylactic Regulatory T-Cell Depletion. *Cancer Res* **70**: 2665–2674, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1574.

Thariat J, Hannoun-Levi J-M, Sun Myint A, Vuong T, Gérard J-P (2013) Past, present, and future of radiotherapy for the benefit of patients. *Nat Rev Clin Oncol* **10**: 52–60, doi:10.1038/nrclinonc.2012.203.

Tilly H, Dreyling M (2010) Diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **21 Suppl 5**: v172–v174, doi:10.1093/annonc/mdq203.

Tilly H, Vitolo U, Walewski J, da Silva MG, Shpilberg O, Andre M, Pfreundschuh M, Dreyling M (2012) Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **23**: vii78–vii82, doi:10.1093/annonc/mds273.

Tolozza EM, Harpole L, Detterbeck F, McCrory DC (2003) Invasive staging of non-small cell lung cancer: A review of the current evidence. *Chest* **123**: 173–177, doi:10.1378/chest.123.1.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **65**: 87–108, doi:10.3322/caac.21262.

Tovar I, Expósito J, Jaén J, Alonso E, Martínez M, Guerrero R, Arrebola JP, Del Moral R (2014) Pattern of use of radiotherapy for lung cancer: a descriptive study. *BMC Cancer* **14**: 697, doi:10.1186/1471-2407-14-697.

Turner MC, Krewski D, Chen Y, Pope CA, Gapstur S, Thun MJ (2011) Radon and lung cancer in the American Cancer Society Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20**: 438–448, doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-1153.

Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan T V, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL (2000) Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14720–14725, doi:10.1073/pnas.97.26.14720.

Ushio-Fukai M, Nakamura Y (2008) Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett* **266**: 37–52, doi:10.1016/j.canlet.2008.02.044.

Valerie K, Yacoub A, Hagan MP, Curiel DT, Fisher PB, Grant S, Dent P (2007) Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Mol Cancer Ther* **6**: 789–801, doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0596.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 44–84, doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.

Vandersickel V, Mancini M, Slabbert J, Marras E, Thierens H, Perletti G, Vral A (2010) The radiosensitizing effect of Ku70/80 knockdown in MCF10A cells irradiated with X-rays and p(66)+Be(40) neutrons. *Radiat Oncol* **5**: 30, doi:10.1186/1748-717X-5-30.

Vansteenkiste J, De Ruyscher D, Eberhardt WEE, Lim E, Senan S, Felip E, Peters S (2013) Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **24**: vi89–vi98, doi:10.1093/annonc/mdt241.

Varella-garcia M (2009) Chromosomal and genomic changes in lung cancer. *Cell Adh Migr* **4**: 100–106.

Vatner RE, Cooper BT, Vanpouille-Box C, Demaria S, Formenti SC (2014) Combinations of Immunotherapy and Radiation in Cancer Therapy. *Front Oncol* **4**: 325, doi:10.3389/fonc.2014.00325.

Verdeil G, Fuertes Marraco SA, Murray T, Speiser DE (2015) From T cell ‘exhaustion’ to anti-cancer immunity. *Biochim Biophys Acta* doi:10.1016/j.bbcan.2015.06.007.

Verheij M (2008) Clinical biomarkers and imaging for radiotherapy-induced cell death. *Cancer Metastasis Rev* **27**: 471–480, doi:10.1007/s10555-008-9131-1.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN, Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* **36**: 131–149.

Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ (2011) Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* **29**: 235–271, doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101324.

Videtic GMM, Stitt LW, Dar a. R, Kocha WI, Tomiak AT, Truong PT, Vincent MD, Yu EW (2003) Continued cigarette smoking by patients receiving concurrent chemoradiotherapy for limited-stage small-cell lung cancer is associated with decreased survival. *J Clin Oncol* **21**: 1544–1549, doi:10.1200/JCO.2003.10.089.

Vieira SC (2006) Radicais oxidantes: *Química* 66–71.

Villaruz LC, Socinski MA (2012) Personalized Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer : Which Drug for Which Patient ? *YSTCS* **23**: 281–290, doi:10.1053/j.semtcvs.2012.01.001.

Voronov E, Carmi Y, Apte RN (2014) The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. *Front Physiol* **5**: 114, doi:10.3389/fphys.2014.00114.

Wahl GM, Carr a M (2001) The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat Cell Biol* **3**: E277–E286, doi:10.1038/ncb1201-e277.

Waldhauer I, Steinle A (2008) NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* **27**: 5932–5943, doi:10.1038/onc.2008.267.

Wang J, Yi J (2008) Cancer cell killing via ROS. *Cancer Biol Ther* **7**: 1875–1884.

Ward JF (1990) The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review. *Int J Radiat Biol* **57**: 1141–1150, doi:10.1080/09553009014551251.

Webb S (1998) The physics of radiation treatment.

Weisenthal LM, Marsden JA, Dill PL, Macaluso CK, Cindy KM (1983) A Novel Dye Exclusion Method for Testing in Vitro Chemosensitivity of Human Tumors A Novel Dye Exclusion Method for Testing in Vitro Chemosensitivity of. *Cancer Res* **43**: 749–757.

West L, Vidwans SJ, Campbell NP, Shrager J, Simon GR, Bueno R, Dennis PA, Otterson

GA, Salgia R (2012) A Novel Classification of Lung Cancer into Molecular Subtypes. *PLoS One* **7**: e31906, doi:10.1371/journal.pone.0031906.

Wilcox R a, Ristow K, Habermann TM, Inwards DJ, Micallef INM, Johnston PB, Colgan JP, Nowakowski GS, Ansell SM, Witzig TE, Markovic SN, Porrata L (2011) The absolute monocyte and lymphocyte prognostic score predicts survival and identifies high-risk patients in diffuse large-B-cell lymphoma. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK* **25**: 1502–1509, doi:10.1038/leu.2011.112.

Wilson WH, Dunleavy K, Pittaluga S, Hegde U, Grant N, Steinberg SM, Raffeld M, Gutierrez M, Chabner B a., Staudt L, Jaffe ES, Janik JE (2008) Phase II study of dose-adjusted EPOCH and rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of germinal center and post-germinal center biomarkers. *J Clin Oncol* **26**: 2717–2724, doi:10.1200/JCO.2007.13.1391.

Wilson WH, Jung SH, Porcu P, Hurd D, Johnson J, Eric Martin S, Czuczman M, Lai R, Said J, Chadburn A, Jones D, Dunleavy K, Canellos G, Zelenetz AD, Cheson BD, Hsi ED (2012) A cancer and Leukemia Group B multi-center study of DA-EPOCH-rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of outcome by molecular subtype. *Haematologica* **97**: 758–765, doi:10.3324/haematol.2011.056531.

Wirth A (2007) The rationale and role of radiation therapy in the treatment of patients with diffuse large B-cell lymphoma in the Rituximab era. *Leuk Lymphoma* **48**: 2121–2136, doi:10.1080/10428190701636468.

Wolfson AH, Bae K, Komaki R, Meyers C, Movsas B, Le Pechoux C, Werner-Wasik M, Videtic GMM, Garces YI, Choy H (2011) Primary Analysis of a Phase II Randomized Trial Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 0212: Impact of Different Total Doses and Schedules of Prophylactic Cranial Irradiation on Chronic Neurotoxicity and Quality of Life for Patients With Limited-Disease. *Int J Radiat Oncol* **81**: 77–84, doi:10.1016/j.ijrobp.2010.05.013.

Wong S-C, Puaux A-L, Chittechath M, Shalova I, Kajiji TS, Wang X, Abastado J-P, Lam K-P, Biswas SK (2010) Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells. *Eur J Immunol* **40**: 2296–2307, doi:10.1002/eji.200940288.

Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH (2001) Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* **61**: 4766–4772.

Wu GS (2004) The Functional Interactions Between the p53 and MAPK Signaling Pathways. *Cancer Biol Ther* **3**: 156–161.

Yamaguchi M, Kashiwakura I (2013) Role of reactive oxygen species in the radiation response of human hematopoietic stem/progenitor cells. *PLoS One* **8**: e70503, doi:10.1371/journal.pone.0070503.

Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, Wada Y, Nakamura Y, Nakamura H, Inanami O (2012) Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic Biol Med* **53**: 260–270, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033.

Yang C, Lee H, Pal S, Jove V, Deng J, Zhang W, Hoon DSB, Wakabayashi M, Forman S, Yu H (2013) B Cells Promote Tumor Progression via STAT3 Regulated-Angiogenesis. *PLoS One* **8**: e64159, doi:10.1371/journal.pone.0064159.

Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey KJ, Bustin M, Oppenheim JJ (2006) High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J Leukoc Biol* **81**: 59–66, doi:10.1189/jlb.0306180.

Yang L, Zhou Y, Li Y, Zhou J, Wu Y, Cui Y, Yang G, Hong Y (2014) Mutations of p53 and KRAS activate NF- κ B to promote chemoresistance and tumorigenesis via dysregulation of cell cycle and suppression of apoptosis in lung cancer cells. *Cancer Lett* doi:10.1016/j.canlet.2014.12.003.

Yaqub S, Henjum K, Mahic M, Jahnsen FL, Aandahl EM, Bjørnbeth BA, Taskén K (2007) Regulatory T cells in colorectal cancer patients suppress anti-tumor immune activity in a COX-2 dependent manner. *Cancer Immunol Immunother* **57**: 813–821, doi:10.1007/s00262-007-0417-x.

Yee D, Butts C, Reiman A, Joy A, Smylie M, Fenton D, Chu Q, Hanson J, Roa W (2012) Clinical trial of post-chemotherapy consolidation thoracic radiotherapy for extensive-stage small cell lung cancer. *Radiother Oncol* **102**: 234–238, doi:10.1016/j.radonc.2011.08.042.

Yoshida N, Ikemoto S, Narita K, Sugimura K, Wada S, Yasumoto R, Kishimoto T, Nakatani T (2002) Interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and interleukin-1beta in patients with renal cell carcinoma. *Br J Cancer* **86**: 1396–1400, doi:10.1038/sj.bjc.6600257.

Yu H, Kortylewski M, Pardoll D (2007) Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* **7**: 41–51, doi:10.1038/nri1995.

Yu H, Pardoll D, Jove R (2009) STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* **9**: 798–809, doi:10.1038/nrc2734.

Yuan C, Yang X, Zhu C, Liu S, Wang B-C, Wang F (2014) Interleukin-7 Enhances the in Vivo Anti-tumor Activity of Tumor-reactive CD8 + T cells with Induction of IFN-gamma in a Murine Breast Cancer Model. *Asian Pacific J Cancer Prev* **15**: 265–271, doi:10.7314/APJCP.2014.15.1.265.

Zavala VA, Kalergis AM (2015) New clinical advances in immunotherapy for the treatment of solid tumours. *Immunology* **145**: 182–201, doi:10.1111/imm.12459.

Zaynagetdinov R, Sherrill TP, Gleaves L a, McLoed AG, Saxon J a, Habermann AC, Connelly L, Dulek D, Peebles RS, Fingleton B, Yull FE, Stathopoulos GT, Blackwell TS (2015) Interleukin-5 Facilitates Lung Metastasis by Modulating the Immune Microenvironment. *Cancer Res* **094296**: 1624–1634, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2379.

Zelenetz AD, Wierda WG, Abramson JS, Advani RH, Andreadis CB, Bartlett N, Bellam N, Byrd JC, Czuczman MS, Fayad LE, Glenn MJ, Gockerman JP, Gordon LI, Harris NL, Hoppe RT, Horwitz SM, Christopher RK, Kim YH, Krivacic S, LaCasce AS, Nademanee A, Porcu P, Press O, Pro B, Reddy N, Sokol L, Swinnen L, Tsien C, Vose JM, Yahalom J, Zafar N, Dwyer MA, Naganuma M, Kelsey CR, Kim YH, Krivacic S, LaCasce AS, Nademanee A, Porcu P, Press O, Pro B, Reddy N, Sokol L, Swinnen L, Tsien C, Vose JM, Yahalom J, Zafar N, Dwyer MA, Naganuma M (2013) Non-Hodgkin's lymphomas, version 1.2013: Featured updates to the NCCN guidelines. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw* **11**: 257–273.

Zhang B, Karrison T, Rowley DA, Schreiber H (2008a) IFN-gamma- and TNF-dependent bystander eradication of antigen-loss variants in established mouse cancers. *J Clin Invest* **118**: 1398–1404, doi:10.1172/JCI33522.

Zhang B, Zhang Y, Bowerman NA, Schietinger A, Fu Y-X, Kranz DM, Rowley DA, Schreiber H (2008b) Equilibrium between host and cancer caused by effector T cells killing tumor stroma. *Cancer Res* **68**: 1563–1571, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5324.

Zhang Q, Qin J, Zhong L, Gong L, Zhang B, Zhang Y, Gao W-Q (2015a) CCL5-mediated Th2 immune polarization promotes metastasis in luminal breast cancer. *Cancer Res* doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3590.

Zhang W, Liu Q, Dong X, Lei P (2015b) A meta-analysis comparing hyperfractionated

vs. conventional fractionated radiotherapy in non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis* **7**: 478–485, doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2015.02.20.

Zhang Y, Yang D, Weng L, Wang L (2013) Early lung cancer diagnosis by biosensors. *Int J Mol Sci* **14**: 15479–15509, doi:10.3390/ijms140815479.

Zhao L, Ji W, Ou G, Lv J, Liang J, Feng Q, Zhou Z, Wang L, Yin W (2012a) Risk factors for radiation-induced lung toxicity in patients with non-small cell lung cancer who received postoperative radiation therapy. *Lung Cancer* **77**: 326–330, doi:10.1016/j.lungcan.2012.03.017.

Zhao Y, Lou IC, Conolly RB (2012b) Computational modeling of signaling pathways mediating cell cycle checkpoint control and apoptotic responses to ionizing radiation-induced DNA damage. *Dose-Response* **10**: 251–273, doi:10.2203/dose-response.11-021.Zhao.

Zheng J, Viacava Follis A, Kriwacki RW, Moldoveanu T (2015) Discoveries and Controversies in BCL-2 Proteins-Mediated Apoptosis. *FEBS J* n/a – n/a, doi:10.1111/febs.13527.

Zhou BS, Elledge SJ (2000) Checkpoints in perspective. *Nature* **408**: 433–439.

Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, LaCasce AS, Crosby-Thompson A, Vanderplas A, Zelenetz AD, Abel GA, Rodriguez MA, Nademanee A, Kaminski MS, Czuczman MS, Millenson M, Niland J, Gascoyne RD, Connors JM, Friedberg JW, Winter JN (2014) An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood* **123**: 837–842, doi:10.1182/blood-2013-09-524108.

Zhu X-M, Yao Y-M, Liang H-P, Xu C-T, Dong N, Yu Y, Sheng Z-Y (2011) High mobility group box-1 protein regulate immunosuppression of regulatory T cells through toll-like receptor 4. *Cytokine* **54**: 296–304, doi:10.1016/j.cyto.2011.02.017.

Ziegler U, Groscurth P (2004) Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* **19**: 124–128.

Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, Glass B, Schmitz N, Pfreundschuh M, Loeffler M (2010) Standard international prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20 + B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol* **28**: 2373–2380, doi:10.1200/JCO.2009.26.2493.

Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G (2010) Decoding Cell Death Signals in Inflammation and Immunity. *Cell* **140**: 798–804, doi:10.1016/j.cell.2010.02.015.

Zou W (2006) Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **6**: 295–307, doi:10.1038/nri1806.

Zwam HM (2013) Involved Nodal Radiotherapy vs. Involved Field Radiotherapy after Chemotherapy in the Treatment of Early Stage Hodgkin's Lymphoma. *J Cancer Ther* **04**: 271–279, doi:10.4236/jct.2013.41034.

PARTE V – SÍMBOLOS,
ABREVIATURAS E EXPRESSÕES

A	Agregados
aa-IPI	<i>Age adjusted-International Prognostic Index</i>
Abs	Absorvância
Ac	Anticorpos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
AI	Apoptose Inicial
AICD	<i>Activation-induced cell death</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
Akt	<i>Protein kinase B</i>
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APC	Aloficocianina
APC	<i>Antigen presenting cells</i>
RNA	Ácido ribonucleico
AT/N	Apoptose Tardia/Necrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related</i>
AV	Anexina-V
BAD	<i>Bcl-XL/Bcl-2-associated death promoter</i>
BAFF	<i>B cell-activating factor of the TNF family</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BCL-10	<i>B-cell lymphoma/leukemia 10</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BCL-6	<i>Transcricional B-cell lymphoma 6 protein</i>
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BCR	<i>B-cell receptor</i>
BED	<i>Biological Effective Dose</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BH3	<i>Bcl-2 homology3</i>
BRAF	<i>Protein B-Raf</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1 (gene)</i>
BST2	<i>Bone marrow stromal protein 2</i>
BTK	<i>Bruton tyrosine kinase</i>
Bv8	<i>Bombina variagata peptide 8</i>
C/kg	<i>Coulomb/quilograma</i>
CAPS	<i>Ácido N-ciclo-hexil-3-aminopropanossulfônico</i>
Carbo	Carboplatina
CARD11	<i>Caspase recruitment domain-containing protein 11</i>
CBA	Células B ativadas

Cbl-b	<i>Casitas B-lineage lymphoma-b</i>
CCL2/MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein</i>
CCL3/MIP-1 α	<i>Macrophage Inflammatory Proteins-1 α</i>
CCL5	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i>
CCL5/RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
CCR2	Recetor de CCL2
CCR7	<i>CC-chemokine receptor 7</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD10	<i>Neprilysin</i>
CD127	Cadeia- α do receptor de IL-7
CD25	Cadeia alfa do receptor de IL-2
CD62L	<i>L-selectin</i>
Cdc	<i>Cell division cycle</i>
Cdks	Ciclina dependentes de cínases
Cds1	<i>Phosphatidate cytidylyltransferase</i>
CF	Citometria de fluxo
CHART	<i>Continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy</i>
Chk	<i>Cell Cycle Checkpoint Kinase</i>
c-H-ras	<i>v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog (HRAS)</i>
CHUC	Centro Hospitalar Universitário de Coimbra
Cis	Cisplatina
Cit-c	Citocromo c
c-Myb	<i>v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog (MYB)</i>
c-Myc	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)(MYC)</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
COX-2	Ciclooxigenase-2
CP	Cancro do pulmão
CRT	Calreticulina
CTL	Células T citotóxicos
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CXCL1/GRO- α	<i>Growth Regulated Oncogene-Alpha</i>
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i>
CXCL10/IP-10	<i>Gamma-induced protein 10</i>
CXCL12/SDF-1 α	<i>Stromal cell-derived factor-1α</i>
CXCL18/IL-18	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 18</i>
CXCR4	<i>CXC chemokine receptor 4</i>
DA	Diacetato
DA-EPOCH-R	Regime de infusão de etoposídeo dose-ajustado, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona e rituximab
DAMP	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DC	<i>Dendritic cells</i>

DCF	2'-7'-diclorofluoresceína
DCFH ₂ -DA	2',7'-diclorofluoresceína diacetato
DDR	<i>DNA Dose Response</i>
DEDs	<i>Death effector domains</i>
DFS	<i>Recurrence-free survival</i>
DHE	Dihidroetídio
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DL ₅₀	Dose letal média
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crónica
dQ	Carga elétrica
DSB	<i>Double-strand breaks</i>
DTT	Ditiotreitol
EBI3	<i>Epstein Bar virus-induced protein 3</i>
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetracetic acid</i>
EDTAK ₃	Etileno-diaminotetraacético tripotássico
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ácido tetracético etileno glicol
EORTC/GELA	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer/ Groupe d'étude des Lymphoma de l'adulte</i>
Etop	Etoposido
EZH2	<i>Histone-lysine N-methyltransferase</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
Fas	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6</i>
FAS-L	<i>FAS ligand</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factors</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
FS	Fosfatidilserina
FSC	<i>Forward scatter</i>
G	<i>Growth/Gap</i>
G	Unidade de força centrífuga relativa
G ₀	Fase quiescente do ciclo celular
G ₁	<i>Gap1</i>
G ₂	<i>Gap2</i>
gadd45	<i>Growth arrest and DNA damage</i>

galectin-9	<i>Tim-3 ligand</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GDP	<i>Guanosina difosfato</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-induced TNFR family related gene</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPx	Glutaciona peroxidase
GRP	<i>Gastrin releasing peptide</i>
GSH	Glutaciona reduzida
GTP	Guanosina trifosfato
Gy	Gray
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido hidrogénio
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HGFR	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i>
HIF	<i>Hypoxia-inducible factors-1α</i>
HMGB1	<i>High mobility group box 1 protein</i>
HMP	<i>High melting point</i>
HO \cdot	Radical hidroxilo
HO ₂	Radical hidroperoxilo
HOCl	Ácido hipocloroso
HSP	<i>Heat shock protein</i>
HT	Dose equivalente
IC	Imunocomplexos
IC ₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
IC ₇₅	<i>½ Half maximal inhibitory concentration</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
Iconf	Intervalo de confiança
IFN- α	Interferão alfa
IFN- β	Interferão beta
IFN- γ	Interferão gama
IFRT	<i>Involved field radiation therapy</i>
Igs	Imunoglobulinas
IL	Interleucinas
IL-1Ra	Interleucina-1 recetor antagonista
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2R	Recetor da IL-2
ILT7	<i>Immunoglobulin-like transcript 7</i>
INF	Interferão
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
INRT	<i>Involved node radiation therapy</i>
IP	Iodeto de propídeo

IPI	<i>International Prognostic Index</i>
ISRT	<i>Involved Site Radiotherapy</i>
JC1	<i>5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide</i>
KCl	Cloreto de potássio
KeV	Quilo electrão-volt
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
KLRG1	<i>Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1</i>
K-RAS	<i>v-Ki-ras Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LAG-3	<i>Lymphocyte activation gene 3 protein</i>
LBA	Lavado broncoalveolar
LDGC-B	Linfoma difuso de grandes células B
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LET	<i>Linear energy transfer</i>
LMO2	<i>LIM Domain Only 2</i>
LMP	<i>Low melting point</i>
LOX-1	<i>Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1</i>
LT1	<i>Lymphoid tissue inducer</i>
LXR	<i>Liver X receptor</i>
M	Monómeros
MALT1	<i>Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1</i>
MAM	<i>Metastasis-associated macrophages</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinases</i>
mDC	<i>Myeloid dendritic cells</i>
Mdm2	<i>Murine doble minute 2</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MET	<i>Mesenchymal epithelial transition factor</i>
MeV	Mega electrão-volt
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIF	Media de intensidade de fluorescência
MMP	<i>Matrix metallopeptidase</i>
MO	Medula óssea
MoDC	<i>Monocyte-derived dendritic cells</i>
MOS	<i>Mean overall survival</i>
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i>
MSR1	<i>Macrophage scavenger receptor1</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MU	Monitor Units
MYC	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>

MYCN	<i>v-myc myelocytomatosis viral related oncogene neuroblastoma derived</i>
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
N	Necrose
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NaOH	Hidróxido de sódio
NBS1	Nibrin (gene)
Nbs1	Nibrin (proteína)
NCAM	<i>Neural celular adhesion molecule</i>
NCCN	<i>National comprehensive cancer network</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NKG2D	<i>Natural-killer group 2, member D</i>
NOS	<i>Not otherwise specified</i>
N-Ras	<i>v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog (NRAS)</i>
Nrf2	<i>NF-E2 related factor-2</i>
O ₂ ⁻	Radical superóxido
O ₂ ^{·-}	Radical anião superóxido
O ₂	Oxigénio
OS	<i>Overall survival</i>
P53	Proteína supressora tumoral P53
P53 ^{Mut}	P53 mutada
P53 ^{Null}	P53 nula
P53 ^{Wild}	P53 wild type
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase A124+A124</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PC	<i>Plasmatic cells</i>
PCI	<i>Prophylactic Cranial Irradiation</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PD-1	<i>Programmed Death 1</i>
pDC	<i>Plasmacytoid dendritic cells</i>
PD-L	<i>PD-ligand</i>
PE	<i>Phycoeritrin</i>
PE	<i>Plate efficiency</i>
PE-Cy5	<i>Phycoeritrin-cyanin 5</i>
PerCP-Cy5.5	Proteína Peridinina Clorofila-Cianina 5.5
PET/CT	<i>Positron emission tomography/ computed tomography</i>

PFS	<i>Progression-free survival</i>
PGE2	<i>Prostaglandina E2</i>
PGF	<i>Placental growth factor</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIIIP	<i>Procollagen III peptide</i>
PKCb	<i>Protein kinase C b</i>
<i>PLK</i>	<i>Polo-like1 kinase (gene)</i>
PLK1	<i>Polo-like1 kinase(proteína)</i>
PMM	Potencial de membrana mitocondrial
POL1	<i>PD-1 ligand</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Puma	<i>P53 upregulated modulation of apoptosis</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
QT	Quimioterapia
R	<i>Roentgen</i>
Rad17	<i>Cell cycle checkpoint protein Rad17</i>
Rad9–Hus1–Rad1	<i>Checkpoint clamp complex Rad9–Hus1–Rad1</i>
RAG	<i>Recombination activating genes</i>
RB1	Retinoblastoma 1
RBE	<i>Relative Biological Effectiveness</i>
R-CHOP	<i>Rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednison</i>
RDS	<i>Radioreistant DNA synthesis</i>
RFC	<i>DNA replication factor C</i>
RI	Radiação ionizante
RILT	<i>Radiation-induced lung toxicity</i>
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer</i>
RMT	Recentemente migradas dos timo
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RO	Alcoxilo
ROO·	Peroxilo
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RRP	Receptores de Reconhecimento de Padrões
RT	Radioterapia
RX	Raios-X
S	Fase de síntese do ciclo celular
SABR	<i>Stereotactic ablative radiotherapy</i>
SA-PE	<i>Streptavidina conjugada a R-Ficoeritrina</i>
SBRT	<i>Stereotactic body radiotherapy</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>

SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate – poly-acrilamide gel electrophoresi</i>
SE	<i>Standard error</i>
SF	<i>Surviving factor</i>
SI	<i>Sistema Internacional</i>
SMC	<i>Structural maintenance of chromosomes</i>
Smurf2	<i>SMAD ubiquitylation regulatory factor 2</i>
SOD	<i>Superóxido dismutase</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SR	<i>Serviço de Radioterapia</i>
SRB	<i>Sulforodamina B</i>
SSB	<i>Single strand breaks</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
STK	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
Sv	<i>Sievert</i>
SWOG	<i>Southwest Oncology Group</i>
T reg	<i>Células T reguladoras</i>
TA	<i>Temperatura ambiente</i>
TAA	<i>Tumor associated antigens</i>
TAL	<i>Tumor-associated lymphocytes</i>
TAM	<i>Tumor-associated macrophages</i>
TBST-BSA	<i>Tris-buffered saline tween-20 – bovine serum albumine</i>
TC	<i>Tomografia Computorizada</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TdT	<i>deoxynucleotidyl transferase gene</i>
TGF	<i>Tumor growth factor</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
Th	<i>T helper</i>
Th17	<i>T helper 17</i>
Tim-3	<i>T cell immunoglobulin mucin-3</i>
TKI	<i>Tyrosine kinase inhibitors</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFAIP3	<i>Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TNM	<i>Tumor-Nodule-Metastasis</i>
TP53	<i>Gene supressor tumoral TP53</i>
TP53	<i>Proteina tumoral P53</i>
TRAIL	<i>TNF related apoptosis inducing ligand</i>
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopietin</i>

TTF1	Factor de transcrição da tireóide 1
UNFOLDER	<i>Unfavorable Low-Risk Patients Treated With Densification of R-Chemo Regimens</i>
UV	Ultra-violeta
V	Viáveis
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factors</i>
WT	<i>Wild Type</i>
X	Dose exposição
$\Delta\psi_{mit}$	Potencial de membrana mitocondrial

PARTE VI – PUBLICAÇÕES
RELACIONADAS COM A TESE

Artigos publicados em revistas com arbitragem científica

1. Fernando Mendes, Cátia Domingues, Paulo Rodrigues-Santos, Ana Margarida Abrantes, Ana Cristina Gonçalves, Jéssica Estrela, João Encarnação, Ana Salomé Pires, Mafalda Laranjo, Vera Alves, Ricardo Teixeira, Ana Bela Sarmento, Maria Filomena Botelho, Manuel Santos Rosa. The role of immune system exhaustion on cancer cells escape and anti-tumor immune induction after irradiation. Doi: 10.1016/j.bbcan.2016.02.002
2. Pinho, Luís, Fernando Mendes, Maria Manuela Rodrigues, Jéssica Estrela, Ricardo Teixeira, and Rui Santos Cruz. 2015. "Molecular Targets in Lung Cancer Therapy: A Current Review." *Journal of Integrative Oncology* 04 (04). doi:10.4172/2329-6771.1000148.
3. Mendes, Fernando, Tiago Sales, Cátia Domingues, Susann Schugk, Ana Margarida Abrantes, Ana Cristina Gonçalves, Ricardo Teixeira, et al. 2015. "Effects of X-Radiation on Lung Cancer Cells: The Interplay between Oxidative Stress and P53 Levels." *Medical Oncology* 32 (12): 266.
4. Mendes, Fernando, Cátia Domingues, Ricardo Teixeira, Ana Margarida Abrantes, Ana Cristina Gonçalves, Inês Nobre-Gois, Miguel Jacobetty, Ana Bela Sarmento, Maria Filomena Botelho, and Manuel Santos Rosa. 2015. "The Importance of Radiotherapy on Diffuse Large B Cell Lymphoma Treatment: A Current Review." *Cancer and Metastasis Reviews* 34 (3): 511–525.
5. Mendes, Fernando, Cristiano Antunes, Ana Margarida Abrantes, Ana Cristina Gonçalves, Inês Nobre-Gois, Ana Bela Sarmento-Ribeiro, Maria Filomena Botelho, and Manuel Santos Rosa. 2015. "Lung Cancer : The Immune System and Radiation." *British Journal of Biomedical Science* 72 (2): 78–84.

Artigos aceites para publicação em revistas com arbitragem científica

1. Fernando Mendes, Cátia Domingues, Susann Schugk, Ana Margarida Abrantes, Ana Cristina Gonçalves, Tiago Sales, Ricardo Teixeira, Rita Silva, Jéssica Estrela Mafalda Laranjo, João Casalta-Lopes, Clara Rocha, Paulo César Simões, Ana Bela Sarmento, Maria Filomena Botelho, Manuel Santos Rosa. Single shot irradiation and molecular effects on a diffuse large B cell lymphoma cell line. *Journal of Cancer research and Treatment*. 2016

Prémios e Distinções

1. Cytotoxic Effects of ionizing Radiation in Cancer Cell Lines of Small Cell Lung Cancer and Large Diffuse B cell Lymphoma – A Therapeutic tool, Regional European Biomedical Laboratory Science Congress, and the 4th Greek Medical

Laboratory Technologists Conference, Athens, Greece on 5-7 December, 2015. Primeiro lugar Comunicação oral.

2. Avaliação dos níveis de TNF- α e células do sistema imune em doentes com cancro do pulmão de não pequenas células submetidos a radioterapia, 1as Jornadas de Cancro do Pulmão do IPO de Coimbra, Hotel Tivoli de Coimbra, 30 de Novembro e 1 de Dezembro, 2015 Primeiro lugar comunicação oral.

Comunicações Orais

1. Ionizing Radiation Effects in Lung Cancer Cell Lines, Workshop LOWDOSE-PT-2015, IST Campus tecnológico e Nuclear (IST), Lisboa, 15 e 16 de abril de 2015
2. Immune Response, Radiotherapy and Lung Cancer, Atualizações em Oncologia 2015, 29^a Reunião, 4^o Congresso do Cimago, Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Portugal, 29 e 30 Janeiro de 2015
3. Mecanismos Celulares e Moleculares de Resposta à Radiação X de Três Linhas Celulares Humanas de Cancro do Pulmão, Pulmonares, XXX Congresso da Sociedade Portuguesa de Pneumologia, Epic Sana Algarve hotel, Albufeira, 6 a 8 de Novembro de 2014
4. Cytotoxic Effects of Ionizing Radiation in Lung Cancer and Large Diffuse B Cell Lymphoma: an in vitro an in vivo study. Nottingham Trent University, 5 de Dezembro de 2014
5. Doentes com Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células e Radioterapia. Caracterização das Células T e Níveis de TNF-Alfa. XXX Congresso da Sociedade Portuguesa de Pneumologia, Epic Sana Algarve hotel, Albufeira, novembro 6 a 8 de Novembro de 2014
6. The interaction Between P53 and Oxidative Stress Levels in a Lymphoma Cell Line Irradiated with Ionizing Radiation, 2nd Congress of Croatian Chamber of Health Professionals Professional Department for Medical laboratory Activities., 29.05.-01.06.2014., ZAGREB, HOTEL ESPLANADE
7. Radiotherapy in Lymphoma and Lung Cancer patients - TNF-Alpha levels and TCell subsets, 2nd IPLEiria Internacional Health Congress | Challenges & Innovation in Health, 08 e 09 de maio de 2014
8. Ionizing Radiation Effects in two Cancer Cell Lines, the interplay between Oxidative Stress Levels and P53, Journal Club, National Maternal Institute, Dublin, Ireland, 28 de Abril de 2014
9. Cytotoxic Effects of ionizing Radiation in Cancer Cell Lines of Small Cell Lung Cancer and Large Diffuse B cell Lymphoma - A Therapeutic tool, Regional European Biomedical Laboratory Science Congress, and the 4th Greek Medical Laboratory Technologists Conference, Athens, Greece on 5-7 December, 2013
10. Avaliação dos níveis de TNF- α e células do sistema imune em doentes com cancro do pulmão de não pequenas células submetidos a radioterapia, 1as Jornadas de Cancro do Pulmão do IPO de Coimbra, Hotel Tivoli de Coimbra, 30 de Novembro e 1 de Dezembro de 2013

11. Cellular and Molecular characterization of X Radiation effects, in small cell lung cancer and Non-Small Lung Cancer - an in vitro study, I Annual Meeting Coimbra Health School, Jornadas Científicas de Análises Clínicas e Saúde Pública – Oncologia, 13 de abril de 2013
12. Radio and chemotherapy effects in lung cancer cell lines and lymphoma. Killing them or arresting cell cycle? Segundo Congresso Português de Proteção Contra Radiações e do Terceiro Congresso de Proteção Contra Radiações dos Países e Comunidades de Língua Portuguesa, Auditório Lispolis, Polo Tecnológico Lisboa, 20 a 23 de novembro de 2012
13. Combined effect of chemotherapy and radiation therapy (Rx) in cell lines of lung cancer, XXIX Congresso de Pneumologia- Novos Caminhos para a Pneumologia em Portugal, Sociedade Portuguesa Pneumologia, Epic Sana | Praia da Falésia - Algarve, 25 a 27 de outubro de 2013
14. X radiation effects on Small cell Lung Cancer and Non-small Lung Cancer- An in vitro study. European Cancer Congress; 2013 de 27 de setembro a 1 de outubro de 2013; Amsterdão, Holanda
15. Combined effect of chemotherapy and radiation therapy (Rx) in cell lines of lung cancer, XXIX Congresso de Pneumologia- Novos Caminhos para a Pneumologia em Portugal, Sociedade Portuguesa Pneumologia, Epic Sana | Praia da Falésia - Algarve, 25 a 27 de outubro de 2013
16. Combined effect of chemotherapy and radiation therapy (Rx) in cell lines of lung cancer, XXIX Congresso de Pneumologia- Novos Caminhos para a Pneumologia em Portugal, Sociedade Portuguesa Pneumologia, Epic Sana | Praia da Falésia - Algarve, 25 a 27 de outubro de 2013
17. X radiation effects on Small cell Lung Cancer and Non-small Lung Cancer- An in vitro study. European Cancer Congress; 2013 de 27 de setembro a 1 de outubro de 2013; Amsterdão, Holanda

Comunicações sob a forma de poster

1. Ionizing Radiation Effects in two Non-Small Cell Lung Cancer and one Small Cell Lung Cancer Cell lines. NML 2015, Reykjavik, Iceland 4-6 de June 2015
2. Evaluation of the ionizing radiation effects on DNA damage, P53 expression, cell cycle and death on a diffuse large B-cell lymphoma cell line (Farage). NML 2015, Reykjavik, Iceland 4-6 de June, 2015
3. T Cells Subsets and TNF-alpha Levels in Lung Cancer Patients under Radiotherapy, VI Annual Meeting of IBILI, IBILI, Coimbra 11 e 12 de Dezembro de 2015
4. Ionizing Radiation Effects in Lung Cancer – An in vitro study, 1st Congress The Portuguese Association for Cancer Research – ASPIC, Fundação Calouste Gulbenkian, 26 e 27 de Novembro de 2015

5. Immune System Response after Radiotherapy in Non---Small Cell Lung Cancer Patients, 1st Congress The Portuguese Association for Cancer Research – ASPIC, Fundação Calouste Gulbenkian, 26 e 27 de Novembro de 2015
6. Effects of ionizing Radiation on H69 cell line, Congress of the European Association Cancer Research, Munique, 5 a 8 julho de 2015
7. Impact of ionizing radiation on lymphoma Cell Line -Cell Death ,BAX/BCL-2,P53 Expression, 2nd IPléiria Internacional Health Congress | Challenges & Innovation in Health, 08 e 09 de maio de 2015
8. Ionizing radiation induce DNA damage and cell cycle arrest in a lung cancer cell line, 2nd IPléiria Internacional Health Congress | Challenges & Innovation in Health, 08 e 09 de maio de 2015
9. Radiotherapy effects in TNF-Alpha levels and T Cells subsets in Non-Small Cell Lung Cancer and Diffuse Large B Cell Lymphoma, 25th International Congress on Anti-Cancer Treatment, Palais du Congrès, Paris, França, 4 a 6 de fevereiro de 2014
10. Cell Death and Cell Cycle Arrest on Non-Hodgkin Lymphoma cell line, the biological response after x-ray irradiation with high doses, Atualizações em oncologia 2014, 28ª Reunião - 3º Congresso do CIMAGO, Hospitais da Universidade de Coimbra, 23 a 25 de janeiro de 2014
11. The TNF-Alpha dynamics during radiation therapy and T Cells subsets in Diffuse Large B Cell Lymphoma and Non-Small Cell Lung Cancer patients, Atualizações em oncologia 2014, 28ª Reunião - 3º Congresso do CIMAGO, Hospitais da Universidade de Coimbra, 23 a 25 de janeiro de 2014
12. Radiotherapy effects in Tregs, NK cells and DN T cells in Non-Small Cell Lung Cancer and Diffuse Large B Cell Lymphoma, XXXIX Annual Meeting of the Portuguese Society of Immunology, Bench&Bedside: Meeting on the Bridge, Faculdade de Medicina de Universidade de Coimbra, 13 a 15 de novembro, de 2013
13. Combined effect of chemotherapy and radiation therapy (Rx) in cell lines of lung cancer, XXIX Congresso de Pneumologia- Novos Caminhos para a Pneumologia em Portugal, Sociedade Portuguesa Pneumologia, Epic Sana | Praia da Falésia - Algarve, 25 a 27 de outubro de 2013
14. X radiation effects on Small cell Lung Cancer and Non-small Lung Cancer- An in vitro study. European Cancer Congress; 2013 de 27 de setembro a 1 de outubro de 2013; Amsterdão, Holanda
15. Characterization of oxidative stress markers, p53, cell cycle and death after X irradiation in cell lines – FARAGE and H69, 24th International Congress on Anti-Cancer Treatment, Palais du Congrès, Paris, França, 5 a 7 de fevereiro de 2013
16. Evaluation of the effects of X radiation in Lymphoma and Lung Cancer cell lines – The interplay between oxidative stress and p53 levels. Atualizações em oncologia 27ª Reunião - 2º Congresso do CIMAGO, Hospitais da Universidade de Coimbra, 23 a 25 de janeiro de 2013

17. Effects of X radiation on Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell line, IV Annual Meeting IBILI, Polo III, Health Science Campus, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal, 6 e 7 de dezembro de 2012
18. Efeitos da Radiação X no Cancro do Pulmão de Pequenas Células — Estudo em células em cultura, XXVIII Congresso de Pneumologia, Tróia, Portugal, 9 a 11 de novembro de 2012
19. Chemotherapy and irradiation effects on cell lines – FARAGE and H1299, The 30th World Congress of Biomedical Laboratory Science, Berlim Alemanha, 18 a 22 de Agosto de 2012

Fernando Mendes

De: journal@sciepub.com [mailto:journal@sciepub.com]
Enviada: terça-feira, 16 de Fevereiro de 2016 10:10
Para: fjmendes@estescoimbra.pt
Assunto: Review Result (Paper ID: 1001800064) from SciEP

Dear Fernando Mendes,

Your manuscript, Paper ID: 1001800064, entitled "Single shot irradiation and molecular effects on a diffuse large B cell lymphoma cell line" has been subjected to a double-blind review process by the reviewers who are experts in the related fields.

Based on the reviewers' recommendations, I am delighted to inform you that your manuscript has been **ACCEPTED WITH MINOR REVISIONS** for the *Journal of Cancer Research and Treatment*.

Please login to our Online Manuscript Tracking System to read the review result. Your login details are as follows:

UserID: FernandoMendes

Password: ibili2016

Online Manuscript Tracking System Website: <http://mts.sciepub.com/>

Please login to your account to do the following things.

- 1) Click "Download Comment File" link to view the editors' comments.
- 2) Revise your paper according to the editors' suggestions.
- 3) Click "Upload Resubmission File" link to upload your revised paper.

Please note that it is imperative for you to revise the manuscript according to reviewers' comments and guidelines.

Once you have revised the manuscript, please e-mail it in MS Word format to me at journal@sciepub.com on or before **26 February 2016**, with a cover letter outlining point-by-point the revisions you have made in regards to the reviewers' comments and guidelines.

Thank you very much for submitting your article to the *Journal of Cancer Research and Treatment*. I look forward to receiving the revised version of your manuscript.

Please add editorial@sciepub.com and billing@sciepub.com to your contact list (Your registered email id in SciEP website), in order to avoid spam.

Best regards,

Emma Taylor
Email: journal@sciepub.com
Science and Education Publishing
Enclosures: Referees' reports

Single shot irradiation and molecular effects on a diffuse large B cell lymphoma cell line

Fernando Mendes^{1,2,3,4}, Cátia Domingues^{3,5}, Susann Schugk⁶, Ana Margarida Abrantes^{1,3}, Ana Cristina Gonçalves^{3,5}, Tiago Sales¹, Ricardo Teixeira¹, Rita Silva¹, Jéssica Estrela² Mafalda Laranjo^{1,3}, João Casalta-Lopes^{1,7}, Clara Rocha^{8,9}, Paulo César Simões⁷, Ana Bela Sarmiento^{3,5,10}, Maria Filomena Botelho^{1,3}, Manuel Santos Rosa¹¹

1-Biophysics and Biomathematics Institute, IBILI-Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal; 2-Polytechnic Institute of Coimbra, ESTESC-Coimbra Health School, Department Biomedical Laboratory Sciences, Coimbra, Portugal; 3-CIMAGO, FMUC-Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal; 4-CNC.IBILI, Universidade de Coimbra, Portugal; 5-Oncobiology and Hematology Laboratory Applied Molecular Biology and Clinical University of Hematology, Faculty of Medicine of University of Coimbra, Coimbra, Portugal; 6-Biomedical Laboratory Sciences Department, University of Gothenburg; 7 - Radiation Oncology Department, Hospital and University Center of Coimbra, Coimbra, Portugal; 8 - Polytechnic Institute of Coimbra, ESTESC-Coimbra Health School, Department Complementary Sciences, Coimbra, Coimbra, Portugal; 9 - Institute for Systems Engineering and Computers at Coimbra, Coimbra, Portugal; 10 – Hematology Clinic Department, Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal; 11-Immunology Institute, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

Corresponding Author

Fernando Mendes

Biophysics Unit-IBILI.CNC, Faculty of Medicine of University of Coimbra, Portugal

Azinhaga Santa Comba, Celas

3000-548 Coimbra, Portugal

Tel: +351239480240. Fax: +351239480258

fjmenDES@estescoimbra.pt **Conflict of interest statement**

The authors declare that they have nothing to disclose.

ABSTRACT

Purpose:

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is a hematological malignancy, being the most common type of aggressive, non-Hodgkin lymphoma. Our study aims to evaluate the cellular and molecular effects of high doses ionizing radiation (IR) in a DLBCL cell line.

Materials and Methods:

Farage cells were cultured and exposed to 0.5-60 Gy of IR. Cell viability and proliferation were assessed by trypan blue assay. Cell survival was determined with clonogenic assay. Cell death was measured by flow cytometry (FC) and optical microscopy. Cell cycle, mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, GSH and BAX/BCL-2 ratio were measured by FC. DNA damage was evaluated using comet assay. Total and phosphorylated P53 was measured by western blot.

Results:

IR induced cytotoxic and cytostatic effects in Farage cells in a dose and time dependent manner with LD50 of 1.73 Gy. Cell death occurs mainly by apoptosis or later apoptosis/necrosis with an increase in BAX/BCL-2 ratio and an increase of ROS production. Cell cycle arrest occurred in G₂/M phase and an increase in DNA damage as well as P53 total and phosphorylated expression levels.

Conclusions:

High doses of IR induces a time and dose dependent response which leads to increased ROS production, DNA damage with concomitant increased of P53 expression and activation, resulting in G₂/M cell cycle arrest with main type of cell death apoptosis/necrosis. Our results showed that single shot IR induces effects in different cell components and its comprehension is essential to choose the treatment planning.

Keywords: Large diffuse B cell lymphoma; Radiotherapy; Genotoxicity; Oxidative stress; Cell death; P53.

INTRODUCTION

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is recognized as a heterogeneous group of hematological malignancies, and collectively forms the most common type of aggressive, non-Hodgkin lymphoma (NHL) [1].

Within the largest category, DLBCL, not otherwise specified, gene expression profiling (GEP) studies have identified two distinct molecular subtypes, termed germinal center B cell (GCB) and activated B cell (ABC), although 15 % of patients remaining unclassifiable, which are believed to represent lymphomas arising from different stages of lymphoid differentiation [2, 3]. Standard treatment of NHL involves chemotherapy, a combination of pharmaceuticals consistent of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone and monoclonal antibody anti-CD20 (rituximab), abbreviated by R-CHOP, and complementary Radiotherapy (RT) [1]. Radiotherapy as part of the therapy has been controversial and lively debated during past decades.

Recent guidelines [4] emphasise RT as an important complement to chemotherapy, regardless tumour stage and presence of bulky events. R-CHOP treatment has proven to provide very effective results in limited or advanced stage of the disease. However, treatment solely involving R-CHOP submits patients to chemotherapy-induced toxicities, which may be avoided with the use of radiotherapy [1]. Radiation doses used for patients with a variety of lymphoma histologies have been reduced over the last decade. A randomized study from UK demonstrated no difference between applying RT in a dose of 30 vs 45 Gy in patients with DLBCL [5]. For stage I/II of the disease, a dose of 30 Gy is currently considered standard therapy in the setting of a negative PET scan post-chemotherapy [6]. RT produces very high local complete response rates for all lymphoma subtypes and given this high clinical efficacy, it is not surprising that RT has played an important part in curative treatment of a broad range of lymphomas over the past half century [7].

The different forms of RT, such as involved field radiation therapy (IFRT), involved nodal radiation therapy (INRT) or involved site radiotherapy (ISRT) with R-CHOP improve prognostic outcomes and overall survival rates. The different RT methods alone may be used in chemotherapeutic unresponsive patients or who developed adverse effects. The establishment of radiotherapy as a possible treatment strategy in DLBCL could provide beneficial prognostic advantage in early stage or localized disease.

Ionizing radiation (IR) induces direct and indirect cell effects, namely single and double strand breaks in DNA, sister-chromatide exchanges, micronucleation, mutations, gene expression alterations, oxidative stress (OS) and apoptosis. Many tumors show an increased expression of antioxidant molecules, which could enhance the RT resistance in tumor cells by neutralizing oxygen reactive species, being this one of the major problems associated with RT failure [1]. Moreover, OS effects may be mediated by mitochondria dysfunction and/or

alternation of P53 expression levels. However, a better understanding of these molecular mechanisms can help to overcome these problems. Thus, the aim of our study was to evaluate and characterize the cellular and molecular effects of single shot doses of X radiation in a DLBCL cell line.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

We used the DLBCL Farage cell line (ATCC® CRL-2630™). Farage cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma, USA), 1% penicillin-streptomycin (GIBCO 15140-122, UK) at 37°C with 5% CO₂ in a humidified incubator. For all experiments cells were plated at an initial density of 0.5x10⁶ cells/ml.

Irradiation

Cell suspensions were exposed to ionizing radiation (0.5–60 Gy) in a Varian 600C Linear Accelerator 12D10 (LINAC, Radiology Oncology Systems Inc., USA), a low photon energy radiator delivering high energy photon beams. In this study the energy interval of LINAC ranges between 1-50 MeV. For samples irradiation photons of 4 MeV was used. Standards of the International Code of Practice for Dosimetry, TRS-398, published by International Atomic Energy Agency were assumed as references for calibration and dose calculations [8]. The device allows administration of 50-250 monitor units (MU)/minute and 1 MU corresponds to 0.022 Gy [8, 9]. Dose administration was cumulative and applied from two different angles (90° and 270°) to ensure conformity field (Table 1). For clonogenic assay cells were irradiated with 0.5 Gy, 2 Gy, 5 Gy, 8 Gy, 12 Gy, 15 Gy, 30 Gy, and 60 Gy. For all other experiments cells were irradiated with 0.5 Gy, 15 Gy, 30 Gy, and 60 Gy.

Cell Viability and Proliferation assay

Cell viability and proliferation were assessed by trypan blue exclusion assay, as described previously [10]. During 96 h, cells were harvest and number of stained (nonviable) and unstained (viable) cells were counted using a Neubauer chamber, each 24 h. Viability was calculated as percentage of viable cells and cell proliferation was determinate by number of viable cells (density).

Clonogenic assay

Cell suspensions were irradiated with different doses and then plated into six well plates and incubated as described above. After 7 days of growth, cells were fixed, stained with crystal

violet (0.4% in methanol) and counted. Plate efficiency (PE) and survival factor (SF) was calculated [11–13].

Evaluation of cell death and mechanisms of cell death

Farage cells were exposed to IR and after 48h the type of cell death was assessed by morphological May-Grünwald-Giemsa stained slides and flow cytometry using annexin V (AnV) and propidium iodide (PI) double staining [14, 15]. For morphological assessment, cells were transferred to slides, fixed, stained and evaluated under light microscopy, using a Nikon Eclipse 80i equipped with a Nikon Digital Camera DXm 1200F. For flow cytometry analysis, AnV/PI double staining were performed according to manufacturer's protocol (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Immunostep, Spain). Briefly, 0.5×10^6 cells/ml were washed in ice-cold phosphate buffer saline (PBS), centrifuged at 500xG for 5 min, suspended in AnV binding buffer and incubated with AnV fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated and PI. After 15 min in the dark, cells were diluted in 400 μ l of binding buffer, and analyzed by using a six parameter, four color FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) equipped with an argon laser 15 nW. For each test, 1×10^6 cells were used and data on at least 10,000 events was obtained using Cell Quest Software (Becton Dickinson) and analyzed by means of Paint-a-Gate software (Becton Dickinson).

Moreover, BAX and BCL-2 expression levels were analyzed by flow cytometry and BAX/BCL2 ratios were calculated [14]. For this, 0.5×10^6 cells/ml were incubated with monoclonal antibodies anti-BAX conjugated with phycoerythrin (PE) (Santa Cruz Biotechnology Inc.) and anti-BCL-2 conjugated with FITC (Santa Cruz Biotechnology Inc.), according to manufacturer's protocol.

Mitochondrial membrane potential (MMP) was evaluated using the 5.5'.6.6'-tetrachloro-1.1'.3.3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1) (Molecular Probes, Invitrogen, USA) [10, 14]. Succinctly, 0.5×10^6 cells/ml were washed with PBS, centrifuged at 300xG for 5 min, and incubated with JC-1 at a final concentration of 5 μ g/ml during 15 min at 37°C in dark. After cells were washed with PBS and analyzed by FC. Results are presented as monomer (M)/aggregate (A) ratio.

Cell cycle analysis

For cell cycle analysis, 0.5×10^6 cells/ml were washed with PBS, centrifuged at 500xGg for 5 min, and then fixed in 70% ethanol at 4°C for 30 min in the dark. After, cells were washed in PBS and incubated with PI/RNase solution (PI/RNase, Immunostep, S.L., Salamanca, Spain) for 15 min in the dark, as described elsewhere [14, 16]

Oxidative stress evaluation

Oxidative stress was evaluated through reactive oxygen species (ROS) production and anti-oxidative defenses, using oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA), dihydroethidine (DHE), and mercury orange. For that, 0.5×10^6 cells/ml were incubated with 5 μ M of DCFH₂-DA (Molecular Probes, Invitrogen, USA) for 30 min, or with 2 μ M of DHE (Sigma-Aldrich, USA) for 15 min, or with 40 μ M of mercury orange (Sigma, EUA) for 15 min, at 37°C in dark. Cells were washed with PBS, and fluorescence was detected by flow cytometry [11, 17, 18].

Total and phosphorylated P53 expression evaluation

Total and phosphorylated P53 were evaluated by western blot analysis according to standard protocol described [12]. Briefly, 48 h after radiation exposure, total protein extracts were prepared on ice using a solution of radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer supplemented with cComplete Mini (Roche) for total P53 evaluation and with PhosphoStop® (Roche) for phosphorylated P53. After sonication and centrifugation with 14,000xG, the samples were kept at -80°C. Protein content was determined by bicinchoninic acid method. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed in a 10% acrylamide gel for 20 min at 80 V followed by 160 V till 90 min. Subsequently proteins were electrotransferred at 100 V during 1 h to nitrocellulose (PVDF) membranes. PVDF membranes blocking was performed with 5% bovine serum albumin in tris-buffered saline tween-20 (TBS-T) for 1 h at room temperature with stirring. Incubation with primary antibodies against total P53 (1:200) (P53 DO-7; Sc47698 Santa Cruz Biotechnology, California, USA), phosphorylated P53 (1:100) (P53-18; sc-13580, Santa Cruz Biotechnology, California, USA) and β -actin (1:10,000) (Anti- β -Actin mouse monoclonal antibody, A5441, Sigma, USA) was performed overnight at 4°C. After several washes with TBS-T, membranes were incubated with secondary antibody (1:10,000) (anti-mouse antibody) for 1 h at room temperature and subsequently washed again. Finally the blots were stained with fluorescent dye and reading in a 9000 Typhoon FLA equipment. Quantification of fluorescence was performed by ImageQuant Software (GEHealthcare).

Comet assay

Damage in cell DNA was analyzed with alkaline single-cell gel electrophoresis, comet assay 48 h after radiation exposure [12, 19]. As positive control cells were incubated with 20 nM of hydrogen peroxide (Sigma Aldrich®, EUA) for 15 min at 4°C. Controls and treated cells were collected and counted in order to prepare a suspension with 5×10^4 cell/ml⁻¹. Cells suspensions were diluted 1:1 in 1% low melting point agarose and applied in slides previously overlaid with 1% normal melting point agarose. The slides were submerged in alkaline lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO and 1% Triton x-100, Sigma Aldrich®, EUA)

overnight. Slides were equilibrated in alkaline electrophoresis buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) and then were submitted to a potential difference of 25 V and current of 1 A, during 15 min. After electrophoresis, slides were incubated in neutralizing buffer (0.4 M Tris, pH 7.4) 3 times, 5 min each, and stained with 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ethidium bromide for 20 min. Slides were washed in distilled water and visualized in a fluorescent inverted microscope with a 100W mercury lamp which excitation wavelength was 546 nm with an emission of 580/10 nm. Image acquisition was performed with the software Motic Images 2.0 (Microscope world, EUA).

Statistical analysis

All results are expressed as a mean \pm standard error (SEM) of a minimum of four independent experiments. Statistical analysis was performed using software IBM SPSS® v.19 (National Opinion Research Center, Chicago, USA). To evaluate the normality of distribution of variables Shapiro-Wilk test was used. When distribution was normal parametric tests were used, otherwise non parametric tests were used. Comparison of results was performed using Mann-Whitney test (non parametric test). Comparison of the qualitative variables between more than two groups was obtained using Kruskal-Wallis (non parametric test) or using the ANOVA 1 Fixed Factor test (parametric test). Multiple comparisons were performed considering Bonferroni correction. Comparison of results of clonogenic assays with respective control was performed by determination of 95% confidence range, considering significant when this value did not include the value 1.

RESULTS

Viability, proliferation and survival

Farage cells exposed to ionizing radiation decreased viability and proliferation depending of dose and time, as shown in Fig. 1. Viability, after exposure, decreases significantly ($P < 0.05$ for 0.5 Gy and $P < 0.001$ for 15, 30 and 60 Gy).for all doses tested and the half inhibitory dose was about 30 Gy, as seen in Fig. 1A. The behaviour of proliferation along time and with the radiation doses was different. With 0.5 Gy exposure a modest cell growth during the first 24 hours was observed, that is maintained for all times considered. For other exposures (15, 30 and 60 Gy) a continuous and significant ($P < 0.001$) decrease was observed for all times comparing to controls (Fig. 1B).

Related to survival factor (SF) , all radiation exposure significantly reduced it also depending of dose. The median lethal dose (LD_{50}) was 1.73 ± 0.27 Gy calculated applying the linear-quadratic model.

Cell death

Cell death was evaluated through different methodologies in order to understand what are the mechanisms involved, 48 hours after radiation exposure (Fig. 2).

Morphological features of Farage cells May-Grünwald-Giemsa stained are shown in Figure 2A. Morphologic studies demonstrated that exposure to lower doses ionizing radiation induced an increase in the number of cells undergoing morphological characteristics of apoptotic cell death, such as blebbing, chromatin condensation, nuclear fragmentation and apoptotic bodies (Fig. 2A-B and A-C). Moreover, exposure to higher doses showed an increase in the number of cells undergoing necrosis, as observed in Fig. 2A-D and 2A-E.

Flow cytometry results using AnV/PI double staining showed that IR decreases significantly Farage cells viability in a dose dependent manner. In fact, as we can observe in Fig. 2B, comparing to control cells (85.80±0.92%) exposure to 0.5 Gy (66.50±1.73%, $P<0.001$), 15 Gy (55.40±2.14%, $P<0.001$), 30 Gy (49.20±3.09%, $P<0.001$) and 60 Gy (41.60±2.16%, $P<0.001$). Moreover, once IR reduced the number of viable cells, we can observe an increase in apoptotic population compared to control (6.60±0.51%), namely for 0.5 Gy (22.17±1.14%, $P<0.001$), 15 Gy (31.80±1.66%, $P<0.001$), 30 Gy (38.00±2.65%, $P<0.001$) and 60 Gy (33.80±0.58%, $P<0.001$). We also observed a significant increase in late apoptotic/necrotic cell population compared to control (1.20±0.20%) to 0.5 Gy (7.83±1.19%, $P=0.038$), 15 Gy (9.60±1.44%, $P=0.009$), 30 Gy (9.00±1.70%, $P=0.029$) and 60 Gy (9.20±0.66%, $P=0.0013$).

In order to evaluate some mechanisms IR apoptosis modulating, BAX/ BCL-2 ratio was analysed by flow cytometry. As observed in Fig. 2C, increasing doses of IR induce a significant increase of BAX/BCL-2 ratio compared to control: 0.5 Gy (1.24±0.06, $P=0.014$), 15 Gy (1.57±0.07, $P=0.001$), 30 Gy (1.75±0.05, $P=0.001$) and 60 Gy (1.90±0.12, $P=0.005$).

Moreover, to confirm mitochondrial involvement in cell death induced by IR exposure, MMP was evaluated by flow cytometry using JC1 dye. In apoptotic cells, mitochondrial membrane potential collapses, and JC-1 cannot accumulate within the mitochondria, remaining in the monomeric form in cytosol. We observed an increase in M/A of JC1 proportional increasing doses of IR, reflecting a decrease in MMP. Thus, as depicted in Fig. 2D, MMP increases with exposure to radiation doses of 0.5 Gy (1.07±0.002, $P=0.045$), 15 Gy (1.39±0.04, $P=0.002$), 30 Gy (1.59±0.04, $P=0.001$) and 60 Gy (1.71±0.10, $P=0.006$).

Cell cycle and oxidative stress

As IR induced antiproliferative effects, we assessed distribution of Farage cells in cell cycle. The results obtained are illustrated in Fig. 3A. We observed, 48h after IR exposure, a significant increase in pre-G₀/G₁ peak between control (2.60±0.51%) and 15 Gy (12.50±1.57%, $P<0.001$), 30 Gy (19.33±0.99%, $P<0.001$) and 60 Gy (12.25±1.60%, $P<0.001$). We also observed a significant decrease in G₀/G₁ phase compared to control (64.20±1.6%) and 15 Gy

(31.00±1.93%; $P<0.001$), 30 Gy (32.33±2.39%, $P<0.001$) and 60 Gy (41.50±0.96%, $P<0.001$). There was a significant cell cycle arrest in G₂/M phase after IR exposure, comparing to control (10,40±1,72%) for the doses of 15 Gy (29.00±3.54%, $P<0.001$), 30 Gy (25.33±3.54%, $P<0.001$) and 60 Gy (42.25±2.75%, $P<0.001$).

Moreover, ROS levels (peroxides and O₂⁻) were determined using the probes DCFH-DA and DHE, respectively, as well as the antioxidant defence GSH. Generally, as showed in Fig. 3B, ROS production significantly increases after IR exposure. In fact, significant increase of peroxides was observed compared to control for the doses of 15 Gy (1.22±0.07, $P=0.043$), 30 Gy (1.93±0.08, 0.001) and 60 Gy (1.22±0.05, 0.024). Similar results were observed for superoxide anion, with a significant increase compared to control for the doses of 15 Gy (1.39±0.08, $P=0.016$), 30 Gy (1.82±0.15, $P=0.011$) and 60 Gy (1.55±0.13, $P=0.024$). GSH levels also showed a significant increase for the dose of 30 Gy (1.26±0.09, $P=0.046$) and 60 Gy (1.31±0.05, $P=0.004$), as showed in Fig. 3B.

DNA damage

IR is usually related with mono and/or bis-alkylation of DNA and consequently to cell death. According to Figure 4A, we observed an increase of comet numbers more pronounced after 30 Gy of IR exposure. We also observed a significant increase of tail moment compared to control for doses of 15 ($P<0.001$), 30 Gy ($P<0.001$) and 60 Gy ($P<0.001$), as showed in Figure 4B.

P53 expressions

P53 protein plays a key role in regulation of multiple cellular steps, alterations in this protein disrupt normal cell regulation. As we can observed in Figure 5A, IR induces a significant increase in total P53 expression levels compared to control for the doses of 15 Gy (1.90±0.11, $P=0,001$) and 30 Gy (2.74±0.26, $P=0.001$). On the same way, phosphorylated P53 levels increased in Farage cells compared to control when cells were exposure to IR for all doses, 0.5 Gy (1.22±0.07, $P=0.044$), 15 Gy (1.64±0.16, $P=0.007$) and 30 Gy (2.66±0.24, $P=0.006$), as described in Figure 5B.

DISCUSSION

Radioresistance stands as a fundamental barrier that limits effectiveness of radiotherapy in cancer treatment. Recent evidences suggest that radioresistance is due to tumor repopulation and involves several signaling pathways. Thus, by better understanding the cellular and molecular mechanisms induced by IR may contribute, in the near future, to reduce the number of cases of radiorresistance [1]. Although RT is being slowly phased out by other treatment strategies, including chemotherapy, it is still a highly important treatment. Establishment of radiotherapy

as a possible treatment strategy in DLBCL could provide beneficial prognostic advantage in early stage or localized disease [1]. To date, completion of radiotherapy treatment, using high single doses, was not extensively studied, partly due to recent innovations in irradiation devices and in the planning and use of three-dimensional functional image that begin to be used in treatment regimens [1]. Thus, it becomes essential to study the effects of radiotherapy, evaluating proliferation, viability, type of induced death and injury to DNA of cells exposed to different single doses of IR.

Our results showed that IR induces cytotoxic and antiproliferative effects in Farage cells in a dose and time dependent manner until 96 hours of incubation. However, these results give us a short time evaluation of IR effect, and clonogenic assay is the gold standard for survival factor in long time. On this way, we also verified that LD50 for Farage cells is $1,73 \pm 0,61$ Gy which is low, compared to other cell lines, namely in solid tumors such as A549 and H460 cells, using the Shepherd Mark 1 68 Irradiator, (^{137}Cs Irradiator) (JL Shepherd, San Fernando, CA, USA) dose rate of 70.6 rad/min at room temperature. [20], and compared with the results obtained by us in a study concerning three lung cancer cell lines [14]. In fact, IR induces activation of multiple intracellular mechanisms such as DNA damage, cell cycle arrest and ROS production [14]. In our study, we observed that the mechanism that IR induced cell death in Farage cells is dose dependent, inducing cell death mainly by apoptosis, as observed by increased cell populations in apoptotic cell death and increased BAX/BCL-2 and M/A ratios. This results were also observed by us in the P53^{Wild} A549 cells [14]. These results may be related to significant increase in ROS production, namely by the increase in superoxide anion and H₂O₂ which was also evaluated by other authors [21–23]. On the other side, after IR exposure Farage cells try to recover from the imbalance in oxidative environment by increasing GSH levels significantly. Other authors provided evidence for two distinct phases of ROS generated following IR exposure, one that revealed a late ROS increase associated with reduced GSH, and MMP and another related to exogenous ROS that induces cytochrome *c* release directly in isolated mitochondria which indicates that late ROS production is associated with critical mitochondrial functions, likely to be tightly linked to caspase activation and cytochrome *c* release [24]. Moreover, in our study we observed that participation of mitochondria pathway is also regulated by a tight balance between pro-apoptotic BAX and anti-apoptotic BCL-2 which are crucial to IR mechanism [14, 25].

IR exposure also induced cell cycle arrest in Farage cells in G₂/M phase, which may be related with significant increase in ROS production and DNA damage followed by great and concomitant increase in total P53 and in pP53, which plays a key role in apoptosis regulation and cell cycle arrest, as we had observed in A549 lung cancer cell line [14]. Indeed, P53 activation is well known to regulate apoptotic cell death, after exposure to cellular insults, including DNA damage, oncogene activation or hypoxia [26–28]. After DNA injury, P53^{wild} is

activated promoting cell cycle arrest, transactivation of repairing enzymes and, if damage cannot be repaired, apoptosis [26–28]. Due to its alterations, such as mutations and altered expression, P53 promotes growth advantage and ensures survival in cancer cells by inhibiting apoptotic response necessary for tumor suppression [23, 29, 30]. Montero *et al.* (2013) showed that P53 can also control non-apoptotic cell death and it may be selected by cancer cells to provide not only their resistance to apoptosis but also to necrosis, and this mechanism may explain resistance to chemo and radiotherapy even when leading to non-apoptotic mechanisms [26].

In summary, our results showed that IR induces cell death in a time and dose dependent manner. The study of the type of cell death and the underlying mechanisms in this cell line revealed that IR in Farage cells induces damage that leads to intrinsic apoptotic cell death. On this way, cell death occurs preferential by apoptosis or later apoptosis/necrosis with significant increase in ROS production, DNA damage leading to increased expression and activation of P53, resulting in G₂/M cell cycle arrest. Our results showed that IR effects can alter a significant number of cellular and molecular targets and that its comprehension is essential to highlight the importance of IR on DLBCL treatment.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Portuguese Foundation for Science and Technology for the financial support (Strategic Project PEst-C/SAU/UI3282/2013 and UID/NEU/04539/2013, COMPETE-FEDER) and to Radiotherapy Service of the Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

References

1. Mendes, F., Domingues, C., Teixo, R., Abrantes, A. M., Gonçalves, A. C., Nobre-Gois, I., ... Rosa, M. S. (2015). The importance of radiotherapy on diffuse large B cell lymphoma treatment: a current review. *Cancer and Metastasis Reviews*, 34(3), 511–525. doi:10.1007/s10555-015-9581-1
2. Zelenetz, A. D., Wierda, W. G., Abramson, J. S., Advani, R. H., Andreadis, C. B., Bartlett, N., ... Naganuma, M. (2013). Non-Hodgkin's lymphomas, version 1.2013: Featured updates to the NCCN guidelines. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 11(3), 257–273. Retrieved from <http://www.jnccn.org/content/11/3/257.short>
3. Tilly, H., & Dreyling, M. (2010). Diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 21 Suppl 5(suppl_5), v172–v174. doi:10.1093/annonc/mdq203
4. Boyle, J., Beaven, A. W., Diehl, L. F., Prosnitz, L. R., & Kelsey, C. R. (2014). Improving Outcomes in Advanced DLBCL: Systemic Approaches and Radiotherapy. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 28(12). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25510806>
5. Wirth, A. (2007). The rationale and role of radiation therapy in the treatment of patients with diffuse large B-cell lymphoma in the Rituximab era. *Leukemia & lymphoma*, 48, 2121–2136. doi:10.1080/10428190701636468

6. Illidge, T., & Tolan, S. (2008). Current treatment approaches for diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma*, 49(4), 663–676. doi:10.1080/10428190701882187
7. Illidge, T. (2011). X. When should radiotherapy be used in lymphoma? *Annals of Oncology*, 22(Supplement 4), iv57–iv60. doi:10.1093/annonc/mdr176
8. Andreo, P., Burns, D. T., Hohlfeld, S., Huq, M. S., Kanai, T., Laitano, F., & Vynckier, S. V. (2011). *Absorbed Dose Determination in External Beam Radiotherapy: An International Code of Practice for Dosimetry based on Standards of Absorbed Dose to Water*. (A. 2006. Andreo P, Burns DT, Hohlfeld S, Huq MS, Kanai T, Laitano F, et al. Absorbed Dose Determination in External Beam Radiotherapy: An International Code of Practice for Dosimetry based on Standards of Absorbed Dose to Water. vol. 2006. Vienna, Ed.) (IAEA., Vol. 2011). Vienna, Austria.
9. Gibbons, J. P. (2001). Monitor Unit Calculations for External Photon and Electron Beams. In *AAPM Annual Meeting Refresher Course* (pp. 1–10). Salt Lake City.
10. Gonçalves, A. C., Alves, V., Silva, T., Carvalho, C., Oliveira, C. R. De, & Sarmiento-Ribeiro, A. B. (2013). Oxidative stress mediates apoptotic effects of ascorbate and dehydroascorbate in human Myelodysplasia cells in vitro. *Toxicology in Vitro*, 27(5), 1542–1549. doi:10.1016/j.tiv.2013.03.009
11. Mamede, A. C., Pires, A. S., Abrantes, A. M., Tavares, S. D., Gonçalves, A. C., Casalta-Lopes, J. E., ... Botelho, M. F. (2012). Cytotoxicity of Ascorbic Acid in a Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (WiDr): In Vitro and In Vivo Studies. *Nutrition and Cancer*, 64(7), 1049–1057. doi:10.1080/01635581.2012.713539
12. Santos, K., Laranjo, M., Abrantes, A. M., Brito, A. F., Gonçalves, C., Sarmiento Ribeiro, A. B., ... Abrantes, M. (2014). Targeting triple-negative breast cancer cells with 6,7-bis(hydroxymethyl)-1H,3H-pyrrolo[1,2-c]thiazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 79, 273–81. doi:10.1016/j.ejmech.2014.04.008
13. Franken, N. a P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1(5), 2315–2319. doi:10.1038/nprot.2006.339
14. Mendes, F., Sales, T., Domingues, C., Schugk, S., Abrantes, A. M., Gonçalves, A. C., ... Rosa, M. S. (2015). Effects of X-radiation on lung cancer cells: the interplay between oxidative stress and P53 levels. *Medical Oncology*, 32(12), 266. doi:10.1007/s12032-015-0712-x
15. Gonçalves, A. C., Barbosa-Ribeiro, A., Alves, V., Silva, T., & Sarmiento-Ribeiro, A. B. (2013). Selenium Compounds Induced ROS-Dependent Apoptosis in Myelodysplasia Cells. *Biological Trace Element Research*, 154(3), 440–447. doi:10.1007/s12011-013-9749-x
16. Serra, A. C., Rocha Gonsalves, A. M. D. a, Laranjo, M., Abrantes, A. M., Gonçalves, A. C., Sarmiento-Ribeiro, A. B., & Botelho, M. F. (2012). Synthesis of new 2-galactosylthiazolidine-4-carboxylic acid amides. Antitumor evaluation against melanoma and breast cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 398–402. doi:10.1016/j.ejmech.2012.04.003
17. Laranjo, M., Serra, A. C., Abrantes, M., Piñeiro, M., Gonçalves, A. C., Casalta-Lopes, J., ... Botelho, F. (2013). 2-Bromo-5-hydroxyphenylporphyrins for photodynamic therapy: photosensitization efficiency, subcellular localization and in vivo studies. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 10(1), 51–61. doi:10.1016/j.pdpdt.2012.05.003
18. Almeida, S., Sarmiento-ribeiro, A. B., Januário, C., Rego, A. C., & Oliveira, C. R. (2008). Evidence of apoptosis and mitochondrial abnormalities in peripheral blood cells of Huntington ' s disease patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(4), 599–603. doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.009
19. Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols*, 1(1), 23–29. doi:10.1038/nprot.2006.5
20. Gomez-Casal, R., Bhattacharya, C., Ganesh, N., Bailey, L., Basse, P., Gibson, M., ... Levina, V. (2013). Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes. *Molecular cancer*, 12(1), 94. doi:10.1186/1476-4598-12-94

21. Yamaguchi, M., & Kashiwakura, I. (2013). Role of reactive oxygen species in the radiation response of human hematopoietic stem/progenitor cells. *PloS one*, *8*(7), e70503. doi:10.1371/journal.pone.0070503
22. Lee, J. H., Kim, S. Y., Kil, I. S., & Park, J.-W. (2007). Regulation of ionizing radiation-induced apoptosis by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *The Journal of biological chemistry*, *282*(18), 13385–94. doi:10.1074/jbc.M700303200
23. Yamamori, T., Yasui, H., Yamazumi, M., Wada, Y., Nakamura, Y., Nakamura, H., & Inanami, O. (2012). Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radical Biology and Medicine*, *53*(2), 260–270. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033
24. Chen, Q., Chai, Y.-C., Mazumder, S., Jiang, C., Macklis, R. M., Chisolm, G. M., & Almasan, A. (2003). The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction. *Cell Death and Differentiation*, *10*(3), 323–334. doi:10.1038/sj.cdd.4401148
25. Loriot, Y., Mordant, P., Dugue, D., Geneste, O., Gombos, A., Opolon, P., ... Deutsch, E. (2014). Radiosensitization by a novel Bcl-2 and Bcl-XL inhibitor S44563 in small-cell lung cancer. *Cell death & disease*, *5*, e1423. doi:10.1038/cddis.2014.365
26. Montero, J., Dutta, C., van Bodegom, D., Weinstock, D., & Letai, A. (2013). p53 regulates a non-apoptotic death induced by ROS. *Cell death and differentiation*, *20*(11), 1465–74. doi:10.1038/cdd.2013.52
27. She, Q., Bode, A. M., & Ma, W. (2001). Resveratrol-induced Activation of p53 and Apoptosis Is Mediated by Extracellular- Signal-regulated Protein Kinases and p38 Kinase Resveratrol-induced Activation of p53 and Apoptosis Is Mediated by Extracellular-, 1604–1610.
28. Wu, G. S. (2004). The Functional Interactions Between the p53 and MAPK Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy*, *3*(2), 156–161.
29. Lien, J.-C., Huang, C.-C., Lu, T.-J., Tseng, C.-H., Sung, P.-J., Lee, H.-Z., ... Lu, T.-L. (2015). Naphthoquinone derivative PPE8 induces endoplasmic reticulum stress in p53 null H1299 cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2015*, 453679. doi:10.1155/2015/453679
30. Chen, X., Liao, C., Chu, Q., Zhou, G., Lin, X., Li, X., ... Yue, Z. (2014). Dissecting the molecular mechanism of ionizing radiation-induced tissue damage in the feather follicle. *PloS one*, *9*(2), e89234. doi:10.1371/journal.pone.0089234

Table 1. Exposure doses of ionizing radiation and the equivalent value of monitor units (MU). 1 Gy = 67 MU. Irradiation was performed from two angles (90° and 270°). The total dose given was the cumulative dose (numbers in brackets).

Dose (Gy)	0.5	2 (0.5+1.5)	5 (2+3)	8 (5+3)	12 (8+4)	15 (12+3)	30 (15+15)	60 (30+30)
Angle 90° (MU)	23	67	133	133	178	133	669	1387
Angle 270° (MU)	23	67	134	134	179	134	669	1387
Number of fractions	1	1	5	1	1	1	1	1

Figure legends

Figure 1 – Farage cell viability (A), proliferation (B) and survival (C) after exposure to IR. (A) Dose-response curves and (B) cell proliferation of Farage cells obtained by Trypan Blue exclusion assay, assessed 24h, 48h, 72h and 96h after IR exposure. Results are expressed as percentage of viability, normalized to control, and as cell density (number of viable cells), respectively. (C) Representation of survival factor assessed by clonogenic assay 7 days after exposure to IR. Results are normalized to control as mean±SEM of at least six independent experiments. Statistical significance is represented for each dose in relation to control: 0.5 Gy; *** $P<0.001$; 15 Gy ° $P<0.05$; °° $P<0.01$; °°° $P<0.001$; 30 Gy ‘ $P<0.05$; ‘‘ $P<0.01$ ‘’’ $P<0.001$); 60 Gy # $P<0.05$, ## $P<0.01$; ### $P<0.001$.

Figure 2 – Evaluation of Farage cell death induced by ionizing radiation. (A) Assessment of morphologic features of Farage cells by May-Grunwald-Giemsa staining after IR exposure. Representative images of Control, 0.5 Gy, 15 Gy, 30 Gy, and 60 Gy. Arrows represent the formation of *blebbings*. Amplification 400X. (B) Cell viability and types of cell death of Farage cells 48h after IR exposure assessed by flow cytometry by Annexin V/Propidium Iodide double staining. Results are expressed as mean±SEM of percentage of viable cells and cells undergoing cell death by initial apoptosis, late apoptosis/necrosis and necrosis, of at least four independent experiments. (C) Assessment of BAX/BCL-2 ratio 48h after IR exposure. (D) Evaluation of mitochondrial membrane potential 48h after IR exposure, assessed by flow cytometry using JC-1. Results are expressed as mean±SEM of mean intensity fluorescence normalized to control of at least four independent experiments. Statistical significance is expressed in relation to control as: $P<0.05$, ** $P<0.01$ e *** $P<0.001$.

Figure 3 – Evaluation of cell cycle and oxidative stress alterations after IR exposure on Farage cells. (A) Assessment of cell cycle by flow cytometry and graphic representation of phases of cell cycle in Farage cells. Results are expressed as mean±SD of percentage of cells identified for each phase of cell cycle of at least four independent experiments. Assessment of oxidative stress by flow cytometry by evaluation of intracellular levels of peroxides (B), superoxide anion (C) and GSH (D) in Farage cells. Results are expressed

as mean intensity of fluorescence as mean±SEM of at least four independent experiments. Statistical significance is expressed in relation to control: * $P<0,05$, ** $P<0,01$ e *** $P<0,001$.

Figure 4 – Genotoxicity induced in Farage cells after IR exposure. (A) Illustrative photographs of single cell gel electrophoresis (comet assay) in DLBCL cell line Farage, 48h after exposure to IR with the doses of 0.5 Gy, 15 Gy, 30 Gy, 60 Gy and control (CTR). (B) Representation of tail moment determined by comet assay 48h after IR exposure. Results are expressed as mean±SD of six independent experiments (n=6), with a minimum of 100 comets for each condition. Statistical significance is expressed in relation to control: *** $P<0.001$

Figure 5 – Expression of total P53 (A) and phosphorylated P53 (B) in Farage cells, 48h after exposure to IR. Results are expressed as mean intensity of fluorescence of total P53/actin ratio (A) and pP53/actin ratio (B) normalized to control after exposure to 0.5 Gy, 15 Gy and 30 Gy. Graphics represent mean±SEM of four independent experiments while images are representative immunoblots of expression of total P53 and pP53 and β -actin for each experimental condition. Statistical significance is represented in relation to control: $P<0.05$; ** $P<0.01$.

Figure 1 – Cell viability, proliferation and survival

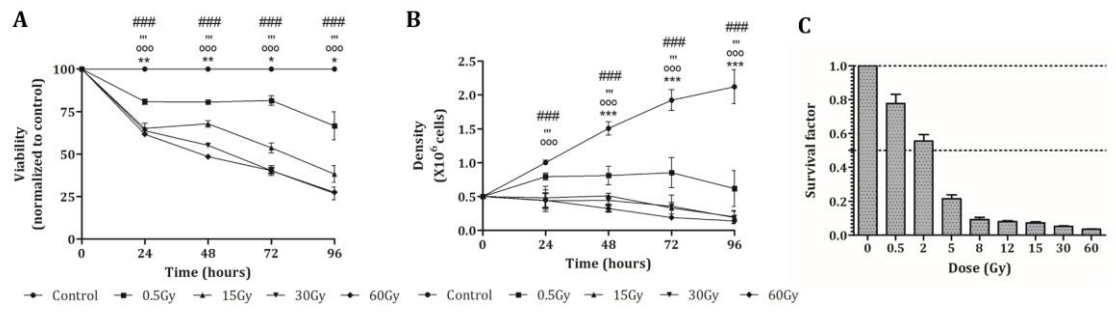


Figure 2 – Cell death mechanisms

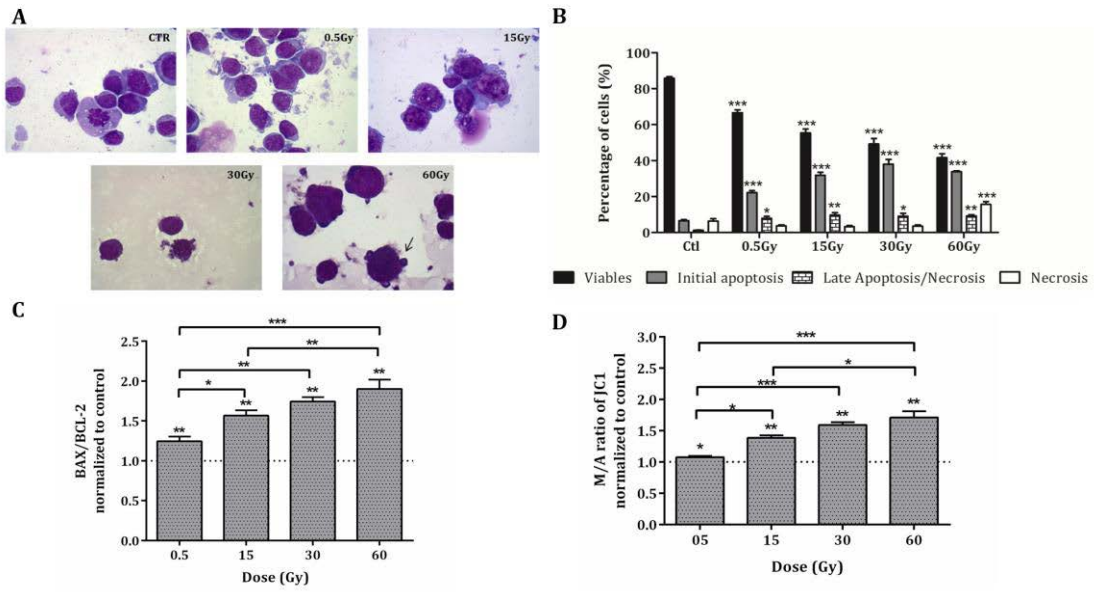


Figure 3 – Cell cycle and oxidative stress alterations

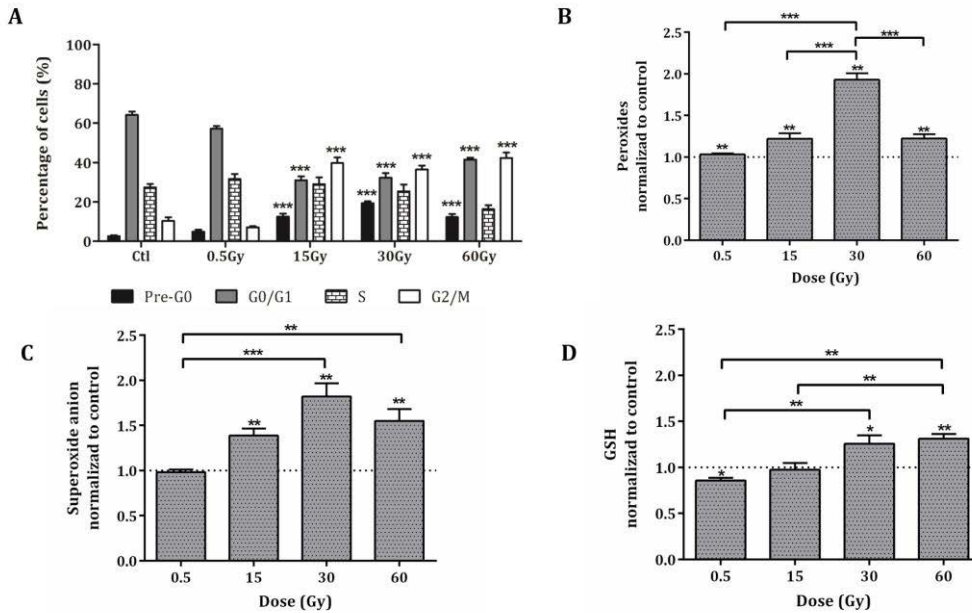


Figure 4 – Genotoxicity

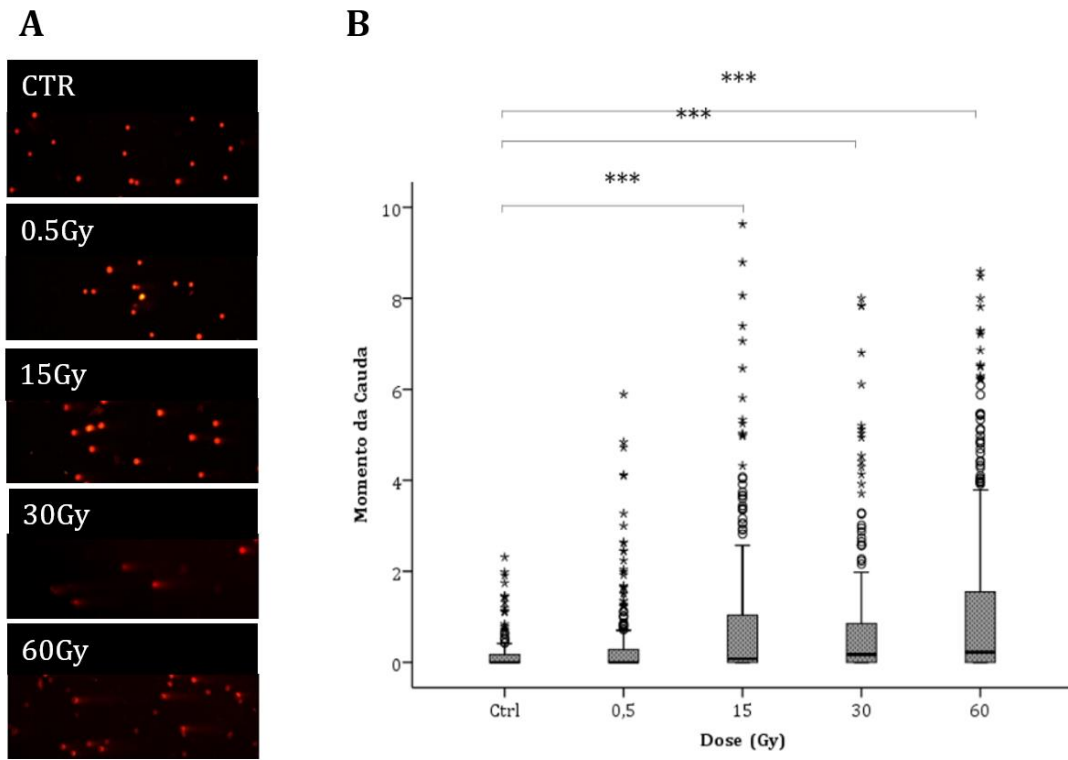
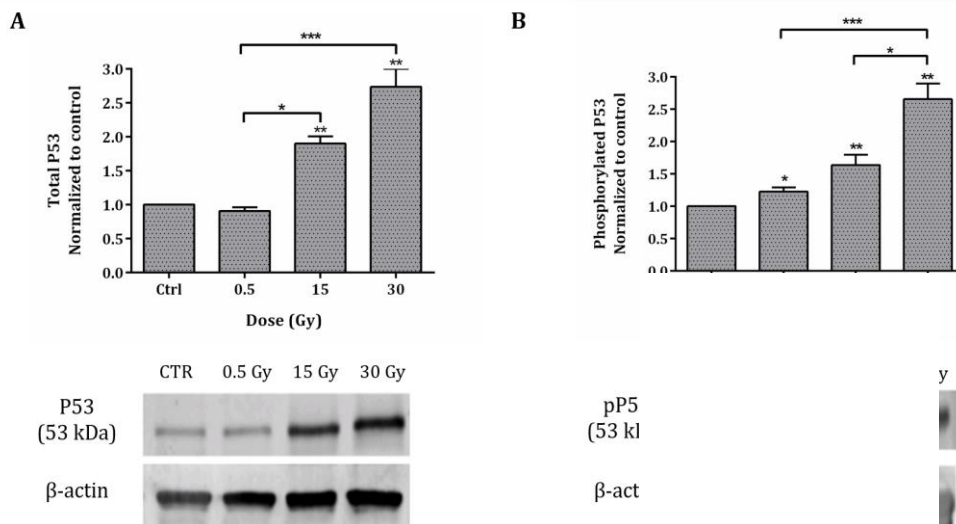


Figure 5 – P53 and pP53





Review

The role of immune system exhaustion on cancer cell escape and anti-tumor immune induction after irradiation



Fernando Mendes ^{a,b,c,d,*}, Cátia Domingues ^{c,e}, Paulo Rodrigues-Santos ^{c,f,g,h}, Ana Margarida Abrantes ^{a,c}, Ana Cristina Gonçalves ^{c,e}, Jéssica Estrela ^b, João Encarnação ^a, Ana Salomé Pires ^{a,c,d}, Mafalda Laranjo ^{a,c,d}, Vera Alves ^f, Ricardo Teixeira ^a, Ana Bela Sarmiento ^{c,e,g}, Maria Filomena Botelho ^{a,c}, Manuel Santos Rosa ^f

^a Biophysics and Biomathematics Institute, IBILI-Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal
^b Polytechnic Institute of Coimbra, ESTESC-Coimbra Health School, Department Biomedical Laboratory Sciences, Coimbra, Portugal
^c CIMAGO, FMUC-Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal
^d CNC.IBILI, University of Coimbra, Portugal
^e Applied Molecular Biology and Clinical University of Hematology, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal
^f Immunology Institute, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal
^g Hematology Clinic Department, Coimbra Hospital and University Centre, Coimbra, Portugal
^h Immunology and Oncology Laboratory, Center for Neurosciences and Cell Biology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 5 January 2016
 Received in revised form 5 February 2016
 Accepted 6 February 2016
 Available online 9 February 2016

Keywords:
 Cancer
 Immune system
 Regulator T cells
 Innate
 Acquire
 Natural Killer cells

ABSTRACT

Immune surveillance seems to represent an effective tumor suppressor mechanism. However, some cancer cells survive and become variants, being poorly immunogenic and able to enter a steady-state phase. These cells become functionally dormant or remain hidden clinically throughout. Neoplastic cells seem to be able to instruct immune cells to undergo changes promoting malignancy. Radiotherapy may act as a trigger of the immune response. After radiotherapy a sequence of reactions occurs, starting in the damage of oncogenic cells by multiple mechanisms, leading to the immune system positive feedback against the tumor. The link between radiotherapy and the immune system is evident. T cells, macrophages, Natural Killer cells and other immune cells seem to have a key role in controlling the tumor. T cells may be dysfunctional and remain in a state of T cell exhaustion, nonetheless, they often retain a high potential for successful defense against cancer, being able to be mobilized to become highly functional. The lack of clinical trials on a large scale makes data a little robust, in spite of promising information, there are still many variables in the studies relating to radiation and immune system. The clarification of the mechanisms underlying immune response to radiation exposure may contribute to treatment improvement, gain of life quality and span of patients.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. The role of inflammation on cancer and immune system response	168
2. Immunosuppression: the participation of regulatory T cells and Myeloid-Derived Suppressor Cells	170
3. Immune system “exhaustion” and cancer	171
4. The immune system and radiotherapy	172
5. Conclusions and future perspectives.	174
Conflict of interest statement	174
Acknowledgments	174
References.	174

1. The role of inflammation on cancer and immune system response

Cancer is a multistep process that results from the alterations in normal proliferation, differentiation and/or cell death mechanisms and has recently been associated with energy metabolism reprogramming and the evasion of immune destruction [1].

* Corresponding author at: Departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais, ESTESC-Coimbra Health School, Rua 5 de Outubro, São Martinho do Bispo, 3046-854 Coimbra, Portugal.

Immune surveillance function executed by the immune system seems to represent an effective tumor suppressor mechanism, thus contributing to the incidence and progression of cancer [2].

In fact, chronic and persistent inflammation strongly contributes to tumor initiation by generating genotoxic stress and leading to cell proliferation, tumor progression, angiogenesis promotion and tissue invasion and, thus originating a favorable tumor microenvironment [3]. Habits such as smoking, unhealthy eating or contaminated food as well as infections, obesity, radiotherapy and environmental pollution represent stimuli that may induce and promote both cancer development and inflammatory processes. The inducing inflammation may be exogenous (pathogens, allergens, irritants or toxic compounds) or endogenous (oxidative stress, injured cells). Approximately 20% of all neoplasms are associated with persistent unresolved inflammation and most, if not nearly all solid tumors have inflammatory infiltrates [4,5].

Nowadays, it is well known that cancer may have higher incidence when there is a concomitant reduction in the functionality of the immune system. It was previously described that, in conditions of immunosuppression, as in the case of transplanted patients, there may be the risk of increasing tumor growth, due to viral replication or due to a reduction of the immune surveillance system [6].

Several studies with animal models demonstrate that the immune system can effectively protect mice from tumescence of various types of primary tumors as well as transplanted tumors [7].

Moreover, Denkert et al. postulated that the incidence of spontaneous tumors in aging and susceptibility to carcinogen-induced sarcomas is more prominent in mice which do not express interferon-gamma (IFN- γ), or in immunodeficient mice with absent T cells, B cells, Natural Killer (NK) cells and Natural Killer T (NKT) cells. When the immune system identifies neoplastic cells, it culminates in tumorigenesis, tumor removal or balance and subsequent escape of the tumor, a process called tumor edition. Little is known about tumor development into a unique balance in terms of immune environment, due to its autologous origin, the process of tumor edition and its unique microenvironment [8].

The immune system has the ability to eliminate tumor cells (Fig. 1, from A to E), but some cells survive becoming variants of previous existing cells, being poorly immunogenic and able to enter a steady-state phase. These cells become functionally dormant or remain hidden even clinically throughout, as observed in Fig. 1F. This process requires active endogenous immune mechanisms. These are supported by accumulating evidence suggesting that metastases may derive from very early disseminated tumor cells. The long-lasting latency periods

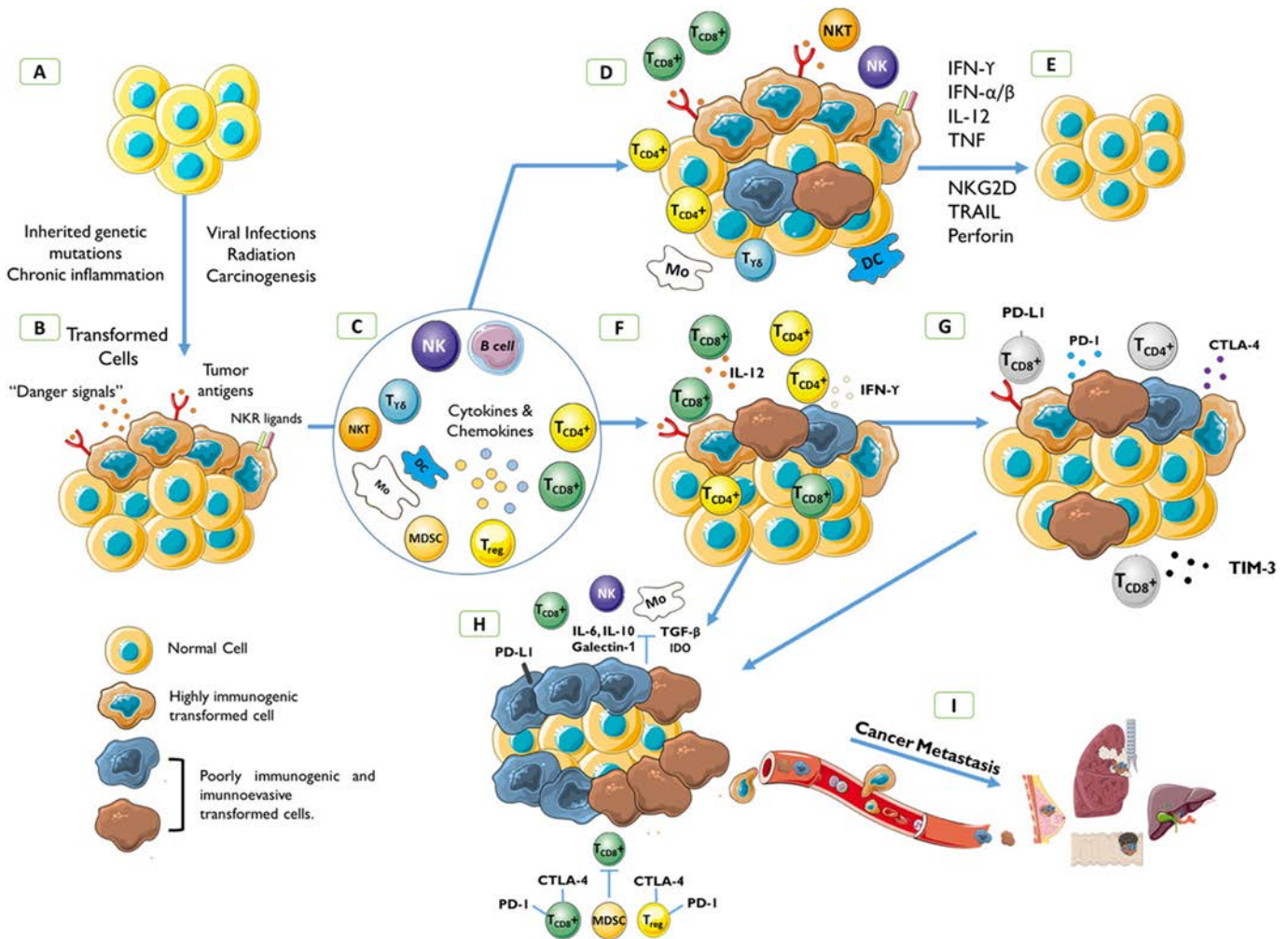


Fig. 1. Immune system's response to cancer. A – normal tissue; B – transformed tissue due to several causes, with production of “danger signals”, tumor antigens; C – immune system activation and response to the cell transformation, cross talk between innate and acquired immune response; D – elimination of transformed cells, due to the immune cells, cytokine and chemokine production; E – normal tissue restored; F – inhibition of the proliferation of transformed cells, equilibrium between the answer of the immune system and those cells, selected proliferation of transformed cells “protected” from the immune system, these cells accumulate mutations and gain ability to prevent the destruction of the immune system under selection pressure; G – immune system “exhaustion” permitting cancer cells to rapidly proliferate and escape (TCD4⁺ and TCD8⁺ in gray); H – clonal rapid proliferation of the “protected” transformed cells, immune system Th2 polarization, inhibition of cytotoxic immune cells, metastasis; I – metastasis to lung, liver, colon or breast.

depend on the presence of a subpopulation of tumor cells which is poorly immunogenic and therefore capable of avoiding immune surveillance mechanisms. However with slow growth rates, these cells are not able to grow into overt tumors. Consequently, it has been proposed that cancer stem cells meet these criteria, being not only long-lived, but also remarkably well protected from immune-attacks. These dormant tumor cells, by expressing low but persistent levels of tumor antigens, contribute to the maintenance of long-term memory and genetic abnormalities in these cells, and may generate phenotype alterations enabling immune evasion and reactivation of these cells. Thus, dormant tumor cells residing in a metastatic site proliferate at a slow rate and are maintained at a constant population size by the active control of T CD8⁺ cells, which are present at elevated frequencies as a result of stimulation by tumor antigens displayed on the surface of dormant tumor cells [9].

During the steady-state, cells of the adaptive immune system (CD4⁺, CD8⁺) as well as effector molecules (e.g. IFN- γ , interleukin (IL)-12) are primarily responsible for preventing and inhibiting tumor development [10].

After this equilibrium phase, two different mechanisms may emerge. One related with the immune system, that may become “exhausted” (Fig. 1G), losing the ability to eliminate cancer cells, meaning that they may proliferate actively without control [11–13]. The other mechanism which may appear after the equilibrium phase (Fig. 1F) is related with the acquisition of additional mutations by cancer cells under selective mechanisms. These cells will present a different phenotype, be poorly immunogenic, become immuno-evasive, more resistant to immune destruction (Fig. 1H) and evade the immunological surveillance. Due to these alterations, cancer cells gain the capacity to metastasize (Fig. 1I) [2].

Inflammation, cytokines and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) were identified as the three major contributors to an emerging microenvironment facilitating tumorigenesis. In some types of cancer, namely lung, ovarian, and gastro esophageal, high levels of IL-6, IL-8 and IL-13 were quantified in ascites, bronchoalveolar lavage, serum and tumor tissues, which are usually correlated with a poor prognosis [14].

It has been shown that chemically induced carcinogenesis in animal models requires the involvement of pro-inflammatory cytokines/signaling, such as IL-1 β , IL-13, IL-23 and the gene of *myeloid differentiation primary response 88 (MYD88)* [15]. The tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is proved to be a major inflammatory cytokine that is able to induce hemorrhagic necrosis and rapid elimination of the tumor. However, some studies found that cancer patients with increased TNF- α values showed a poor prognosis as it also plays a role as a tumor promoter, namely by the activation of oncogenes and tumor cell invasion to nearby tissues, inducing angiogenesis and chemotherapy resistance [16]. STAT3 acts as a crucial point for various oncogenic signaling pathways being activated constitutively, either in immune cells or in tumor cells present in the tumor microenvironment. Activation of STAT-3 induces upregulation of various genes involved in cell proliferation and survival as C-Myc, survivin, and cyclin 01/02. It also promotes pro-oncogenic inflammation by IL-6, vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and hypoxia inducing factor 1-alpha (HIF-1 α) and suppression of the immune response (IL-10, TGF-13). On the other hand, STAT-1 and NF- κ B levels are mediated by an immune response of cytokine type 1 produced by T helper cells (Th1, as IL-12, CXC motif chemokine 10 (CXCL10), IFN- γ , MHC class II, CD80, CD86) [17].

It was also observed that microenvironment produces several factors with systemic impact and anti-inflammatory effects. Moreover, it has the ability to desensitize local inflammation due to the previously mentioned factors often observed in neoplastic disorders, which have been associated with an inability to mount inflammatory reactions in different locations of the tumor [18].

Solid tumors are not composed solely of heterogeneous tumor cell clones. In some way, tumor formation proves to be very similar to tissue

remodeling processes and organ development. In the case of solid tumors, these consist of tumor cells, fibroblasts, endothelial cells, blood vessels, lymph vessels and immune cells, factors such as cytokines, chemokines, as well as products of cellular metabolism and extracellular matrix. The tumor immune cells infiltrate in the tumor microenvironment leading to the activation of cellular and molecular complex interactions between tumor cells and immune cells influencing the ability of tumor progression and metastasis [19].

Some studies suggest that the type, density, activation state and the location of lymphocytic infiltrates in the tumor may contribute to patient treatment and outcome. Thus, a high T CD8⁺ cell count and low T CD4⁺ FoxP3⁺ cells in tumor infiltrated after neoadjuvant chemotherapy have been associated with a significant improvement in free survival and survival of patients [20]. Tumor infiltrated with T CD3⁺ cells, T CD8⁺ cells, granzyme B⁺ and CD45RO⁺ cells in the center and/or at the invasive border are associated with better prognosis and prolonged survival [21].

The distinct coordination of specific genes involved in an immune response type Th1 in combination with cytotoxic markers, but not related with expression of genes of the immune response type Th2, or genes related to angiogenesis and immunosuppression was associated with high density of CD45RO⁺ memory cells. The count of T CD8⁺ and CD45RO⁺ cells appears to be a useful immunologic criterion for the prediction of tumor recurrence and poor long-term survival, for example, in patients with colorectal cancer at initial stage [22]. Other studies demonstrated a significant positive correlation between the presence of cytotoxic T cells and effector memory cells, as well as the innate immune system cells. Activated T cells in colorectal cancer tumors with higher densities of T cells, suggest that a coordinated immune response will be necessary to concentrate the most operative effectors at the tumor site [23].

Previous studies demonstrated that in primary tumors with infiltration of memory T cells, particularly from Th1 group, and cytotoxic agents could be used as a strong prognostic factor in terms of recurrence-free survival and overall survival. This type of information could contribute to decision making on the application of adjuvant therapies in solid cancers in early stages [24]. Another study showed that the presence of tumor-associated lymphocytes (TAL) in breast cancer may be an independent predictor of the response to treatment with neoadjuvant chemotherapy with anthracyclines and taxanes [25].

In general, a large number of lymphocyte infiltration into the tumor means good prognosis, but the tumor itself may recruit other cells of the immune system with opposite effect, such as NK cells, which are present in many tumors [26].

B cells present in tumor infiltrates appear to have an oligoclonal expansion with in situ maturation, representing a specific humoral immune response to the tumor. The presence of B cells and NK cells in metastasized ovarian cancer was correlated with a poor overall survival of patients [27]. Antibodies secreted by B cells, deposited in the tumor stroma, locally activate FcR γ -dependent signaling for the residents and/or recruited myeloid cells, promoting the progression to malignant phenotype. IL-10 derived from B cells seems to induce a M2 type polarization of tumor associated macrophages (TAMs) [28].

Depending on the Th1 or Th2 cytokine profiles, as well as, co-stimulatory molecules present in the medium, NKT cells may enhance or suppress anti-tumor response [29].

2. Immunosuppression: the participation of regulatory T cells and Myeloid-Derived Suppressor Cells

Besides previously mentioned, lymphocytes can activate signaling pathways regulating the immune system and thus acquiring resistance to attack cells of the immune system. Some studies showed that a tumor microenvironment with high numbers of regulatory T (Treg) cells could provide a decrease or suppression of the immune response against the tumor [30].

A high amount of Treg cells in the tumor microenvironment, peripheral blood and lymphoid aggregates appears to contribute to a decrease in the immune response against the tumor, affecting negatively the course of the disease. The inhibition of its function or its depletion also contributes to an anti-tumor response with improvements in the therapeutic response [31].

Forkhead box P3-expressing (FOXP3⁺) Treg cells are heterogeneous, with multiple possible origins (thymus and periphery) and various peripheral functional profiles. Thus, the nomenclature and defining markers of these profiles remain non-standardized. In this review, we grouped the peripheral Treg cell pool into three classifications: 'central', 'effector' and 'tissue-resident'. Central Treg cells constitute the majority of Treg cells in circulation and in secondary lymphoid organs. Also referred to as 'resting' or 'naive' Treg cells in some studies, this population shares phenotypic features (including activation markers and circulation patterns) with naive and 'memory' conventional T cells, yet they are not quiescent, with baseline suppressive function and a history of antigen exposure. In fact, here we reviewed studies in which CD62L^{hi}CCR7⁺ (CC-chemokine receptor 7-positive) or CD45RA^{hi}CD25^{low} Treg cells or performed in bulk Treg cells collected from the secondary lymphoid organs were considered to reflect the central dominance of this population. Effector Treg cells make up a minor fraction of Treg cells in the circulation and secondary lymphoid organs. In some studies they are referred also as 'activated' Treg cells. This population shares phenotypic features with activated conventional T cells and they are variously defined as CD62L^{low}CCR7^{low}CD44^{hi}KLRG1⁺ (killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1-positive) CD103⁺ or CD45RA^{low}CD25^{hi}, depending on the study. Treg cells with this profile are thought to have encountered antigens more recently than central Treg cells, showing enhanced migration through non-lymphoid tissues. However, it is unclear if effector Treg cells are terminally differentiated or if they are capable of returning into a central Treg cell state. Tissue-resident Treg cells are Treg cells that have long-term residence in non-lymphoid tissues, in contrast with the short-term migration observed in effector Treg cells through non-lymphoid tissues. Potentially, each organ might harbor a distinct population of tissue-resident Treg cells, which can adopt functions in addition to local immune regulation. Currently, the best examples of tissue-resident Treg cells are those from adipose tissue, which are marked by the expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ , and gut-resident Treg cells, that are marked by free fatty acid receptor 2 expression [32].

Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) are also present in most cancer patients and in tumor experimental animal models, probably acting as regulators of the immune system, facilitating the escape of the tumor [33].

Neoplastic cells seem to be able to instruct immune cells to undergo changes that promote malignancy. These cells can block the function of T cells and NK cells through secretion of soluble ligands of natural killer group 2 member D (NKG2D). Neoplastic cells also have the ability to produce transforming growth factor (TGF) β , which contributes to change the phenotype of effector T cells in T cell regulation. In turn, it will suppress other effector T cells that infiltrate the tumor. Other factors, not yet entirely identified, seem to induce an upregulation of macrophage cleaning receptor 1 (MSR1) on dendritic cells, which results in excessive absorption of extracellular lipids, reducing its ability to process antigens [34].

The tumor microenvironment is rich in cytokines and other inflammatory mediators, which positively or negatively regulate tumor infiltrating lymphocyte-mediated immune surveillance. For instance, TGF- β , IL-10 and IL-17 have been demonstrated to initiate immunosuppressive networks whereas Th1-associated interferon γ stimulates tumor-specific immunity [9].

The effects of radiotherapy (RT) on immunosuppression also have to be taken into account. Such mechanisms include proportionally increasing Treg incidence, which can be attributed to an inherently higher radioresistance of these cells, as well as induction of TGF- β secretion.

It was shown that TGF- β secretion inhibits systemic immune-activating effects of RT. Blockade of TGF- β was proven not only to induce abscopal RT effects, but also to overcome local immunosuppression. In addition to these observations, expression of co-inhibitory molecules, such as PD-L1, was shown to be induced in tumor cells after local high-dose irradiation. This consequence provides a clear example of the strong rationale for combining RT with immune checkpoint blockade [35].

It was already reported that breast cancer cells produce thymic stromal lymphopoietin, which may contribute to a polarization of the immune system for a Th2-type response with IL-13 and TNF- α production. These changes induce expression of OX40 ligand for dendritic cells, favoring the development of breast tumor. In xenograft animal models, it was found that granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) may be secreted by the tumor cells. Thus it will promote expression of bombina variagata peptide 8 (BV8) in CD11b⁺Gr1⁺ bone marrow cells, facilitating the mobilization of myeloid cells (including neutrophils) and promoting tumor angiogenesis and tumor growth. Tumor cells can also produce bone marrow stromal protein 2 (BST2), changing the phenotype of plasmacytoid dendritic cells (pDC) by immunoglobulin-like signaling pathway transcript 7 (ILT7). Thus, plasmacytoid dendritic cells no longer respond to the danger type 1 signals with production of interferon. Pretreatment with IFN- γ and TNF- α significantly enhances the secretion of the BST2, suggesting that an inflammatory condition in tumor microenvironment contributes to a state of immunoregulation [36].

Thus, although acute inflammation may be beneficial to eradicate tumor cells, chronic and chronic persistent inflammation can contribute not only to carcinogenesis (Fig. 1A to B) but also to induce a state of down regulation of the immune response to cancer cells (Fig. 1G and H) and promote tumor progression and metastasis (Fig. 1I).

3. Immune system "exhaustion" and cancer

T cells are essential components of the immune system and have been the main focus of immunotherapy strategies to increase endogenous anti-tumor immunity. However, despite homing to tumor sites, the infiltrating T cells rarely control tumor growth and T-cell immunotherapy has not been totally successful. Nevertheless, cancer has been hypothesized to be a chronic disease, in a similar manner to chronic viral infections, wherein T cells are stimulated chronically [13]. In patients with untreated cancer, T cells may become dysfunctional and remain in a state of T cell "exhaustion". Nonetheless, they often retain a high potential for successful defense against cancer, indicating that many T cells are not completely and irreversibly exhausted, but can be mobilized to become highly functional [12].

In the course of chronic infections, CD8⁺ T cells become "exhausted" with a poor effector function and expression of multiple inhibitory receptors [e.g., programmed cell death protein 1 (PD-1) and cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4)]. These T cells have low proliferative capacity and cannot persist without antigens. CD8⁺ T cell exhaustion appears to be a prominent feature of many experimental models of chronic infections, but it has also been demonstrated in humans, not only in chronic infections but also in cancer. Despite the importance of exhaustion of CD8⁺ T cells, the underlying molecular mechanisms remain incompletely understood [37].

Recent studies suggest that T-cell exhaustion is an active and tightly regulated process with controlled and stepwise regulation of inhibitory cell surface receptors (e.g., PD-1, lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3), T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3 (Tim-3)) and cytokines, such as IL-2, IL-10 and TGF- β . The existence of active and regulatory pathways points to the possibility of restoring T cell function of "exhausted" cells, which would have immediate clinical potential. Some authors also showed increased expression of exhaustion markers as CD244 and CD160, on T cells PD-1 from chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients [37].

The phenomenon of T cell exhaustion can be very important in the regulation of tumor progression and malignancy. Tumor cells can present two types of antigens, denominated tumor associated antigens (TAA) and tumor specific antigens (TSA) [38]. When the immune system fails to suppress tumors, expressing tumor associated antigens leads to tolerance. This tolerance can be developed when T cells are strongly activated against TAA presented by the MHC and, when this occurs, there is a possibility of T cells to attack normal tissue and then these cells are deleted in the thymus [38]. On the other hand, it also could happen that weakly activated T cells could survive by escaping to deletion and then, under the presence of persistent tumor antigens become anergic due to the absence of co-stimulation [38]. TSA are antigens that are only expressed by tumor cells. These antigens are likely to be immunogenic generating tumor-antigen specific T cells [38]. Thus, exhaustion could lead to the rise of T cells reactive to immunogenic TSA under an environment antigen-rich [39].

An important feature of immune system exhaustion in cancer is the loss of secretion of important molecules such as IL-2, IFN- γ and TNF- α [38] where the loss of production of IL-2 has a crucial role. IL-2 is secreted under exposure to anti tumor specific antigen and can induce the proliferation of T cells, but, on the other hand, persistent exposure to tumor antigens can inhibit IL-2 production, allowing tumor progression [38]. However, the mechanisms that lead to loss of production of IL-2 during T cell exhaustion are not fully understood. Though some pathways have been related to both stimulatory and inhibitory effects on IL-2 regulation during exhaustion, two main pathways have been related to this phenomenon, the T cell receptor (TCR) mediated signaling pathway and CD28 co stimulatory signaling [38]. Besides these signaling pathways, epigenetic and posttranslational alterations can lead to IL-2 loss of production during T cell exhaustion [38]. This is due by the fact that several findings indicate that specific epigenetic modifications of chromatin could lead to distinct differentiation states of T cell subtypes, namely as 'naïve', effector and memory T cells [40].

The signaling pathways regulating IL-2 loss of production during T cell exhaustion are not fully known. However, one interesting link could be the relation of PD-1/programmed death-ligand 1 (PD-L1) signaling pathway with IL-2 transcription. This model has arisen from the finding at several studies that have demonstrated an overexpression of PD-1 in tumor infiltrating T lymphocytes, as well as elevated levels of PD-L1 on tumors. Moreover, PD-1/PD-L1 interaction is associated with exhaustion phenotype as well as with impaired cytokine production, namely IL-2 [38,41].

PD-1 is a transmembrane protein that shares homology with B7/CD28 family of T cell signaling molecules. PD-1 interacts with its ligand PD-L1 and/or PD-L2 and provides a negative regulatory signal to CD4⁺ T and CD8⁺ T cells that ultimately results in phenotype T cell exhaustion. These were recently shown to be effective for the treatment of different cancers [42]. Indeed, early clinical trials blocking the PD-1 pathway showed promising results in solid tumors and are being currently explored in hematologic diseases [37].

Recently findings have pointed out a possible new candidate for cancer immunotherapy by its function at modulation of exhausted CD8⁺ T cells, which is the T-cell immunoglobulin mucin 3 (TIM-3). This is a molecule that acts by inducing a proper termination of inflammation driven by Th1 and Tc1 [43]. Sakuishi and colleagues have demonstrated that TIM-3 is a crucial regulator of non-functional or exhausted CD8⁺ T cell phenotype that can arise in the development of chronic diseases and as well as in cancer being the majority of exhausted CD8⁺ T cell population marked by TIM-3 and PD-1 expression, with simultaneous blockage of this two pathway induce tumor regression [44]. These findings indicate that TIM-3 can play an important role in the regulation of exhausted CD8⁺ T cells. These authors also observed an interesting fact in a multiple distinct group of solid tumors which was that a great majority of CD4⁺FOXP3⁺ Tregs cells (known to expand during tumor progression and by its role in suppression of antitumor immunity)

were also positive for TIM-3 expression, making it a valuable candidate marker of exhausted CD8⁺ T cells and Treg cells [43].

The findings made by Sakuishi and colleagues indicate that Treg cells are marked by TIM-3 and the co-blockade of TIM-3 and PD-1 signaling pathways could lead to the downregulation of the effector molecules in regulatory T cells expressing TIM-3 [43]. This fact revealed to be very important by the fact that TIM-3 marks exhausted CD8⁺ T cells presented at the tumor and the simultaneous blockage of TIM-3 and PD-1 signaling pathways has the ability to restore the normal function of that cells [43,44]. It is expected that anti-Tim-3 antibodies would specifically target Tregs present at intratumoral microenvironment, reducing the side effects associated with autoimmune responses [43].

Taken together, these findings indicate that TIM-3 can be considered an important candidate for immunotherapy in cancer treatment [38, 43–45].

4. The immune system and radiotherapy

Living cells have different sensitivity to ionizing radiation but, in general, cells that reproduce more are also the most radiosensitive ones. This behavior reflects the Bergonie–Tribondeau Law, which postulates that the radiosensitivity of a cell, tissue or organ increases with their reproductive capacity and decreases with the degree of differentiation. Tumor cells are constantly reproducing, and therefore are more sensitive to the effects of radiation than normal surrounding cells. Due to this fact the use of ionizing radiation (IR) becomes a good strategy to effectively eliminate these cells. However, blood cell precursors are also constantly regenerating and consequently they can also be eliminated by IR, causing leucopenia [10,46].

In fact, lymphocytes are known for their vulnerability to radiation as this induces apoptosis in mature T and B cells, decreasing their levels in peripheral blood. The effects of IR can also be detected in the bone marrow, where there are injuries on precursors of granulocytes, monocytes and NK cells, compromising the innate immunity of the patient [47].

Some studies showed that a subpopulation of T cells (CD4⁺ and CD8⁺) has a tendency to decrease after radiation therapy, and patients with a lower number of these cells are usually associated with a poor prognosis, while, on the other hand, a normal number of TCD4⁺ and TCD8⁺ cells is associated with a better survival rate to five years [48].

The physiological cell death that occurs as a product of continuous cell renewal is a non-immunogenic process being even tolerogenic. Although the mass-triggered cell death induced by chemotherapy (CT) and/or radiation therapy contributes to the depletion of the apoptotic process and it will result in acute inflammation and stimulation of an anti-tumor immunity. Therapeutic applications of RT and CT, either as stand-alone therapies or in combination with targeted therapies, should stimulate local and systemic tumor control through the induction of immunogenic forms of cell death, which in turn can initiate persistent anti-tumor immune response [49]. Immunization using the preparation of vaccines with irradiated tumor cells, enriched with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) appears to recruit dendritic cells, plasma cells, NKT and T CD4⁺ and T CD8⁺ cells tumor-reactive, both in mice and in patients with metastatic cancer, inducing the potent, specific and long lasting anti-tumor immunity [50]. Besides the induction of anti-tumor protective immunity, different cancer therapies, including CT and RT, can also activate an inflammatory response, causing necrosis and stimulating the regeneration of tumor tissue and the emergence of treatment resistance [4]. Tumor cell death in response to a therapeutic insult or cell death in an immunogenic form, is a critical moment in the emergence of resistance. The expression of the *multidrug resistance (MDR)* gene family, as well as alterations in the expression of *BCL-2*, *BCL-xL*, *Mcl-1* and *TP53* genes, with direct input into anti-apoptotic pathways can explain the emergence of chemo and radiation resistance [51].

In a context where RT induces tumor cell death, it may be associated with "danger signals" which are released, causing a sterile inflammation.

The release of these positive and negative chemotactic signals in combination with a change in the expression of cell surface structures will influence the choice of phagocytes to engulf, to activate, to differentiate and, subsequently, to initiate adaptive immunity [52].

The combination of certain molecules normally associated with cell death, secreted by cells in induced cell death or already dead, could act as the combination required to activate anti-inflammatory and anti-tumor immune responses. This model has recently been well studied, revealing why some anti-cancer therapies present moderate therapeutic responses [52,53].

Danger signals such as calreticulin, high mobility group box 1 protein (HMGB1), ATP, and heat shock proteins (HSPs) are inducible by several chemotherapeutic drugs or irradiation. They play important roles in the priming of anti-tumor immune responses, but, depending on their location, concentration, and redox state, they can also promote tumor development and progression [49]. Lately, it has become clear that standard treatments, namely RT and CT, can already render tumors and their microenvironment more immunogenic. RT and CT are able to induce both apoptotic and necrotic tumor cell death resulting in surface exposure and release of danger signals or tumor-associated antigens. Therefore it bears the potential to induce adaptive and innate immune responses, resulting in systemic antitumorigenic effects even outside of the field of irradiation. In addition, the release of danger signals or cytokines, such as TNF- α and IFN- γ , by radiation-damaged tumor cells promote dendritic cell maturation and cross-presentation resulting in the regression of more distant tumor masses through activation of tumor-specific T cells. However, in most tumor entities RT alone may not be sufficient to induce such systemic immune reactions [49].

Ultraviolet gamma C radiation, as well as anthracyclines and oxaliplatin, appear to induce translocation of pre-apoptotic calreticulin (CRT) and disulfide isomerase ERp57 to the outer membrane of tumor cells, acting as a stimulating signal for dendritic cells to phagocytose. Several studies demonstrated that CRT and ERp57 exposure contribute to the immunogenicity in cell death [52,54]. High mobility group box 1 protein (HMGB1) is a nuclear transcription factor that is secreted by cells in apoptosis to the medium, functioning as a warning signal and

recruitment calling to local inflammatory cells, such as immature dendritic cells, neutrophils and monocytes. The binding of HMGB1 to toll like receptor 4 (TLR4) seems to facilitate the cross-presentation of tumor antigens by dendritic cells, and thus negatively regulate immunosuppressive function of regulatory T cells. Immune stimulatory roles of HMGB1 may be modified post-transcriptionally. Activation of caspases during apoptosis can induce the production of reactive oxygen species, oxidizing HMGB1 and thereby inducing immunological tolerance. It is known that oxidized HMGB1 increases the cytotoxicity induced by chemotherapeutic agents or ionizing radiation and promotes apoptosis through HSP, usually overexpressed in cancer. It is believed that this is due to high levels of cellular stress in tumor micro-environment [55].

HSPs appear to have a cell protective role and to be involved in the inhibition of apoptosis [56]. Some HSPs such as HSP27, HSP70 and HSP90 are strongly secreted upon treatment with anticancer drugs, oxidative stress and radiation. The membrane expression of these proteins in tumor or dying cells can be potentially immune stimulant due to its ability to interact with certain receptors on antigen presenting cells, such as CD91, lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) and CD40, which facilitates the maturation of dendritic cells and respective presentation of tumor antigens. In addition, HSP also seems to activate NK cells [57,58].

It has been previously shown that CD11b⁺ cells present in the tumor stroma have the ability to capture tumor antigen surrounding cancer cells and, consequently eliminate tumor antigen loss variants, depending on the presence of IFN- γ and TNF- α . Throughout this process, the cooperation between CD4⁺ and CD8⁺ T cells is crucial since TCD4⁺ cells are required not only for the activation of TCD8⁺ cells, but also to the effector phase in tumor microenvironment. The crosstalk between NKT cells, T cells, NK cells and dendritic cells provides an essential help for the maturation of the latter as well as the activation of T cells [59].

It is thought that all immune responses generated against the tumor occur in the lymph nodes, especially in the tumor draining lymph nodes. Some studies point out the existence of similar structures to lymphoid

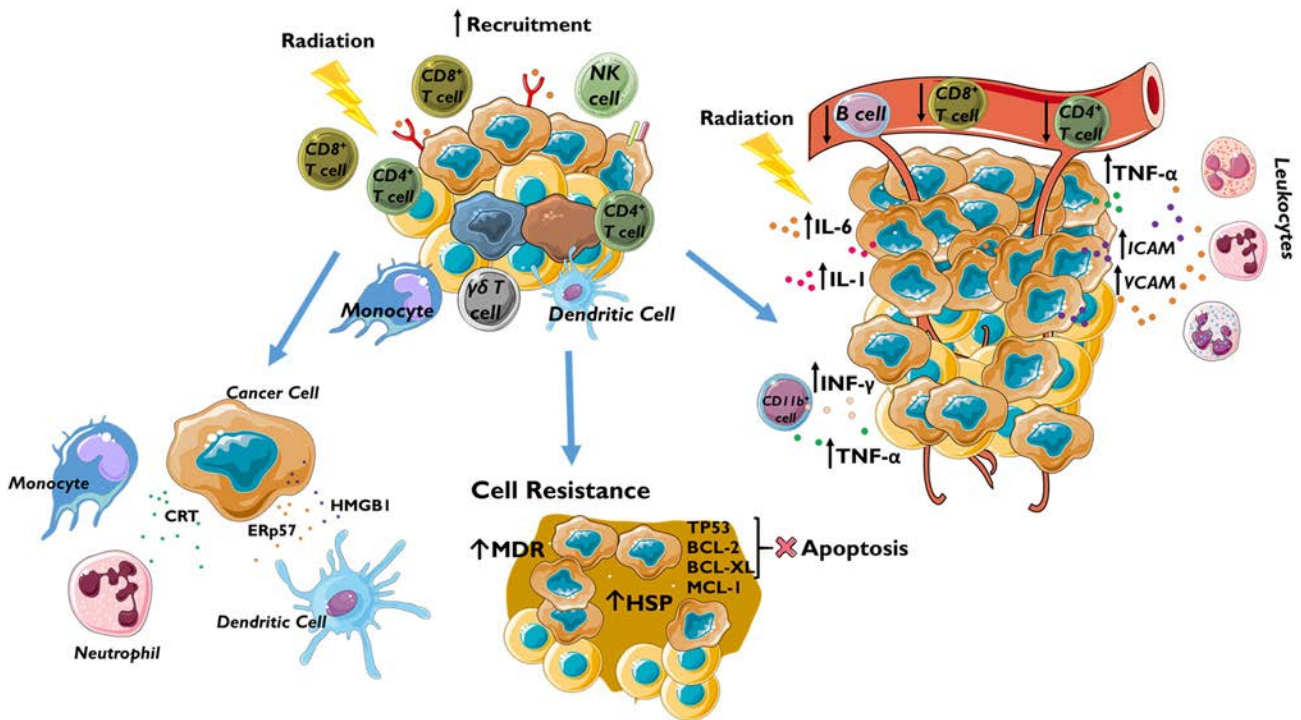


Fig. 2. Radiotherapy effects on the immune system response to cancer treatment. Dying cancer cells release “danger signals” recruiting different immune system cells to the cancer milieu, involving multiple mechanisms of the immune system which can increase and positively feedback the immune response against the tumor (black arrow) or on the other hand induce cell resistance (gray arrow).

glands in the tumor microenvironment, contributing to the regulation of locally adaptive immune responses.

After RT a sequence of reactions occurs following a lesion of oncogenic cells, involving multiple mechanisms of the immune system which can increase the positive feedback of the immune response against the tumor. First, tumor cells respond to ionizing photons by upregulation of acute phase proteins, such as TNF- α , IL-1 and IL-6. MHC I molecules and adhesion molecules, such as intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) or E-selectin, are also upregulated in endothelial cells, contributing to the recruitment of leukocytes through endothelial barriers nearby the tumor, as resumed in Fig. 2 [25,60].

5. Conclusions and future perspectives

Chronic and persistent inflammation strongly contributes to tumor initiation, progression and invasiveness, originating a favorable tumor microenvironment. Cancer may have higher incidence when there is a concomitantly reduction in the functionality of the immune system.

Tumor microenvironment is rich in cytokines and other inflammatory mediators that regulate tumor infiltrating lymphocyte-mediated immune surveillance. For instance, TGF- β , IL-10 and IL-17 have been demonstrated to initiate immunosuppressive networks whereas Th1-associated IFN- γ stimulates tumor-specific immunity. A high amount of Treg cells in the tumor microenvironment, peripheral blood contributes to a decrease in the immune response against the tumor, affecting negatively the course of the disease. Treg cells together with MDSC contribute to tumor cell escape by inhibition of immune system.

It is well known that CD8⁺ T cells tumor-reactive in metastatic cancer induce a potent, specific and long lasting anti-tumor immunity. However, these cells become “exhausted” with a poor effector function and expression of multiple inhibitory receptors (e.g. PD-1, TIM-3 and CTLA-4), having low proliferative capacity. Recent studies suggest that T cell exhaustion is an active and tightly regulated process with controlled and stepwise regulation of inhibitory cell surface receptors and cytokines.

After RT, due to release of several signals which can promote an immune system positive feedback against the tumor, if the tumor microenvironment is enriched with exhausted CD8⁺ T and/or Treg cells, this feedback can be blocked. However, important issues remain to be clarified, e.g. how acute inflammation induced by RT may overcome these negative effects.

Thus, quantification of PD-1, TIM-3 and CTLA-4, as well as CD8 + PD-1hiTIM-3⁺ T cells, Treg cells should be assessed to contribute to new effective anti-tumor treatment strategies. More studies should be done on tumor and hematopoietic cancer cells with the use of monoclonal antibodies against those receptors or molecules on CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells, to clarify the effective contribution of these molecules to the recovery of the exhausted immune cells on patients under radiotherapy, being crucial for prolonged long term surveillance and effector response.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have nothing to disclose.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Portuguese Foundation for Science and Technology for the award Portugal (FCT: UID/NEU/04539/2013, Strategic Project PEst-C/SAU/UI3282/2013, UID/NEU/04539/2013; PEst-C/SAU/LA0001/2013-2014 and UID/NEU/04539/2013), COMPETE-FEDER.

References

- [1] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (5) (2011) 646–674, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [2] R.D. Schreiber, L.J. Old, M.J. Smyth, Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion, *Science* (New York, N.Y.) 331 (6024) (2011) 1565–1570, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1203486>.
- [3] B.B. Aggarwal, R.V. Vijayalekshmi, B. Sung, Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe, *Clin. Cancer Res.* 15 (2) (2009) 425–430, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0149>.
- [4] S.I. Grivennikov, F.R. Greten, M. Karin, Immunity, inflammation, and cancer, *Cell* 140 (6) (2010) 883–899, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>.
- [5] S.I. Grivennikov, M. Karin, Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage, *Ann. Rheum. Dis.* 70 (Suppl. 1) (2011) i104–i108, <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2010.140145>.
- [6] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2015, *CA Cancer J. Clin.* 65 (1) (2015) 5–29, <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21254>.
- [7] R. Kim, M. Emi, K. Tanabe, Cancer immunoeediting from immune surveillance to immune escape, *Immunology* 121 (2007) 1–14, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x>.
- [8] C. Denkert, S. Loibl, A. Noske, M. Roller, B.M. Müller, M. Komor, ... G. von Minckwitz, Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28 (1) (2010) 105–113, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2009.23.7370>.
- [9] C. Baxevanis, S. Perez, Cancer dormancy: a regulatory role for endogenous immunity in establishing and maintaining the tumor dormant state, *Vaccine* 33 (3) (2015) 597–619, <http://dx.doi.org/10.3390/vaccines3030597>.
- [10] S.C. Formenti, S. Demaria, Systemic effects of local radiotherapy, *Lancet Oncol.* 10 (7) (2009) 718–726, [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70082-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70082-8).
- [11] K.E. Pauken, E.J. Wherry, Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer, *Trends Immunol.* 36 (4) (2015) 265–276, <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.02.008>.
- [12] G. Verdeil, S.A. Fuertes Marraco, T. Murray, D.E. Speiser, From T cell “exhaustion” to anti-cancer immunity, *Biochim. Biophys. Acta* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.06.007>.
- [13] N. Rezaei (Ed.), *Cancer Immunology*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2015, <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-44006-3>.
- [14] N. Li, S.I. Grivennikov, M. Karin, The unholy trinity: inflammation, cytokines, and STAT3 shape the cancer microenvironment, *Cancer Cell* 19 (4) (2011) 429–431, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.03.018>.
- [15] M.D. Vesely, M.H. Kershaw, R.D. Schreiber, M.J. Smyth, Natural innate and adaptive immunity to cancer, *Annu. Rev. Immunol.* 29 (2011) 235–271, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>.
- [16] F. Balkwill, Tumour necrosis factor and cancer, *Nat. Rev. Cancer* 9 (5) (2009) 361–371, <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2628>.
- [17] H. Yu, D. Pardoll, R. Jove, STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3, *Nat. Rev. Cancer* 9 (11) (2009) 798–809, <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2734>.
- [18] F. Balkwill, A. Mantovani, Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357 (9255) (2001) 539–545, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04046-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04046-0).
- [19] M. Egeblad, E.S. Nakasone, Z. Werb, Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism, *Dev. Cell* 18 (6) (2010) 884–901, <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.012>.
- [20] S. Ladoire, G. Mignot, S. Dabakuyo, L. Arnould, L. Apetoh, C. R  b  , ... F. Ghiringhelli, In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival, *J. Pathol.* 224 (3) (2011) 389–400, <http://dx.doi.org/10.1002/path.2866>.
- [21] J. Galon, A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pag  s, ... F. Pages, Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome, *Science* (New York, N.Y.) 313 (5795) (2006) 1960–1964, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1129139>.
- [22] F. Pages, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, M. Asslaber, M. Tosolini, G. Bindea, ... J. Galon, In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.* 27 (35) (2009) 5944–5951, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2008.19.6147>.
- [23] M. Camus, M. Tosolini, B. Mlecnik, F. Pages, A. Kirilovsky, A. Berger, ... J. Galon, Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence, *Cancer Res.* 69 (6) (2009) 2685–2693, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2654>.
- [24] G. Bindea, B. Mlecnik, W.-H. Fridman, F. Pag  s, J. Galon, Natural immunity to cancer in humans, *Curr. Opin. Immunol.* 22 (2) (2010) 215–222, <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2010.02.006>.
- [25] S.L. Shiao, L.M. Coussens, The tumor-immune microenvironment and response to radiation therapy, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15 (4) (2010) 411–421, <http://dx.doi.org/10.1007/s10911-010-9194-9>.
- [26] M.J. Pittet, Behavior of immune players in the tumor microenvironment, *Curr. Opin. Oncol.* 21 (1) (2009) 53–59, <http://dx.doi.org/10.1097/CCO.0b013e32831bc38a>.
- [27] H.P. Dong, M.B. Elstrand, A. Holth, I. Silins, A. Berner, C.G. Trop  , ... B. Risberg, NK- and B-cell infiltration correlates with worse outcome in metastatic ovarian carcinoma, *Am. J. Clin. Pathol.* 125 (3) (2006) 451–458.
- [28] S.-C. Wong, A.-L. Puaux, M. Chittezhath, I. Shalova, T.S. Kajiji, X. Wang, ... S.K. Biswas, Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells, *Eur. J. Immunol.* 40 (8) (2010) 2296–2307, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200940288>.
- [29] N.Y. Crowe, J.M. Coquet, S.P. Berzins, K. Kyparissoudis, R. Keating, D.G. Pellicci, ... M.J. Smyth, Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo, *J. Exp. Med.* 202 (9) (2005) 1279–1288, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20050953>.

- [30] X. Cao, Regulatory T cells and immune tolerance to tumors, *Immunol. Res.* 46 (1–3) (2009) 79–93, <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-009-8124-7>.
- [31] D. Mougialakos, C.C. Johansson, E. Trocme, C. All-Ericsson, M.A. Economou, O. Larsson, ... R. Kiessling, Intratumoral forkhead box P3-positive regulatory T cells predict poor survival in cyclooxygenase-2-positive uveal melanoma, *Cancer* 116 (9) (2010) 2224–2233, <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.24999>.
- [32] A. Liston, D.H.D. Gray, Homeostatic control of regulatory T cell diversity, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (3) (2014) 154–165, <http://dx.doi.org/10.1038/nri3605>.
- [33] E. Peranzoni, S. Zilio, I. Marigo, L. Dolcetti, P. Zanovello, S. Mandruzzato, V. Bronte, Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition, *Curr. Opin. Immunol.* 22 (2) (2010) 238–244, <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.021>.
- [34] M.W.L. Teng, J.B. Swann, B. von Scheidt, J. Sharkey, N. Zerafa, N. McLaughlin, ... M.J. Smyth, Multiple antitumor mechanisms downstream of prophylactic regulatory T-cell depletion, *Cancer Res.* 70 (7) (2010) 2665–2674, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1574>.
- [35] K. Soukup, X. Wang, Radiation meets immunotherapy – a perfect match in the era of combination therapy? *Int. J. Radiat. Biol.* 91 (4) (2015) 299–305, <http://dx.doi.org/10.3109/09553002.2014.995383>.
- [36] A. Pedroza-Gonzalez, K. Xu, T.-C. Wu, C. Aspod, S. Tindle, F. Marches, ... A.K. Palucka, Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation, *J. Exp. Med.* 208 (3) (2011) 479–490, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20102131>.
- [37] T. Zenz, Exhausting T cells in CLL, *Blood* 121 (9) (2013) 1485–1486, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-01-475939>.
- [38] M.Y. Balkhi, Q. Ma, S. Ahmad, R.P. Junghans, T cell exhaustion and interleukin 2 downregulation, *Cytokine* 71 (2) (2015) 339–347, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyt.2014.11.024>.
- [39] M.Y. Mapara, M. Sykes, Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22 (6) (2004) 1136–1151, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2004.10.041>.
- [40] S. Cuddapah, A. Barski, K. Zhao, Epigenomics of T cell activation, differentiation, and memory, *Curr. Opin. Immunol.* 22 (3) (2010) 341–347, <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2010.02.007>.
- [41] M. Ahmadzadeh, L.A. Johnson, B. Heemskerk, J.R. Wunderlich, M.E. Dudley, D.E. White, S.A. Rosenberg, Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired, *Blood* 114 (8) (2009) 1537–1544, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-12-195792>.
- [42] Y. Qin, G. Wang, J. Yang, C. Liu, Generation of a monoclonal antibody recognizing mouse PD-1, *Monoclonal Antibodies Immunodiagnosis Immunother.* 33 (5) (2014) 361–364, <http://dx.doi.org/10.1089/mab.2014.0024>.
- [43] K. Sakuishi, S.F. Ngiew, J.M. Sullivan, M.W.L. Teng, V.K. Kuchroo, M.J. Smyth, A.C. Anderson, TIM3(+)FOXP3(+) regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer, *Oncoimmunology* 2 (4) (2013), e23849, <http://dx.doi.org/10.4161/onci.23849>.
- [44] K. Sakuishi, L. Apetoh, J.M. Sullivan, B.R. Blazar, V.K. Kuchroo, A.C. Anderson, Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity, *J. Exp. Med.* 207 (10) (2010) 2187–2194, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20100643>.
- [45] Y. Kong, J. Zhang, D.F. Claxton, W.C. Ehmann, W.B. Rybka, L. Zhu, ... H. Zheng, PD-1(hi)TIM-3(+) T cells associate with and predict leukemia relapse in AML patients post allogeneic stem cell transplantation, *Blood Cancer J.* 5 (2015), e330, <http://dx.doi.org/10.1038/bcj.2015.58>.
- [46] B. Jeremic, Advances in radiation oncology in lung cancer, in: J. Branislav (Ed.), *Radiation Oncology*, Second Ed., 121, Springer, Berlin/Heidelberg, 2005, <http://dx.doi.org/10.1007/b137825>.
- [47] K. Hiraoka, M. Miyamoto, Y. Cho, M. Suzuoki, T. Oshikiri, Y. Nakakubo, ... H. Katoh, Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma, *Br. J. Cancer* 94 (January) (2006) 275–280, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6602934>.
- [48] S.M. Hald, R.M. Bremnes, K. Al-Shibli, S. Al-Saad, S. Andersen, H. Stenvold, ... T. Donnem, CD4/CD8 co-expression shows independent prognostic impact in resected non-small cell lung cancer patients treated with adjuvant radiotherapy, *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 80 (2) (2013) 209–215, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.12.026>.
- [49] A. Derer, L. Deloch, Y. Rubner, R. Fietkau, B. Frey, U.S. Gaipl, Radio-immunotherapy-induced immunogenic cancer cells as basis for induction of systemic anti-tumor immune responses – pre-clinical evidence and ongoing clinical applications, *Front. Immunol.* 6 (2015) 505, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00505>.
- [50] C.A. Perez, A. Fu, H. Onishko, D.E. Hallahan, L. Geng, Radiation Induces an Antitumor Immune Response to Mouse Melanoma, 2010.
- [51] O. Kepp, L. Galluzzi, M. Lipinski, J. Yuan, G. Kroemer, Cell death assays for drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 10 (3) (2011) 221–237, <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3373>.
- [52] L. Zitvogel, O. Kepp, G. Kroemer, Decoding cell death signals in inflammation and immunity, *Cell* 140 (6) (2010) 798–804, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.015>.
- [53] D.R. Green, T. Ferguson, L. Zitvogel, G. Kroemer, Immunogenic and tolerogenic cell death, *Nat. Rev. Immunol.* 9 (5) (2009) 353–363, <http://dx.doi.org/10.1038/nri2545>.
- [54] T. Panaretakis, N. Joza, N. Modjtahedi, A. Tesniere, I. Vitale, M. Durchschlag, ... G. Kroemer, The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death, *Cell Death Differ.* 15 (9) (2008) 1499–1509, <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2008.67>.
- [55] G. Multhoff, C. Botzler, L. Jennen, J. Schmidt, J. Ellwart, R. Issels, Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells, *J. Immunol.* 158 (9) (1997) 4341–4350 (Baltimore, Md. : 1950).
- [56] F. Chalmin, S. Ladoire, G. Mignot, J. Vincent, M. Bruchard, J.-P. Remy-Martin, ... F. Ghiringhelli, Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells, *J. Clin. Invest.* 120 (2) (2010) 457–471, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI40483>.
- [57] A. Murshid, J. Gong, S.K. Calderwood, Heat shock protein 90 mediates efficient antigen cross presentation through the scavenger receptor expressed by endothelial cells-I, *J. Immunol.* 185 (5) (2010) 2903–2917, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0903635>.
- [58] L. Elsner, P.F. Flügge, J. Lozano, V. Muppala, B. Eiz-Vesper, S.Y. Demiroglu, ... R. Dressel, The endogenous danger signals HSP70 and MICA cooperate in the activation of cytotoxic effector functions of NK cells, *J. Cell. Mol. Med.* 14 (4) (2010) 992–1002, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00677.x>.
- [59] Y. Ma, L. Aymeric, C. Locher, G. Kroemer, L. Zitvogel, The dendritic cell-tumor cross-talk in cancer, *Curr. Opin. Immunol.* 23 (1) (2011) 146–152, <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2010.09.008>.
- [60] M. Durante, N. Reppingen, K.D. Held, Immunologically augmented cancer treatment using modern radiotherapy, 19 *Trends in Molecular Medicine*, 565–582, Elsevier Ltd., 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2013.05.007>.

The importance of radiotherapy on diffuse large B cell lymphoma treatment: a current review

Fernando Mendes^{1,2,3} · Cátia Domingues^{3,4} · Ricardo Teixo¹ ·
Ana Margarida Abrantes^{1,3} · Ana Cristina Gonçalves^{3,4} · Inês Nobre-Gois⁵ ·
Miguel Jacobetty⁵ · Ana Bela Sarmiento^{3,4} · Maria Filomena Botelho^{1,3} ·
Manuel Santos Rosa⁶

Published online: 13 August 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Diffuse large B cell lymphoma is recognized as a heterogeneous group of hematological malignancies; two main subtypes germinal center B and activated B cells are well defined although 15 % of patients remain with unclassifiable disease. R-CHOP treatment has proven to provide very effective results in limited or advanced stage of the disease. However, treatment solely involving R-CHOP submits the patient to possible chemotherapy-induced toxicities, which may be avoided with the use of radiotherapy. Patients with early stage localized disease or who are particularly unresponsive to chemotherapy may be more suitable for mixed modality treatment with R-CHOP and consolidative radiotherapy. Although radiotherapy is being slowly phased out by other treatment strategies including chemotherapy and therapeutic drugs, it is still a highly important method of treatment. The different forms of radiotherapy can be used alongside these “new-age”

treatment strategies to further improve prognostic outcomes and overall survival rates. The establishment of radiotherapy as a treatment strategy provides a highly beneficial prognostic advantage in early stage, localized disease.

Keywords Diffuse large B cell lymphoma · Radiotherapy · Consolidation radiotherapy · R-CHOP

1 Diffuse large B cell lymphoma

1.1 Epidemiology

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is recognized as a heterogeneous group of hematological malignancies, and collectively forms the most common type of aggressive, non-Hodgkin lymphoma [1]. Currently, DLBCL constitutes approximately 30 to 58 % of lymphoma series and 25 to 40 % of all non-Hodgkin lymphoma diagnoses which has been steadily increasing over recent decades in about 3 to 4 % per year [1–5]. The crude incidence of DLBCL in the European Union is about three to four cases by 100,000 births per year. In USA, more than 20,000 patients are diagnosed with DLBCL each year. The incidence increases with age from 0.3/100,000/year (35–39 years) to 26.6/100,000/year (80–84 years) [6, 7].

At diagnosis, 25 to 50 % of patients with DLBCL are found to have early stage disease meaning that approximately 50 % of such patients are diagnosed with stage I/II of the disease [2–4, 8].

As with many lymphomas, radiotherapy (RT) was historically the cornerstone of treatment for localized disease, achieving high complete response (CR) rates and long-term freedom from relapse in 40 to 45 % of patients [9–12].

✉ Fernando Mendes
fjmendes@estescoimbra.pt

¹ Biophysics Unit-IBILI.CNC, Faculty of Medicine of University of Coimbra, Azinhaga Santa Comba, Celas 3000-548 Coimbra, Portugal

² ESTESC-Coimbra Health School, Department Biomedical Laboratory Sciences, Polytechnic Institute of Coimbra, Coimbra, Portugal

³ Center of Investigation in Environment, Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Faculty of Medicine of University of Coimbra, Coimbra, Portugal

⁴ Applied Molecular Biology and Clinical University of Hematology, Faculty of Medicine of University of Coimbra, Coimbra, Portugal

⁵ Radiation Oncology Department, Hospital and University Center of Coimbra, Coimbra, Portugal

⁶ Immunology Institute, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

1.2 Classification

1.2.1 Clinical classification

The 2008 version of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid malignancies acknowledges the heterogeneity of DLBCL by recognizing a broad category termed DLBCL, not otherwise specified, as well as a variety of DLBCL subtypes and “other lymphomas of large B cells” that have been identified due to unique clinical and pathologic features [2, 8, 13].

Despite this categorization, with the exception of primary central nervous system (CNS) lymphoma, the majority of patients continue to be treated in a uniform manner. An ability to measure the biological differences will be crucial to enable individualized therapy in patients who frequently present with morphologically indistinguishable tumors [14].

1.2.2 Cell origin classification

Within the largest category, DLBCL, not otherwise specified, gene expression profiling (GEP) studies have identified two distinct molecular subtypes, termed germinal center B cell (GCB) and activated B cell (ABC), 15 % of patients remaining unclassifiable, which are believed to represent lymphomas arising from different stages of lymphoid differentiation [15, 16].

This molecular distinction has prognostic implications for patients that R-CHOP therapy, as the ABC subtype exhibiting 3 years of progression-free survival (PFS) of 40 vs 75 % ($p < 0.001$), compared with GCB subtype [10, 11, 17, 18].

Even more relevant is that molecular subtypes of lymphomas are driven by different intracellular oncogenic signaling pathways that could be differentially exploited and ultimately targeted for therapeutic benefit [19–23].

Germinal center B cell origin GCB DLBCLs are believed to derive from lymphoid cells residing in the germinal center and therefore express genes normally detected in germinal center B cells, such as *neprilysin (CD10)*, *LIM domain only 2 (LMO2)*, and the transcriptional *B cell lymphoma 6 (BCL6)* protein repressor [15, 16]. Approximately 30 to 40 % of GCB DLBCLs present a t(14,18) translocation, 30 % have *c-REL* amplification, 20 % have mutations of the *histone-lysine N-methyltransferase (EZH2)*, and 10 % present a deletion of tumor suppressor *phosphatase and tensin homolog (PTEN)* gene, all of which are virtually never seen in ABC origin [14]. *EZH2* gene is a master regulator of the GCB phenotype and cooperates with *BCL6* to mediate lymphomagenesis in GCB DLBCL subtype [24, 25]. A recurring somatic point mutation within exon 15 of the *EZH2* gene has been identified and results in the replacement of a single tyrosine (Tyr461) within the *EZH2* protein, leading to gain of function and the

increased methylation of histone 3, which may promote lymphomagenesis by transcriptionally silencing key regulator genes [24, 26, 27]. On this way, both *BCL6* and *EZH2* genes may represent important selective targets for GCB DLBCL treatment; potential agents directed to them have been in study since 2010 [28, 29].

Activation of the phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway is fundamental for cellular growth and metabolism and has been shown to be activated by a variety of mechanisms in a spectrum of B cell lymphomas, including GCB DLBCL [30].

Although deletion of *PTEN* gene, a tumor suppressor gene affecting this pathway, has been noted in 10 % of GCB DLBCL, the loss of *PTEN* expression by immunohistochemistry (IHC) was seen in 55 % of GCB DLBCL compared with only 14 % of non-GCB cases. The resultant constitutive activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway and the lacking *PTEN* in GCB DLBCL may be amenable to therapy with a variety of inhibitors currently in development [30].

Another mechanism related to GCB and ABC DLBCL development is the overexpression of the antiapoptotic protein B cell lymphoma-2 (*BCL2*). However, in GCB DLBCL type, the overexpression of *BCL2* is related to the presence of the t(14,18) translocation, whereas in ABC DLBCL, this overexpression is promoted by other mechanisms, such as transcriptional upregulation and gene amplification [31]. Moreover, in patients following R-CHOP treatment [10, 11, 17], the overexpression of *BCL2* appears to pertain negative prognostic impact in GCB DLBCL whereas in ABC DLBCL, rituximab mediates *BCL2* downregulation [32]. On this way, the use of *BCL2* inhibitors appears to be a promising therapy for DLBCL, namely in GCB subtype [33].

Activated B cell origin ABC DLBCLs are believed to derive from B cells at a plasmablastic stage, just prior to germinal center exit, and therefore express genes that are frequently expressed in mature plasma cells [15, 16].

The pathogenetic hallmark of ABC DLBCL is the constitutive activation of the NF- κ B signaling pathway, which promotes cell survival, proliferation, and inhibition of apoptosis [19]. This is largely due to constitutive activation of the CBM signaling complex (formed by caspase recruitment domain-containing protein 11 [CARD11], B cell lymphoma [BCL-10], and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 [MALT1]), which in normal lymphocytes is only transiently active following antigen stimulation [14].

In ABC DLBCL, the CBM complex can be activated by different genetic aberrations; 10 % harbor activating mutations of *CARD11* gene, whereas in the remaining cases, chronic active B cell receptor signaling engages the CBM pathway [19, 34]. Chronic active B cell receptor signaling is mediated through the B cell receptor (which in 20 % of cases harbors

mutations in CD79A or CD79B) and downstream kinases, which include spleen tyrosine kinase (SYK), PI3K, Bruton tyrosine kinase (BTK), and protein kinase C β (PKC β) [19]. Moreover, recurring mutations in *myeloid differentiation primary response 88* (*MYD88*) gene have been observed in 30 % of ABC DLBCL, resulting in upregulation of both the NF- κ B and Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathways. Finally, loss of function of *tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3* (*TNFAIP3*) gene occurs through both mutation and deletion, resulting in loss of inhibition of NF- κ B signaling [35, 36].

Regarding prognostic and predictive importance of cell of origin, a reliable method of assessing molecular subtype is required. GEP is not routinely available for patient care due to the lack of a standardized commercially available test and the requirement for fresh-frozen tissue specimens [37]. Although, several IHC-based algorithms have been developed as a practical tool for assigning subtypes of DLBCL [38]. The Hans algorithm has been the most commonly used and designates patients as GCB versus non-GCB based on the presence of three IHC markers (CD10, BCL6, and multiple myeloma oncogene 1 [MUM1]) [39]. In a comparison of several IHC algorithms, the Tally algorithm, based on forkhead box protein P1 (FOXP1), germinal center B cell-expressed transcript-1 (GCET1), CD10, MUM1, and LMO2, was demonstrated to be the most robust [38]. Unfortunately, these IHC algorithms remain an imperfect substitution for GEP, partly due to IHC inherent over simplification and its poor reproducibility [40].

2 Diagnosis

2.1 Diagnostic methods and staging

DLBCL diagnosis should be made on the basis of a surgical specimen, namely excisional lymph node or extranodal tissue biopsy providing enough material for formalin-fixed samples. However, in the rare patients requiring emergency treatment, core biopsies may be appropriate as the only diagnostic test [2, 8, 13]. Nevertheless, according to the European Society for Medical Oncology, minimal immunohistochemistry using CD45, CD20, and CD3 monoclonal antibodies is mandatory [6].

The collection of fresh-frozen material for molecular characterization is recommended although GEP remains investigational. To ensure adequate quality, processing by an experienced pathology institute has to be guaranteed [6] and the histological report should give the diagnosis according to the current WHO classification [2, 8, 13]. The distinction between germinal center-like subtype and activated B cell-like subtype can be studied by GEP and suggested by HC. However, this analysis does not influence treatment choices [41]. Moreover, complete blood count, routine blood chemistry including

lactate dehydrogenase (LDH) and uric acid as well as a screening test for human immunodeficiency virus and hepatitis B and C are required as well as protein electrophoresis [42].

Patients eligible to curative therapy should have at least a computed tomography (CT) scan of the chest and abdomen, as well as a bone marrow aspirate and biopsy. A diagnostic spinal tap should be considered in high-risk patients. [^{18}F]-deoxyglucose positron emission tomography (PET) scanning is strongly recommended to better delineate the extension of the disease and to the evaluation of treatment response according to the revised criteria [36, 37]. Performance status (PS) and cardiac function (left ventricular ejection fraction) should be assessed before treatment.

The staging is established according to the modification of the Ann Arbor descriptive terminology for anatomic distribution of disease extent. Ann Arbor system, as shown on Fig. 1, with the Cotswold modifications (Table 1), and including the updated criteria from the 11th International Conference on Malignant Lymphoma in Lugano, Switzerland, in June 2011 [43–45]. For prognostic purposes, international prognostic index (IPI) and age-adjusted IPI (aa-IPI) should be calculated [46].

2.2 Clinical prognosis factor

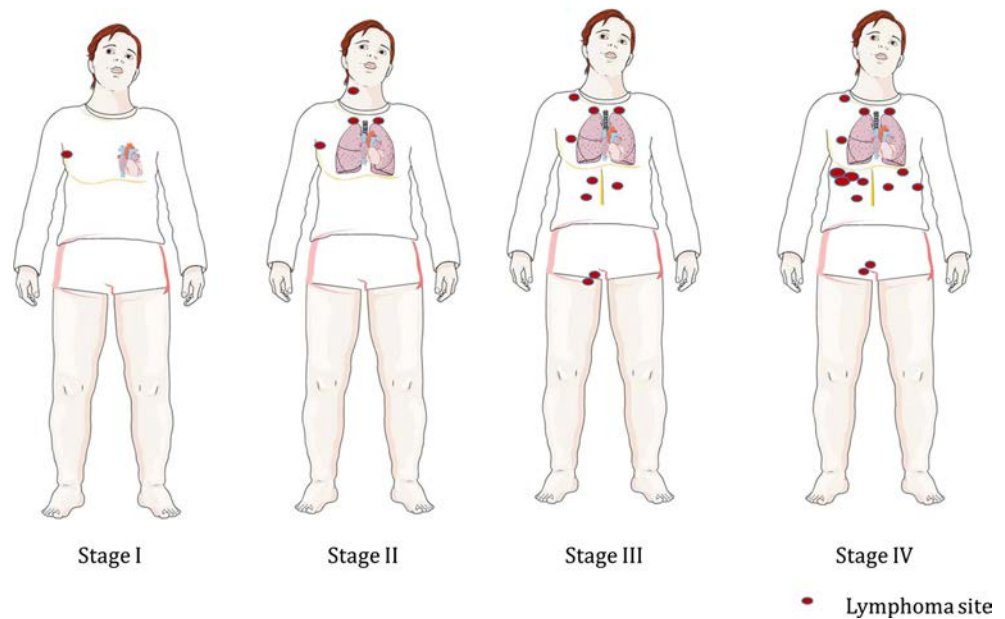
The IPI, developed prior to the availability of rituximab, is the primary clinical tool used to predict outcome in patients with DLBCL [46]. Using five negative prognostic features present at the time of diagnosis, such as age 60 years; stage III/IV of the disease; elevated serum LDH level; Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) PS equal or higher than 2 or superior than 1 with extranodal site of disease. The IPI segregates patients into four outcome groups with 5-year overall survival (OS) ranging from 26 to 73 %. The IPI has been reevaluated in patients treated with rituximab-based therapy and has been shown to retain its prognostic utility [47, 48].

However, the IPI has minimal capacity to identify high-risk patients, because all prognostic categories have a 50 % chance of cure when treated with R-CHOP.

Recently, an enhanced IPI using data from the National Comprehensive Cancer Network (NCCN)-IPI and validated within a population of patients treated in British Columbia (Canada) has been proposed [49]. The NCCN-IPI incorporates the same five variables, although further refines the categorization of age, normalized LDH, and identifies the presence of extranodal involvement in the bone marrow, CNS, liver and gastrointestinal tract, or lung as a negative parameter rather than the number of extranodal sites.

Compared with the IPI, the NCCN-IPI was able to better discriminate a high-risk group with 5-year OS of 33 %, although it represented only 8 to 14 % of the patients. Additional clinical factors have been identified that may also contribute to a poorer outcome following rituximab-based therapy. These

Fig. 1 Diffuse large B cell lymphoma Ann Arbor staging



include maximum tumor diameter of 10 cm, male gender, bone marrow involvement with large cell lymphoma but not discordant small cells, elevated serum free light chains, low absolute lymphocyte and monocyte count, and vitamin D deficiency [49–57]. Increased body mass index has been reported to be a favorable prognostic factor, but this has not been confirmed in all studies [54, 58].

Although clinical factors remain surrogates for the underlying biological differences between patients, to date the IPI has not been made redundant by any biological marker. Thus, incorporation of additional clinical factors within future prognostic indices may allow for wider differentiation of outcome [14].

3 Treatment

3.1 Chemotherapy

Over time, DLBCL treatment evolved to incorporate CHOP with rituximab (R-CHOP), both of which led to lower relapse rates and improved survival [59, 60]. Despite of this, radiation remains an integral part of the treatment of localized disease, having been shown to decrease the risk of relapse after chemotherapy, and it is currently designated as a first category treatment option by the NCCN [59–62].

Now, 80 to 90 % of patients with early stage DLBCL remain disease-free after treatment with R-CHOP and consolidation RT [59, 60]. The other half of patients diagnosed with DLBCL with advanced disease managed are primarily treated with systemic therapy. Thereby, stage in DLBCL is an important prognostic factor [46]. Patients with advanced disease

have inferior clinical outcomes compared with those with localized presentations.

3.1.1 Chemotherapy in limited stage

Almost one quarter of patients with DLBCL are affected by localized disease that can be encompassed within a radiation field and may be eligible to a combined modality treatment approach. These patients typically present low-risk clinical features and have a more favorable prognosis, although it remains unclear whether this represents a true biological difference or simply a reflection of lesser disease burden.

The most influential trial was performed by the Southwest Oncology Group (SWOG), in which patients with stage I and II intermediate-high grade lymphoma were treated with eight cycles of CHOP or three cycles of CHOP and involved field radiation therapy (IFRT) [63]. At the time of initial publication, the combined modality approach was associated with a higher PFS and OS and had a better toxicity profile. As a consequence, three cycles of CHOP and IFRT were widely adopted as the standard of care for limited stage DLBCL [14].

However, in an updated analysis, the improvement seen with abbreviated chemotherapy and IFRT disappeared at 7 to 9 years of follow-up due to a higher number of late relapses and deaths from lymphoma in that cohort, the majority of which occurred outside of the radiation field [14].

The use of IFRT may be preferable in patients with poor tolerance to chemotherapy or when toxicity of IFRT may be minimal due to location of disease, as this would allow the use of chemotherapy over shorter periods. Additionally, the selective use of IFRT in patients less responsive to chemotherapy may be considered.

Table 1 Comparison Ann Arbor classification including modifications proposed by Cotswold [44, 45] and Lugano [43]

Stage	For all stages	For stages I to III	Lugano stage	Extent of lymphoma
I	Involvement of a single lymph node region or lymphoid structure (e.g., spleen, thymus, Waldeyer's ring) A—No symptoms B—Fever (38 °C), drenching sweats, weight loss (10 % body weight over 6 months)	E - Involvement of a single, extranodal site contiguous or proximal to known nodal site	I	Mucosa, submucosa, muscularis propria, subserosa, serosa penetration
II	Involvement of two or more lymph node regions on the same side of the diaphragm		II1	Regional lymph nodes
			II2	Intra-abdominal distant lymph nodes
III	Involvement of lymph regions or structures on both sides of the diaphragm		III E	Invasion of neighboring organ
IV	Involvement of extranodal site(s) beyond that designated		III E	Extra-abdominal lymph nodes
			IV E	Diffuse/disseminated spread
			IV E	Bone marrow involvement

Cotswold modifications

Massive mediastinal disease has been defined by the Cotswold meeting as a thoracic ratio of maximum transverse mass diameter greater than or equal to 33 % of the internal transverse thoracic diameter measured at the T5/6 intervertebral disc level on chest radiography. The number of anatomic regions involved should be indicated by a subscript (e.g., II₃). Stage III may be subdivided into the following: III₁, with or without plenic, hilar, celiac, or portal nodes; III₂, with para-aortic, iliac, and mesenteric nodes. Staging should be identified as clinical stage or pathologic stage. A new category of response to therapy, unconfirmed/uncertain complete remission can be introduced because of the persistent radiologic abnormalities of uncertain significance

Adapted from Armitage et al. 2014, Cheson et al. 2014, and Hwang et al. 2014

A PET-guided treatment algorithm was adopted at the British Columbia Cancer Agency in 2005, whereby patients who remained PET positive after three cycles of R-CHOP completed therapy with localized radiation, and patients who were PET negative received one final cycle of chemotherapy. Preliminary review of this experience suggests that chemosensitive patients with a negative interim PET scan can be effectively treated with abbreviated systemic therapy (four cycles of R-CHOP) and avoid the use of radiation [64].

In patients who do require radiation, a retrospective review suggests that the use of involved nodal radiation therapy (INRT) appears equivalent to IFRT and may reduce the risk of long-term complications [65, 66].

In the future, a personalized treatment approach that relies more on biological characteristics rather than stage of disease will likely be used [14].

3.1.2 Chemotherapy in advanced stage

Approximately 75 % of patients with DLBCL present advanced stage disease (Table 1), commonly defined as Ann Arbor stages III and IV or stages I and II with associated B symptoms or bulky disease (10 cm mass) [67, 68].

The CHOP chemotherapy regimen has been the mainstay of therapy, because more intensive combinations failed to provide additional benefit for patients.

The addition of the anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) to this chemotherapy dramatically improved outcomes, resulting in a 16 % absolute improvement in 10-year OS in the initial trial in elderly patients 60 years old [67, 68]. Additional trials further demonstrated the benefit of rituximab, establishing R-CHOP as the standard treatment option. The rituximab with CHOP over age 60 (RICOVER-60) trial also confirmed that six cycles of therapy was sufficient for patients with advanced stage disease [69].

It is calculated that approximately 60 % of patients will be cured, with more favorable outcomes seen in patients with limited stage disease. Patients who remain event-free at 24 months have recently been shown to have an OS comparable to the general population, further highlighting the importance of optimizing frontline therapy [70].

Various alternative regimens have been explored in an attempt to improve on R-CHOP, with only one study demonstrating an OS benefit. A dose-intensive regimen of rituximab, doxorubicin, cyclophosphamide, vindesine, bleomycin, and prednisone (R-ACVBP) was associated with a better OS compared with R-CHOP (3-year OS, 92 vs 84 %, $p < 0.0075$) in a randomized phase 3 trial in

a select population of patients, with 60 years of age and IPI risk factor of 1 [71].

Despite this demonstrated benefit, R-ACVBP has not become highly used, partly because its value in a general population of patients with DLBCL remains unclear and due to concern for both acute and delayed toxicity [71, 72].

R-CHOP-14 (R-CHOP administered every 2 weeks) demonstrated no additional benefit but a higher frequency of toxicity [73, 74]. A retrospective population-based study suggested a survival benefit with the addition of etoposide to R-CHOP (R-CHOEP) for young high-risk patients. However, this was not observed in a subgroup analysis of a phase 3 trial in young good-risk patients [75, 76].

The infusional regimen of dose-adjusted etoposide, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone, and rituximab (DA-EPOCH-R) has yielded promising results in a phase 2 trial in DLBCL, especially within the GCB subtype. However, confirmation of its merit must await results of a completed phase 3 trial comparing it with R-CHOP [77, 78].

3.2 Radiotherapy

In the 1980s, RT was indicated as a possible unique treatment option to DLBCL [9, 10, 12]. However, several studies have demonstrated that RT presents better results in patients in initial stage of the disease [61, 63, 79–81]. In both early and advanced DLBCL treated with chemotherapy alone, the most common sites of treatment failure are those in which disease was initially involved, particularly in patients with bulky lesions [80, 82, 83].

Consolidation RT after systemic chemotherapy has been shown to decrease the risk of relapse at treated sites and is often feasible if the disease is not too widely disseminated. There are at least five institutional experiences that support improved outcomes with consolidation RT for advanced-stage DLBCL. Furthermore, post hoc analysis from the RICOVER-60 trial and early results from the Unfavorable Low-Risk Patients Treated with Densification of R-Chemo Regimens (UNFOLDER) randomized trial further support the role of consolidation RT [60, 82–87].

3.2.1 Radiotherapy in early stage

RT is a highly effective treatment modality for DLBCL and is associated with excellent rates of sustained, infield control. Historically, early stage DLBCL was treated with extended field RT alone. Although very high response rates were achieved within the RT field, long-term survival was compromised by high rates of out-of-field recurrences [1].

In modern clinical practice, chemotherapy coupled with molecular-based targeted therapy have now evolved as the backbone of treatment for optimal systemic disease control

and RT is usually used to consolidate these systemic therapies, with the aim to improve local control.

Thus, in patients with early stage DLBCL, the role of adjuvant RT is to spare patients from the toxicities of full-course chemotherapy or to consolidate systemic therapy to further improve local control [1].

International guidelines for the recommended management of limited stage DLBCL are inconsistent, reflecting the uncertainties regarding the optimal treatment strategy for this disease [42].

Currently, the two most common treatment approaches are abbreviated CHOP chemotherapy with rituximab followed by consolidation RT or extended course CHOP chemotherapy with rituximab (with or without consolidation RT). It is generally accepted that both treatment strategies are equivalent in terms of long-term survival, and therefore, the choice of therapy is usually influenced by physician preferences and the comparative toxicity profiles [42, 62, 76]. Thus, limiting treatment-induced morbidity is an important course that has been associated with higher rates of cardiac toxicity, myelosuppression, serious infection, myelodysplastic syndrome, and acute myelogenous leukemia [63, 72, 88].

The risks of these chemotherapy-induced side effects are reduced by the use of abbreviated chemotherapy. However, this is at the cost of alternative toxicity risks associated with the addition of consolidation RT to the treatment package.

Radiation-induced adverse effects are site dependent, and the most serious is the small risk of RT-induced second malignancy in long-term survivors [3, 80, 88].

Consolidation radiotherapy improves local control and survival following systemic therapy alone in patients with DLBCL. The most common pattern of initial failure is that of local recurrence, with local failures compromising 41 to 63 % of relapses [3, 80, 88].

3.2.2 Radiation doses

Radiation doses used for patients with a variety of lymphoma histologies have been reduced over the last decade. A recent randomized study from the UK demonstrated no difference between RT at 30 vs 45 Gy in patients with DLBCL [89].

For stage I/II of the disease, a dose of 30 Gy is currently considered standard therapy in the setting of a negative PET scan post-chemotherapy [90].

For advanced DLBCL treatment, it is reasonable to consider consolidation RT in lower doses than those used in localized disease. These patients will not be cured if systemic therapies are not effectively killing widespread subclinical disease.

Low-dose consolidation RT may be sufficient to control clinically evident disease in the setting of a CR following chemotherapy. Such patients are also typically treated with more cycles of chemotherapy and thus presumably have a lower burden of residual disease. Furthermore, treatment

volumes may be larger in this patient population, and reducing acute and long-term toxicity is important [90].

According to Dorth J. A. et al., current approach is to use doses of 18 to 24 Gy in the setting of a CR to chemotherapy. Low doses such as these appear to be equally effective compared with larger doses and are most likely associated with lower risks of acute and late toxicity. With such doses, local control observed in their experience has been 94 %, consistent with series in which doses of 30 to 40 Gy have been applied [60, 85–87].

Treatment volumes include all sites of original involvement when clinically feasible. Higher doses are warranted in the setting of a positive post-chemotherapy PET scan. When treatment consists in chemotherapy alone, lack of a CR as determined by PET is associated with a substantial risk of relapse. Even when a combined modality therapy is applied, a post-chemotherapy PET is associated with inferior outcomes [91–94]. In a study from Duke University, 4-year rates of local control were 97 vs 81 % ($p < 0.01$) for negative and positive post-chemotherapy PET scans, respectively. The corresponding median RT doses were 30 and 36 Gy, respectively. In the setting of a partial response with positive post-chemotherapy PET scan, doses of 36 to 40 Gy are generally warranted [87].

3.2.3 Radiation areas

As defined in the recently published guidelines from the International Lymphoma Radiation Oncology Group, in all scenarios, adherence to involved site radiotherapy is recommended. In general, this involves delineating the pre-chemotherapy tumor volumes, excluding organs that were clearly uninvolved but which were displaced by the tumor. A planning volume is generated by adding an appropriate margin, accounting for patient setup variation and organ motion [90].

Several random studies have been performed on continuous decrease in RT doses, as well as reduced fields, showing that IFRT, where only nodal region is targeted by irradiation, is so efficient as EFRT, with similar global survival rates [95–97]. New advances beyond the IFRT concept, such as involved site radiotherapy (ISRT), and now INRT, where only involved nodes are irradiated were proposed by the European Organization for Research and Treatment of Cancer/*Groupe d'étude des Lymphoma de l'adulte* (EORTC/GELA). Promising results arises from a retrospective series showing an equivalent progression for survival and global salvage for INRT when compared with IFRT. According to John Boyle et al., current treatment approaches strongly rely on systemic chemotherapy and immunotherapy. However, local recurrence remains a significant cause of treatment failure. RT represents an effective local therapy for DLBCL, and its incorporation into the treatment of advanced DLBCL needs to be

considered. A growing body of retrospective and prospective data demonstrates the ability of RT to prevent local recurrences in patients with DLBCL, thereby improving both PFS and OS [90].

3.2.4 Consolidation radiotherapy and PET scan

In advanced stage patients, consolidative RT following completion of chemotherapy has been frequently used in an attempt to eradicate potential residual disease from high-risk sites, such as areas of initial bulk or residual masses on CT scan. Although historical comparative trials suggested a possible benefit, recent improvement in systemic therapy may have diminished its role [98–100]. To date, there have been no randomized trials evaluating the role of consolidative RT in DLBCL in the rituximab era. Several retrospective analyses have suggested a benefit for RT following R-CHOP, with improved local control and possible overall outcome [60, 85, 86].

In a recent comparison of patients sequentially treated on the RICOVER-60 trial, the addition of consolidative RT to sites of initial bulk appeared to improve event-free survival (EFS), with a trend to improved OS [101]. Importantly, restaging 18-fluorodeoxyglucose PET scanning was not routinely performed in these studies.

Based on its higher sensitivity when compared with CT imaging, PET scanning (or integrated PET/CT, which is now most commonly used) is recommended for routine staging and response assessment of DLBCL [44, 102–106]. The introduction of PET has resulted in a more accurate assessment of response and can distinguish persistent disease from residual scar tissue [107].

In 2005, the British Columbia Cancer Agency adopted a PET-guided treatment algorithm whereby responding patients with residual masses that remained PET positive following R-CHOP received consolidative radiation when feasible, whereas patients with a negative PET scan were observed. Patients with PET-positive sites amenable to radiation had a favorable outcome comparable to patients who were PET negative, suggesting a possible benefit of the selective use of consolidative RT and demonstrating that the majority of patients who were PET negative could be spared unnecessary radiation [14].

Ongoing randomized studies will further assess the feasibility of a PET-guided approach for patients with advanced stage DLBCL in an attempt to avoid the indiscriminate use of radiation and minimize late toxicities. [14]. Consolidation RT has been shown in patients with early stage DLBCL to have a benefit on local control and PFS rates compared to chemotherapy alone [61, 63, 88, 108].

Despite this, the role of RT in the treatment of limited-stage DLBCL has been the subject of ongoing contentious debate.

There remains some longstanding disagreement between experts as to the relationship between local control and OS in patients with early stage DLBCL. However, published literature supports that the improvement in local control and PFS results in the improvement of OS [109].

Advocates for consolidation RT argue that the improved local control obtained from the addition of RT is likely to be associated with improved disease-free survival (DFS), PFS and OS. The ECOG 1484 study was a prospective randomized study performed in the pre-rituximab and pre-PET era [61]. Unfavorable prognostic features were common in this group of patients: 68 % had stage II DLBCL, 31 % had bulky disease, and 47 % had extranodal disease. All patients received eight cycles of CHOP chemotherapy: Those who achieved a CR were then randomized to 30 Gy of consolidation RT or no RT, and all patients who achieved a partial response were to receive 40 Gy of consolidation RT. The results, at primary endpoint of DFS, of the randomization revealed a significant benefit at 6 years in favor of consolidation RT, 69 vs 53 % ($p=0.04$) [61]. In the as-treated population, the proportion of relapses occurring locally in the sites of pre-chemotherapy involvement was 18 % in the group of patients treated with consolidation RT, compared with 48 % of relapses in the group that did not receive RT ($p=0.06$). Consolidation RT as a chemotherapy-sparing agent following abbreviated systemic therapy, the role of consolidation RT is to spare patients from the toxicity of additional cycles of systemic therapy without compromising disease control or OS rates [63, 110]. This chemotherapy-sparing approach to treatment has been shown to be of particular benefit in patients within more favorable prognostic risk groups, with scores on the stage-modified IPI of 0–2. In these favorable prognostic groups, patients benefit from high cure rates and lower risks of chemotherapy-induced morbidities, thus improving the therapeutic ratio [63, 111].

The landmark SWOG 8736 study randomized 401 patients to an abbreviated course of chemotherapy (comprised of three cycles of CHOP chemotherapy) plus consolidation RT versus extended course chemotherapy alone (comprised of eight cycles of CHOP chemotherapy) [63]. All patients were stage I or non-bulky stage II, 50 % were 60 years of age or over, and 37 % had extranodal disease [14].

At 5 years, impressive improvements in PFS, OS, and toxicity rates were observed in favor of abbreviated chemotherapy plus consolidation RT: PFS was 77 vs 64 % (hazard ratio, 1.5, $p=0.03$), and OS was 82 vs 72 % (hazard ratio, 1.7, $p=0.02$) [63]. With longer follow-up, the PFS and OS advantages favoring abbreviated chemotherapy and consolidation RT were seen out to 7 and 9 years, respectively [14]. These results highlight the chemotherapy-sparing benefits of consolidation RT.

3.3 Special conditions for treatment choice

3.3.1 Patients with more than 80 years

A comprehensive geriatric assessment is recommended to help determine choice of treatment in these patients. R-CHOP treatment could usually be used until 80 years of age in healthy patients. The combination of rituximab with attenuated chemotherapy, as R-miniCHOP, could induce complete remission and long survival in healthy patients older than 80 years [III, B] [112]. The doxorubicin substitution with etoposide or liposomal doxorubicin or even its omission can be considered from the beginning or after a few cycles in patients with cardiac dysfunction [6].

3.3.2 Central nervous system prophylaxis

Patients with high-intermediate and high-risk IPI, especially those with more than one extranodal site or elevated LDH, are at higher risk of CNS relapse [113]. CNS prophylaxis should be recommended in this population, but intrathecal injections of methotrexate are probably not an optimal method. Intravenous high-dose methotrexate associated with efficient disease control could be an interesting alternative [114, 115]. Whether some specific involvement sites as paranasal sinus, upper neck, or bone marrow should receive prophylaxis remains to be established. Treatment of primary DLBCL of the CNS must contain high-dose methotrexate. Addition of high-dose cytarabine seems to improve complete remission rate and outcome [116]. Irradiation of the CNS is usually administered as consolidation treatment. Primary DLBCL of the testis is characterized by an increased risk of extranodal, CNS, and contralateral testis recurrence with poor outcome [116]. Concerning the testicular lymphoma must receive CNS prophylaxis also [6, 117].

4 Treatment response

4.1 Assessment

Abnormal radiological tests at baseline should be repeated after three to four cycles and after the last cycle of treatment. Bone marrow aspirate and biopsy should be only repeated at the end of treatment if initially involved [106].

PET is highly recommended for the post-treatment assessment to define complete remission according to the revised criteria of response [106]. Treatment response will be assessed by FDG-PET, by using an evaluation based in a five-point scale, known as Deauville five-point scale (Table 2), although this scale is not often used in clinical practice [44, 118, 119].

In case of therapeutic consequences, a histological confirmation of PET positivity at this time is strongly

Table 2 Deauville criteria

Score	
1	No uptake
2	Slight uptake with/equal to mediastinum blood pool
3	Uptake above mediastinal, but below or equal to uptake in the liver
4	Uptake moderately more than liver, at any site
5	Markedly increased uptake or any new lesion (on response evaluation)
Some author's considerer	
X	New areas of uptake unlikely to be related to lymphoma

Baseline and I-PET scans are scored according to uptake in sites initially involved by lymphoma; visual interpretation of the PET-CT scan uses a five-point scale

Adapted from Moskowitz 2012

recommended. Early PET, performed after one to four cycles of treatment, have been shown to be predictive of clinical outcome in some studies, but others did not find any correlations and its results should not lead to treatment change outside of a clinical trial [6]. History and physical examination should be carried out every 3 months for 1 year, every 6 months for 2 more years, and then once a year with attention to development of secondary tumors or other long-term side effects of chemotherapy. Blood count and LDH at 3, 6, 12, and 24 months should be taken, then only as needed for evaluation of suspicious symptoms or clinical findings in those patients suitable for further therapy. Minimal adequate radiological examinations at 6, 12, and 24 months after end of treatment by CT scan are usual practice [6, 117, 120].

4.2 Relapsed-refractory DLBCL

Overall, more than 30 % of all DLBCL will ultimately relapse. The incidence in the EU is therefore estimated to be around 1/100,000/year [6]. The diagnosis of relapsed-refractory DLBCL should be performed by histological verification which should be obtained whenever possible and is mandatory in relapses occurred more than 12 months after the initial diagnosis, especially in order to ensure CD20 positivity. Image-guided core biopsy may be appropriate in this context [6]. Patients still amenable to curative therapy should have exactly the same examinations as at first diagnosis. The following recommendations apply to patients with adequate, rituximab-associated anthracycline-containing first-line therapy [6].

In patients with adequate PS (no major organ dysfunction, age <65–70 years), salvage regimen with association of

rituximab and chemotherapy followed in responsive patients by high-dose treatment with stem cell support is recommended [84, 121]. Salvage regimens such as rituximab, cisplatin, cytosine arabinoside, and dexamethasone (R-DHAP) or rituximab, ifosfamide, carboplatin, and etoposide (R-ICE) did not exhibit different outcome [122].

The possible advantage of R-DHAP in the GCB cell-like subtype must be confirmed. Carmustine, etoposide, cytosine-arabioside, and melphalan (BEAM) is the more frequently used high-dose regimen. Additional IFRT may be used especially in the few cases with limited stage disease, but it has been never evaluated in controlled trials. Maintenance with rituximab in responding patients is not recommended [122].

Allogeneic transplantation following chemotherapy should probably be considered in patients with refractory disease, early relapse, or relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Patients not suitable for high-dose therapy may be treated with the same or other salvage regimens as rituximab, gemcitabine, and oxaliplatin (R-GEMOX), which may be combined with involved field radiotherapy or preferentially be enrolled in clinical trials testing the activity of novel drugs [6, 123, 124].

Response criteria are identical to those of first-line treatment evaluation. An evaluation should be performed after three to four cycles of salvage regimen (before high-dose treatment) and after the end of all therapy. The results of PET before high-dose treatment are correlated to clinical outcome. Follow-up of patients in second response could be the same as first response.

5 Conclusion

DLBCL is recognized as a heterogeneous group of hematological malignancies; the study of biological differences within different categories of this disease could allow a more specific, individualized treatment strategy for the patient. Adjusted treatment focused on the specific morphology of the tumor could lead to a better response rate once GCB and ACB are well defined, and there is currently many therapeutic studies underway; this could be particularly beneficial to those 15 % of patients with unclassifiable disease.

R-CHOP treatment has proven to provide very effective results in limited or advanced stage of the disease. However, treatment solely involving R-CHOP submits the patient to possible chemotherapy-induced toxicities, which may be avoided with the use of consolidation RT. This is where the stage and morphology of the disease play an important role to determine to best treatment strategy for the patient. Those with early stage localized disease or who are particularly unresponsive to chemotherapy may be more suitable for mixed modality treatment with R-CHOP and consolidative RT.

In summary, although RT is being slowly phased out by other treatment strategies including chemotherapy and therapeutic drugs, it is still a highly important method of treatment. The different forms of RT (IFRT, INRT, ISRT, etc.) can be used alongside these “new-age” treatment strategies to further improve prognostic outcomes and OS rates. Similarly, these RT methods may be used instead of certain treatments for patients who are unresponsive or develop complications with the use of chemotherapy for example. The establishment of radiotherapy as a possible treatment strategy in DLBCL could provide beneficial prognostic advantage in early stage or localized disease.

Acknowledgments Fernando José Figueiredo Agostinho D’Abreu Mendes would like to thank the Portuguese Foundation for Science and Technology for the award Portugal (Strategic Project PEst-C/SAU/UI3282/2013 and UID/NEU/04539/2013), COMPETE-FEDER.

Conflict of interest The authors declare that they have nothing to disclose.

References

- Ba, C. (2013). The role of radiation therapy in the treatment of stage I-II diffuse large B-cell lymphoma. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 8(3), 236–242. doi:10.1007/s11899-013-0170-5.
- Campo, E., Swerdlow, S. H., Harris, N. L., Pileri, S., Stein, H., & Jaffe, E. S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 117(19), 5019–5032. doi:10.1182/blood-2011-01-293050.
- Persky, D. O., & Miller, T. P. (2009). Localized large cell lymphoma: is there any need for radiation therapy? *Current Opinion in Oncology*, 21(5), 401–406. doi:10.1097/CCO.0b013e32832f3c8b.
- Ng, A. K. (2007). Diffuse large B-cell lymphoma. *Seminars in Radiation Oncology*, 17(3), 169–175. doi:10.1016/j.semradonc.2007.02.002.
- Morton, L. M., Wang, S. S., Devesa, S. S., Hartge, P., Weisenburger, D. D., & Linet, M. S. (2006). Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992–2001. *Blood*, 107(1), 265–276. doi:10.1182/blood-2005-06-2508.
- Tilly, H., Vitolo, U., Walewski, J., da Silva, M. G., Shpilberg, O., Andre, M., ... Dreyling, M. (2012). Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 23(suppl_7), vii78–vii82. doi:10.1093/annonc/mds273
- Morgan, G., Vornanen, M., Puitinen, J., Naukkarinen, A., Brincker, H., Olsen, J., ... Cartwright, R. (1997). Changing trends in the incidence of non-Hodgkin’s lymphoma in Europe. Biomed Study Group. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 8(Suppl 2), 49–54.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, E. Al. (2008). *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. In I. A. for R. on C. Cancer (Ed.), Lyon.
- Kaminski, M. S., Coleman, C. N., Colby, T. V., Cox, R. S., & Rosenberg, S. A. (1986). Factors predicting survival in adults with stage I and II large-cell lymphoma treated with primary radiation therapy. *Annals of Internal Medicine*, 104(6), 747–756. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3518561>.
- Monfardini, S., Banfi, A., Bonadonna, G., Rilke, F., Milani, F., Valagussa, P., & Lattuada, A. (1980). Improved five year survival after combined radiotherapy-chemotherapy for stage I-II non-Hodgkin’s lymphoma. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 6(2), 125–134. doi:10.1016/0360-3016(80)90189-3.
- Nissen, N. I., Ersbøll, J., Hansen, H. S., Walbom-Jørgensen, S., Pedersen-Bjergaard, J., Hansen, M. M., & Rygård, J. (1983). A randomized study of radiotherapy versus radiotherapy plus chemotherapy in stage I-II non-Hodgkin’s lymphomas. *Cancer*, 52(1), 1–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6406037>.
- Hudson, B., Hudson, G., MacLennan, K., Anderson, L., & Linch, D. (1994). Clinical stage-I Non-Hodgkins-lymphoma—long-term follow-up of patients treated by the British National Lymphoma Investigation with radiotherapy alone as initial therapy. *British Journal of Cancer*, 69, 1088–1093. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/42259/>.
- Sabattini, E., Bacci, F., Sagranso, C., & Pileri, S. A. (2010). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. *Pathologica*, 102(3), 83–87.
- Sehn, L. H., & Gascoyne, R. D. (2014). Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood*, 125(1), 22–32. doi:10.1182/blood-2014-05-577189.
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., ... Staudt, L.M. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403(February), 503–511. doi:10.1038/35000501.
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Fisher, R.I., ... Staudt, L.M. (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 346(25), 1937–1947. doi:10.1056/NEJMoa012914.
- Landberg, T.G., Håkansson, L.G., Möller, T.R., Mattsson, W.K., Landys, K.E., Johansson, B. G., ... Dahl, O.G. (1979). CVP-remission-maintenance in stage I or II non-Hodgkin’s lymphomas: preliminary results of a randomized study. *Cancer*, 44(3), 831–838. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/383273>.
- Lenz, G., Wright, G., Dave, S.S., Xiao, W., Powell, J., Zhao, H., ... Staudt, L.M. (2008). Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *The New England Journal of Medicine*, 359(22), 2313–2323. doi:10.1056/NEJMoa0802885.
- Davis, R., Ngo, V., Lenz, G., & Tolar, P. (2010). Chronic Active B cell receptor signaling in diffuse large B cell lymphoma. *Nature*, 463(7277), 88–92. doi:10.1038/nature08638.Chronic.
- Gisselbrecht, C. (1993). Aggressive lymphomas. *La Revue du Praticien*, 43(15), 1648–1653. doi:10.1056/NEJMra0807082.
- Pasqualucci, L. (2013). The genetic basis of diffuse large B-cell lymphoma. *Current Opinion in Hematology*, 20(4), 336–344. doi:10.1097/MOH.0b013e3283283623d7f.
- Roschewski, M., Staudt, L. M., & Wilson, W. H. (2014). Diffuse large B-cell lymphoma-treatment approaches in the molecular era. Nature reviews. *Clinical Oncology*, 11(1), 12–23. doi:10.1038/nrclinonc.2013.197.
- Shaffer, A. L., Young, R. M., & Staudt, L. M. (2012). Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annual Review of Immunology*, 30, 565–610. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075027.
- Béguelin, W., Popovic, R., Teater, M., Jiang, Y., Bunting, K., Rosen, M., ... Melnick, A. (2013). EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid

- transformation. *Cancer Cell*, 23(5), 677–692. doi:10.1016/j.ccr.2013.04.011.
25. Caganova, M., Carrisi, C., Varano, G., Mainoldi, F., Zanardi, F., Germain, P. L., ... Casola, S. (2013). Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 123(12), 5009–5022. doi:10.1172/JCI70626.
 26. Morin, R.D., Johnson, N. a, Severson, T.M., Mungall, A.J., An, J., Goya, R., ... Marra, M.A. (2010). Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nature Genetics*, 42(2), 181–185. doi:10.1038/ng.518.
 27. Sneeringer, C. J., Scott, M. P., Kuntz, K. W., Knutson, S. K., Pollock, R. M., Richon, V. M., & Copeland, R. A. (2010). Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(49), 20980–20985. doi:10.1073/pnas.1012525107.
 28. Cerchietti, L.C., Ghetu, A.F., Zhu, X., Da Silva, G.F., Zhong, S., Matthews, M., ... Melnick, A. (2010). A small-molecule inhibitor of BCL6 kills DLBCL cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Cell*, 17(4), 400–411. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.050.
 29. McCabe, M.T., Ott, H.M., Ganji, G., Korenchuk, S., Thompson, C., Van Aller, G.S., ... Creasy, C.L. (2012). EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature*, 492(7427), 108–112. doi:10.1038/nature11606.
 30. Pfeifer, M., Grau, M., Lenze, D., Wenzel, S.S., Wolf, A., Wollert-Wulf, B., ... Lenz, G. (2013). PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(30), 12420–5. doi:10.1073/pnas.1305656110.
 31. Lenz, G., Wright, G.W., Emre, N.C.T., Kohlhammer, H., Dave, S.S., Davis, R.E., ... Staudt, L.M. (2008). Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), 13520–13525. doi:10.1073/pnas.0804295105.
 32. Iqbal, J., Meyer, P.N., Smith, L.M., Johnson, N.A., Vose, J.M., Greiner, T.C., ... Chan, W.C. (2011). BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clinical Cancer Research*, 17(24), 7785–7795. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0267.
 33. Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., ... Elmore, S.W. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine*, 19(2), 202–8. doi:10.1038/nm.3048.
 34. Lenz, G., Davis, R.E., Ngo, V.N., Lam, L., George, T.C., Wright, G.W., ... Staudt, L.M. (2008). Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5870), 1676–1679. doi:10.1126/science.1153629.
 35. Compagno, M., Lim, W.K., Grunn, A., Nandula, S.V., Brahmachary, M., Shen, Q., ... Pasqualucci, L. (2009). Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, 459(7247), 717–721. doi:10.1038/nature07968.
 36. Kato, M., Sanada, M., Kato, I., Sato, Y., Takita, J., Takeuchi, K., ... Ogawa, S. (2009). Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*, 459(7247), 712–716. doi:10.1038/nature07969.
 37. Rimsza, L.M., LeBlanc, M.L., Unger, J.M., Miller, T.P., Grogan, T.M., Persky, D.O., ... Gascoyne, R.D. (2008). Gene expression predicts overall survival in paraffin-embedded tissues of diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*, 112(8), 3425–3433. doi:10.1182/blood-2008-02-137372.
 38. Meyer, P.N., Fu, K., Greiner, T.C., Smith, L.M., Delabie, J., Gascoyne, R.D., ... Weisenburger, D.D. (2011). Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Journal of Clinical Oncology*, 29(2), 200–207. doi:10.1200/JCO.2010.30.0368.
 39. Hans, C.P., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Gascoyne, R.D., Delabie, J., Ott, G., ... Chan, W.C. (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103(1), 275–282. doi:10.1182/blood-2003-05-1545.
 40. De Jong, D., Rosenwald, A., Chhanabhai, M., Gaulard, P., Klapper, W., Lee, A., ... Weller, E. (2007). Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications—a study from the Lunenburg lymphoma biomarker consortium. *Journal of Clinical Oncology*, 25(7), 805–812. doi:10.1200/JCO.2006.09.4490.
 41. Held, G., & Pfreundschuh, M. (2009). Hematology: germinal center or nongerminal center DLBCL? Nature reviews. *Clinical Oncology*, 6(4), 188–190. doi:10.1038/nrclinonc.2009.22.
 42. Tilly, H., & Dreyling, M. (2010). Diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 21 Suppl 5(suppl_5), v172–v174. doi:10.1093/annonc/mdq203.
 43. Hwang, H. S., Yoon, D. H., Suh, C., Park, C.-S., & Huh, J. (2014). Intestinal diffuse large B-cell lymphoma: an evaluation of different staging systems. *Journal of Korean Medical Science*, 29(1), 53–60. doi:10.3346/jkms.2014.29.1.53.
 44. Cheson, B. D., Fisher, R. I., Barrington, S. F., Cavalli, F., Schwartz, L. H., Zucca, E., & Lister, T. A. (2014). Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: The Lugano Classification. *Journal of Clinical Oncology*, 32(27), 1–10. doi:10.1200/JCO.2013.54.8800.
 45. Armitage, J. O. (2005). Staging non-Hodgkin lymphoma. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(6), 368–376. doi:10.3322/canjclin.55.6.368.
 46. Shipp, M.A., Harrington, D.P., Anderson, J.R., Bonadonna, G., Brittinger, G., Cabanillas, F., & Canellhos, G.P. (1993). A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *The New England Journal of Medicine*, 329. doi:10.1056/NEJM199309303291402.
 47. Sehn, L.H., Berry, B., Chhanabhai, M., Fitzgerald, C., Gill, K., Hoskins, P., ... Connors, J.M. (2007). The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*, 109(5), 1857–1861. doi:10.1182/blood-2006-08-038257.
 48. Ziepert, M., Hasenclever, D., Kuhnt, E., Glass, B., Schmitz, N., Pfreundschuh, M., & Loeffler, M. (2010). Standard international prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20 + B-cell lymphoma in the rituximab era. *Journal of Clinical Oncology*, 28(14), 2373–2380. doi:10.1200/JCO.2009.26.2493.
 49. Zhou, Z., Sehn, L.H., Rademaker, A.W., Gordon, L.I., LaCasce, A.S., Crosby-Thompson, A., ... Winter, J.N. (2014). An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*, 123(6), 837–842. doi:10.1182/blood-2013-09-524108.
 50. Müller, C., Murawski, N., Wiesen, M. H. J., Held, G., Poeschel, V., Zeynalova, S., ... Reiser, M. (2012). The role of sex and weight

- on rituximab clearance and serum elimination half-life in elderly patients with DLBCL. *Blood*, 119(14), 3276–3284. doi:10.1182/blood-2011-09-380949.
51. Maurer, M. J., Micallef, I. N. M., Cerhan, J. R., Katzmann, J. A., Link, B. K., Colgan, J. P., ... Witzig, T. E. (2011). Elevated serum free light chains are associated with event-free and overall survival in two independent cohorts of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 29(12), 1620–1626. doi:10.1200/JCO.2010.29.4413.
 52. Sehn, L.H., Scott, D.W., Chhanabhai, M., Berry, B., Ruskova, A., Berkahn, L., ... Gascoyne, R.D. (2011). Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Journal of Clinical Oncology*, 29(11), 1452–1457. doi:10.1200/JCO.2010.33.3419.
 53. Pfreundschuh, M., Ho, A.D., Cavallin-Stahl, E., Wolf, M., Pettengell, R., Vasova, I., ... Kuhnt, E. (2008). Prognostic significance of maximum tumour (bulk) diameter in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: an exploratory analysis of the MabThera International Trial Group. *The Lancet Oncology*, 9(5), 435–444. doi:10.1016/S1470-2045(08)70078-0.
 54. Carson, K.R., Bartlett, N.L., McDonald, J.R., Luo, S., Zeringue, A., Liu, J., ... Colditz, G.A. (2012). Increased body mass index is associated with improved survival in United States veterans with diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 30(26), 3217–3222. doi:10.1200/JCO.2011.39.2100.
 55. Porrata, L.F., Ristow, K.M., Habermann, T.M., Witzig, T.E., Colgan, J.P., Inwards, D.J., ... Markovic, S.N. (2014). Peripheral blood absolute lymphocyte/monocyte ratio during rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone treatment cycles predicts clinical outcomes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, 55(12), 2728–38. doi:10.3109/10428194.2014.893313.
 56. Wilcox, R.A., Ristow, K., Habermann, T.M., Inwards, D.J., Micallef, I.N. M., Johnston, P.B., ... Porrata, L. (2011). The absolute monocyte and lymphocyte prognostic score predicts survival and identifies high-risk patients in diffuse large-B-cell lymphoma. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 25(9), 1502–1509. doi:10.1038/leu.2011.112
 57. Drake, M. T., Maurer, M.J., Link, B.K., Habermann, T.M., Ansell, S.M., Micallef, I.N., ... Cerhan, J.R. (2010). Vitamin D insufficiency and prognosis in non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(27), 4191–4198. doi:10.1200/JCO.2010.28.6674.
 58. Hong, F., Habermann, T.M., Gordon, L.I., Hochster, H., Gascoyne, R.D., Morrison, V.A., ... Kahl, B.S. (2014). The role of body mass index in survival outcome for lymphoma patients: US intergroup experience. *Annals of Oncology*, 25(3), 669–674. doi:10.1093/annonc/mdt594.
 59. Persky, D.O., Unger, J.M., Spier, C.M., Stea, B., LeBlanc, M., McCarty, M.J., ... Miller, T.P. (2008). Phase II study of rituximab plus three cycles of CHOP and involved-field radiotherapy for patients with limited-stage aggressive B-cell lymphoma: Southwest Oncology Group Study 0014. *Journal of Clinical Oncology*, 26(14), 2258–2263. doi:10.1200/JCO.2007.13.6929.
 60. Phan, J., Mazloom, A., Medeiros, L.J., Zreik, T.G., Wogan, C., Shihadeh, F., ... Dabaja, B.S. (2010). Benefit of consolidative radiation therapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 28(27), 4170–4176. doi:10.1200/JCO.2009.27.3441.
 61. Horning, S. J., Weller, E., Kim, K., Earle, J. D., O'Connell, M. J., Habermann, T. M., & Glick, J. H. (2004). Chemotherapy with or without radiotherapy in limited-stage diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma: Eastern Cooperative Oncology Group Study 1484. *Journal of Clinical Oncology*, 22(15), 3032–3038. doi:10.1200/JCO.2004.06.088.
 62. Zelenetz, A.D., Wierda, W.G., Abramson, J.S., Advani, R.H., Andreadis, C.B., Bartlett, N., ... Naganuma, M. (2013). Non-Hodgkin's lymphomas, version 1.2013. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 11(3), 257–72; quiz 273. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23486452>.
 63. Miller, T.P., Dahlberg, S., Cassady, J.R., Adelstein, D.J., Spier, C.M., Grogan, T.M., ... Fisher, R.I. (1998). Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized intermediate- and high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 339(1), 21–26. doi:10.1056/NEJM199807023390104.
 64. Sehn, L. H. (2012). Chemotherapy alone for localized diffuse large B-cell lymphoma. *The Cancer Journal*, 18(5), 421–426. doi:10.1097/PPO.0b013e31826c5907.
 65. Maraldo, M. V., Aznar, M. C., Vogelius, I. R., Petersen, P. M., & Specht, L. (2013). Involved node radiation therapy: an effective alternative in early-stage hodgkin lymphoma. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 85(4), 1057–1065. doi:10.1016/j.ijrobp.2012.08.041.
 66. Campbell, B. A., Connors, J. M., Gascoyne, R. D., Morris, W. J., Pickles, T., & Sehn, L. H. (2012). Limited-stage diffuse large B-cell lymphoma treated with abbreviated systemic therapy and consolidation radiotherapy: involved-field versus involved-node radiotherapy. *Cancer*, 118(17), 4156–4165. doi:10.1002/ncr.26687.
 67. Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., ... Gisselbrecht, C. (2002). CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 346. doi:10.1056/NEJMoa011795.
 68. Feugier, P., Van Hoof, A., Sebban, C., Solal-Celigny, P., Bouabdallah, R., Fermé, C., ... Coiffier, B. (2005). Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(18), 4117–4126. doi:10.1200/JCO.2005.09.131.
 69. Pfreundschuh, M., Schubert, J., Ziepert, M., Schmits, R., Mohren, M., Lengfelder, E., ... Loeffler, M. (2008). Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *The Lancet Oncology*, 9(2), 105–116. doi:10.1016/S1470-2045(08)70002-0.
 70. Maurer, M.J., Ghesquières, H., Jais, J.P., Witzig, T.E., Haioun, C., Thompson, C.A., ... Cerhan, J.R. (2014). Event-free survival at 24 months is a robust end point for disease-related outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 32(10), 1066–1073. doi:10.1200/JCO.2013.51.5866.
 71. Récher, C., Coiffier, B., Haioun, C., Molina, T.J., Fermé, C., Casasnovas, O., ... Tilly, H. (2011). Intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab versus standard CHOP plus rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (LNH03-2B): An open-label randomised phase 3 trial. *The Lancet*, 378(9806), 1858–1867. doi:10.1016/S0140-6736(11)61040-4.
 72. André, M., Mounier, N., Leleu, X., Sonet, A., Brice, P., Henry-Amar, M., ... Gisselbrecht, C. (2004). Second cancers and late toxicities after treatment of aggressive non-Hodgkin lymphoma with the ACVBP regimen: A GELA cohort study on 2837 patients. *Blood*, 103(4), 1222–1228. doi:10.1182/blood-2003-04-1124.

73. Cunningham, D., Hawkes, E.A., Jack, A., Qian, W., Smith, P., Mouncey, P., ... Linch, D. (2013). Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *The Lancet*, *381*(9880), 1817–1826. doi:10.1016/S0140-6736(13)60313-X.
74. Delarue, R., Tilly, H., Mounier, N., Petrella, T., Salles, G., Thieblemont, C., ... Bosly, A. (2013). Dose-dense rituximab-CHOP compared with standard rituximab-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (the LNH03-6B study): a randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, *14*(6), 525–533. doi:10.1016/S1470-2045(13)70122-0
75. Gang, A.O., Strøm, C., Pedersen, M., d'Amore, F., Pedersen, L.M., Bukh, A., ... Nully Brown, P. (2012). R-choep-14 improves overall survival in young high-risk patients with diffuse large b-cell lymphoma compared with r-chop-14. A population-based investigation from the danish lymphoma group. *Annals of Oncology*, *23*(1), 147–153. doi:10.1093/annonc/mdr058.
76. Pfreundschuh, M., Kuhnt, E., Trümper, L., Österborg, A., Trneny, M., Shepherd, L., ... Murawski, N. (2011). CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group. *The Lancet Oncology*, *12*(11), 1013–1022. doi:10.1016/S1470-2045(11)70235-2.
77. Wilson, W.H., Dunleavy, K., Pittaluga, S., Hegde, U., Grant, N., Steinberg, S.M., ... Janik, J.E. (2008). Phase II study of dose-adjusted EPOCH and rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of germinal center and post-germinal center biomarkers. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(16), 2717–2724. doi:10.1200/JCO.2007.13.1391.
78. Wilson, W.H., Jung, S.H., Porcu, P., Hurd, D., Johnson, J., Eric Martin, S., ... Hsi, E.D. (2012). A cancer and leukemia group B multi-center study of DA-EPOCH-rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of outcome by molecular subtype. *Haematologica*, *97*(5), 758–765. doi:10.3324/haematol.2011.056531.
79. Martinelli, G., Gigli, F., Calabrese, L., Ferrucci, P. F., Zucca, E., Crosta, C., ... Moreno Gomez, H. (2009). Early stage gastric diffuse large B-cell lymphomas: results of a randomized trial comparing chemotherapy alone versus chemotherapy + involved field radiotherapy. (IELSG 4). [corrected]. *Leukemia & Lymphoma*, *50*(6), 925–931. doi:10.1080/10428190902912478.
80. Bonnet, C., Fillet, G., Mounier, N., Ganem, G., Molina, T.J., Thiéblemont, C., ... Reyes, F. (2007). CHOP alone compared with CHOP plus radiotherapy for localized aggressive lymphoma in elderly patients: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Journal of Clinical Oncology*, *25*(7), 787–792. doi:10.1200/JCO.2006.07.0722.
81. Ballonoff, A., Rusthoven, K.E., Schwer, A., McCammon, R., Kavanagh, B., Bassetti, M., ... Rabinovitch, R. (2008). Outcomes and effect of radiotherapy in patients with stage I or II diffuse large B-cell lymphoma: a surveillance, epidemiology, and end results analysis. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, *72*(5), 1465–1471. doi:10.1016/j.ijrobp.2008.02.068.
82. Ferreri, A.J., Dell'Oro, S., Reni, M., Ceresoli, G.L., Cozzarini, C., Ponzoni, M., & Villa, E. (2000). Consolidation radiotherapy to bulky or semibulky lesions in the management of stage III-IV diffuse large B cell lymphomas. *Oncology*, *58*(3), 219–226.
83. Schlembach, P. J., Wilder, R. B., Tucker, S. L., Ha, C. S., Rodriguez, M. A., Hess, M. A., & Cox, J. D. (2000). Impact of involved field radiotherapy after CHOP-based chemotherapy on stage III-IV, intermediate grade and large-cell immunoblastic lymphomas. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, *48*(4), 1107–1110. doi:10.1016/S0360-3016(00)00760-4.
84. Horwitz, S.M., Negrin, R.S., Blume, K.G., Breslin, S., Stuart, M.J., Stockerl-Goldstein, K.E., ... Horning, S.J. (2004). Rituximab as adjuvant to high-dose therapy and autologous hematopoietic cell transplantation for aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, *103*(3), 777–783. doi:10.1182/blood-2003-04-1257.
85. Shi, Z., Das, S., Okwan-Duodu, D., Esiashvili, N., Flowers, C., Chen, Z., ... Khan, M.K. (2013). Patterns of failure in advanced stage diffuse large b-cell lymphoma patients after complete response to r-chop immunochemotherapy and the emerging role of consolidative radiation therapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, *86*(3), 569–577. doi:10.1016/j.ijrobp.2013.02.007.
86. Dorth, J. A., Prosnitz, L. R., Broadwater, G., Diehl, L. F., Beaven, A. W., Coleman, R. E., & Kelsey, C. R. (2012). Impact of consolidation radiation therapy in stage III-IV diffuse large B-cell lymphoma with negative post-chemotherapy radiologic imaging. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, *84*(3), 762–767. doi:10.1016/j.ijrobp.2011.12.067.
87. Dorth, J. A., Prosnitz, L. R., Broadwater, G., Beaven, A. W., & Kelsey, C. R. (2012). Radiotherapy dose-response analysis for diffuse large B-cell lymphoma with a complete response to chemotherapy. *Radiation Oncology*, *7*(1), 100. doi:10.1186/1748-717X-7-100.
88. Reyes, F., Lepage, E., Ganem, G., Molina, T.J., Brice, P., Coiffier, B., ... Tilly, H. (2005). ACVBP versus CHOP plus radiotherapy for localized aggressive lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, *352*(12), 1197–1205. doi:10.1056/NEJMoa042040.
89. Lowry, L., Smith, P., Qian, W., Falk, S., Benstead, K., Illidge, T., ... Hoskin, P. (2011). Reduced dose radiotherapy for local control in non-Hodgkin lymphoma: a randomised phase III trial. *Radiation Oncology*, *100*(1), 86–92. doi:10.1016/j.radonc.2011.05.013.
90. Boyle, J., Beaven, A.W., Diehl, L.F., Prosnitz, L.R., & Kelsey, C.R. (2014). Improving outcomes in advanced DLBCL: systemic approaches and radiotherapy. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, *28*(12). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25510806>.
91. Juweid, M. E., & Cheson, B. D. (2005). Role of positron emission tomography in lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, *23*(21), 4577–4580. doi:10.1200/JCO.2005.01.904.
92. Juweid, M.E., Stroobants, S., Hoekstra, O.S., Mottaghy, F.M., Dietlein, M., Guermazi, A., ... Cheson, B.D. (2007). Use of positron emission tomography for response assessment of lymphoma: consensus of the imaging subcommittee of international harmonization project in lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, *25*(5), 571–578. doi:10.1200/JCO.2006.08.2305.
93. Mikhaeel, N. G., Hutchings, M., Fields, P. A., O'Doherty, M. J., & Timothy, A. R. (2005). FDG-PET after two to three cycles of chemotherapy predicts progression-free and overall survival in high-grade non-Hodgkin lymphoma. *Annals of Oncology*, *16*(June), 1514–1523. doi:10.1093/annonc/mdi272.
94. Mikhaeel, N. G., Timothy, A. R., O'Doherty, M. J., Hain, S., & Maisey, M. N. (2000). 18-FDG-PET as a prognostic indicator in the treatment of aggressive non-Hodgkin's lymphoma-comparison with CT. *Leukemia & Lymphoma*, *39*(5-6), 543–553. doi:10.3109/10428190009113384.
95. Noordijk, E.M., Carde, P., Dupouy, N., Hagenbeek, A., Krol, A. D.G., Kluin-Nelemans, J.C., ... Henry-Amar, M. (2006). Combined-modality therapy for clinical stage I or II Hodgkin's lymphoma: long-term results of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer H7 randomized controlled trials. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the*

- American Society of Clinical Oncology*, 24(19), 3128–35. doi:10.1200/JCO.2005.05.2746.
96. Bonadonna, G., Bonfante, V., Viviani, S., Di Russo, A., Villani, F., & Valagussa, P. (2004). ABVD plus subtotal nodal versus involved-field radiotherapy in early-stage Hodgkin's disease: long-term results. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(14), 2835–2841. doi:10.1200/JCO.2004.12.170.
 97. Zwam, H. M. (2013). Involved nodal radiotherapy vs. involved field radiotherapy after chemotherapy in the treatment of early stage Hodgkin's lymphoma. *Journal of Cancer Therapy*, 04(01), 271–279. doi:10.4236/jct.2013.41034.
 98. Avilés, A., Delgado, S., Nambo, M. J., Alatríste, S., & Díaz-Maqueo, J. (1994). Adjuvant radiotherapy to sites of previous bulky disease in patients stage iv diffuse large cell lymphoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 30(4), 799–803. doi:10.1016/0360-3016(94)90352-2.
 99. Avilés, A., Neri, N., Delgado, S., Pérez, F., Nambo, M.J., Cleto, S., ... Huerta-Guzmán, J. (2005). Residual disease after chemotherapy in aggressive malignant lymphoma: the role of radiotherapy. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 22(4), 383–387. doi:10.1385/MO:22:4:383.
 100. Avilés, A., Fernández, R., Pérez, F., Nambo, M. J., Neri, N., Talavera, A., ... Cleto, S. (2004). Adjuvant radiotherapy in stage IV diffuse large cell lymphoma improve outcome. *Leukemia & Lymphoma*, 45(7), 1385–1389. doi:10.1080/10428190410001667712.
 101. Held, G., Murawski, N., Ziepert, M., Fleckenstein, J., Poschel, V., Zwick, C., ... Pfreundschuh, M. (2014). Role of radiotherapy to bulky disease in elderly patients with aggressive B-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 32(11), 1112–1118. doi:10.1200/JCO.2013.51.4505.
 102. Jerusalem, G., Beguin, Y., Fassotte, M. F., Najjar, F., Paulus, P., Rigo, P., & Fillet, G. (1999). Whole-body positron emission tomography using 18F-fluorodeoxyglucose for posttreatment evaluation in Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma has higher diagnostic and prognostic value than classical computed tomography scan imaging. *Blood*, 94(2), 429–433. Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/94/2/429.abstract>.
 103. Spaepen, K., Stroobants, S., Dupont, P., Van Steenweghen, S., Thomas, J., Vandenberghe, P., ... Verhoef, G. (2001). Prognostic value of positron emission tomography (PET) with fluorine-18 fluorodeoxyglucose ([18F]FDG) after first-line chemotherapy in non-Hodgkin's lymphoma: Is [18F]FDG-PET a valid alternative to conventional diagnostic methods? *Journal of Clinical Oncology*, 19(2), 414–419. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11208833>.
 104. Ramalingam, S.S., Kotsakis, A., Tarhini, A.A., Heron, D.E., Smith, R., Friedland, D., ... Argiris, A. (2013). A multicenter phase II study of cetuximab in combination with chest radiotherapy and consolidation chemotherapy in patients with stage III non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 81(3), 416–421. doi:10.1016/j.lungcan.2013.06.002.
 105. Barrington, S.F., Mikhael, N.G., Kostakoglu, L., Meignan, M., Hutchings, M., Mueller, S.P., ... Cheson, B.D. (2014). Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *Journal of Clinical Oncology*, 32(27), 3048–3058. doi:10.1200/JCO.2013.53.5229.
 106. Cheson, B.D., Pfistner, B., Juweid, M.E., Gascoyne, R.D., Specht, L., Horning, S.J., ... Diehl, V. (2007). Revised response criteria for malignant lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 25(5), 579–586. doi:10.1200/JCO.2006.09.2403.
 107. Juweid, M.E., Wiseman, G.A., Vose, J.M., Ritchie, J.M., Menda, Y., Wooldridge, J.E., ... Cheson, B.D. (2005). Response assessment of aggressive non-Hodgkin's lymphoma by integrated International Workshop Criteria and fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Journal of Clinical Oncology*, 23(21), 4652–4661. doi:10.1200/JCO.2005.01.891.
 108. Kamath, S. S., Marcus, R. B., Lynch, J. W., & Mendenhall, N. P. (1999). The impact of radiotherapy dose and other treatment-related and clinical factors on in-field control in stage I and II non-Hodgkin's lymphoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 44(3), 563–568. doi:10.1016/S0360-3016(99)00051-6.
 109. Bindra, R. S., & Yahalom, J. (2011). The important role of radiation therapy in early-stage diffuse large B-cell lymphoma: time to review the evidence once again. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 11(9), 1367–1378. doi:10.1586/era.11.88.
 110. Habermann, T.M., Weller, E.A., Morrison, V.A., Gascoyne, R.D., Cassileth, P.A., Cohn, J.B., ... Horning, S.J. (2006). Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 24(19), 3121–3127. doi:10.1200/JCO.2005.05.1003.
 111. Shenkier, T.N., Voss, N., Fairey, R., Gascoyne, R.D., Hoskins, P., Klasa, R., ... Connors, J.M. (2002). Brief chemotherapy and involved-region irradiation for limited-stage diffuse large-cell lymphoma: an 18-year experience from the British Columbia Cancer Agency. *Journal of Clinical Oncology*, 20(1), 197–204. doi:10.1200/JCO.20.1.197.
 112. Peyrade, F., Jardin, F., Thieblemont, C., Thyss, A., Emile, J. F., Castaigne, S., ... Tilly, H. (2011). Attenuated immunochemotherapy regimen (R-miniCHOP) in elderly patients older than 80 years with diffuse large B-cell lymphoma: a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 12(5), 460–468. doi:10.1016/S1470-2045(11)70069-9.
 113. Kridel, R., & Dietrich, P. Y. (2011). Prevention of CNS relapse in diffuse large B-cell lymphoma. *The Lancet Oncology*, 12(13), 1258–1266. doi:10.1016/S1470-2045(11)70140-1.
 114. Tilly, H., Lepage, E., Coiffier, B., Blanc, M., Herbrecht, R., Bosly, A., ... Reyes, F. (2003). Intensive conventional chemotherapy (ACVBP regimen) compared with standard CHOP for poor-prognosis aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 102(13), 4284–4289. doi:10.1182/blood-2003-02-0542.
 115. Abramson, J.S., Hellmann, M., Barnes, J.A., Hammerman, P., Toomey, C., Takvorian, T., ... Hochberg, E.P. (2010). Intravenous methotrexate as central nervous system (CNS) prophylaxis is associated with a low risk of CNS recurrence in high-risk patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer*, 116(18), 4283–4290. doi:10.1002/cncr.25278.
 116. Ferreri, A.J., Reni, M., Foppoli, M., Martelli, M., Pangalis, G.A., Frezzato, M., ... Cavalli, F. (2009). High-dose cytarabine plus high-dose methotrexate versus high-dose methotrexate alone in patients with primary CNS lymphoma: a randomised phase 2 trial. *The Lancet*, 374(9700), 1512–1520. doi:10.1016/S0140-6736(09)61416-1.
 117. Brugiatelli, M., Bandini, G., Barosi, G., Lauria, F., Liso, V., Marchetti, M., Tura, S., ... Tura, S. (2006). Management of chronic lymphocytic leukemia: Practice guidelines from the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Haematologica*, 91(1), 1662–1673. Retrieved from <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed7&NEWS=N&AN=2007009472>.
 118. Moskowitz, C. H. (2012). Interim PET-CT in the management of diffuse large B-cell lymphoma. Hematology/the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. *Education Program*, 2012(1), 397–401. doi:10.1182/asheducation-2012.1.397.
 119. Awan, U., Siddiqui, N., SaadUllah, M., Bashir, H., Farooqui, Z. S., Muzaffar, N., & Mahmood, M.T. (2013). FDG-PET scan in

- assessing lymphomas and the application of Deauville Criteria. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 63(6), 725–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23901673>.
120. Armitage, J. O., & Loberiza, F. R. (2006). Is there a place for routine imaging for patients in complete remission from aggressive lymphoma? *Annals of Oncology*, 17(6), 883–884. doi:10.1093/annonc/mdl099.
121. Kewalramani, T., Zelenetz, A.D., Nimer, S.D., Portlock, C., Straus, D., Noy, A., ... Moskowitz, C.H. (2004). Rituximab and ICE as second-line therapy before autologous stem cell transplantation for relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 103(10), 3684–3688. doi:10.1182/blood-2003-11-3911.
122. Gisselbrecht, C., Glass, B., Mounier, N., Gill, D.S., Linch, D.C., Trneny, M., ... Schmitz, N. (2010). Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Journal of Clinical Oncology*, 28(27), 4184–4190. doi:10.1200/JCO.2010.28.1618.
123. Glass, B., Hasenkamp, J., Wulf, G., Dreger, P., Pfreundschuh, M., Gramatzki, M., ... Schmitz, N. (2012). Oral Abstract Session , Sat, 3 : 00 PM-6 : 00 PM High-dose chemotherapy followed by allogeneic stem cell transplantation in high-risk relapsed and refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma : results of a prospective study of the German high-grade non-H. *Journal of Clinical Oncology*, Retrieved from <http://meetinglibrary.asco.org/content/99784-114>.
124. El Gnaoui, T., Dupuis, J., Belhadj, K., Jais, J.P., Rahmouni, A., Copie-Bergman, C., ... Haioun, C. (2007). Rituximab, gemcitabine and oxaliplatin: an effective salvage regimen for patients with relapsed or refractory B-cell lymphoma not candidates for high-dose therapy. *Annals of Oncology*, 18(8), 1363–1368. doi:10.1093/annonc/mdm133.

Effects of X-radiation on lung cancer cells: the interplay between oxidative stress and P53 levels

Fernando Mendes^{1,2,3} · Tiago Sales¹ · Cátia Domingues^{3,4} · Susann Schugk¹ · Ana Margarida Abrantes^{1,3} · Ana Cristina Gonçalves^{3,4} · Ricardo Teixo¹ · Rita Silva¹ · João Casalta-Lopes^{1,5} · Clara Rocha^{6,7} · Mafalda Laranjo¹ · Paulo César Simões⁵ · Ana Bela Sarmiento Ribeiro^{3,4,8,9} · Maria Filomena Botelho^{1,3} · Manuel Santos Rosa¹⁰

Received: 29 October 2015 / Accepted: 3 November 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Lung cancer (LC) ranks as the most prevalent and deadliest cause of cancer death worldwide. Treatment options include surgery, chemotherapy and/or radiotherapy, depending on LC staging, without specific highlight. The aim was to evaluate the effects of X-radiation in three LC cell lines. H69, A549 and H1299 cell lines were cultured and irradiated with 0.5–60 Gy of X-radiation. Cell survival was evaluated by clonogenic assay. Cell death and the role of reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential, BAX, BCL-2 and cell cycle were analyzed by flow cytometry. Total and phosphorylated P53 were assessed by western blotting. Ionizing radiation decreases cell proliferation and viability in a dose-, time- and cell line-dependent manner, inducing cell death preferentially by apoptosis with cell cycle arrest. These results may be related to differences in P53 expression and oxidative stress response. The results obtained indicate that sensitivity and/or resistance to radiation may be dependent on molecular LC characteristics which could influence response to radiotherapy and treatment success.

Keywords Radiotherapy · Lung cancer · Oxidative stress · P53

Introduction

Lung cancer (LC) is one of most common causes of cancer death worldwide. Incidence in males has been declining, while in females it is increasing due to changes in smoking habits [1, 2].

LC can be divided into small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC). NSCLC comprises several histological subgroups as adenocarcinoma, squamous cell or squamous-cell carcinoma, large-cell carcinoma and large undifferentiated carcinoma cells. Treatment options include radiotherapy (RT), chemotherapy and/or surgery [3]. RT use has increased to treat patients due to improvement in high-precision RT equipment. As a consequence, increased tumor control rates make RT an alternative to surgery for some tumor stages.

✉ Fernando Mendes
fjmendes@estescoimbra.pt

¹ Biophysics Unit-CNC.IBILI, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Azinhaga Santa Comba, Celas, 3000-548 Coimbra, Portugal

² Department Biomedical Laboratory Sciences, ESTESC-Coimbra Health School, Polytechnic Institute of Coimbra, Coimbra, Portugal

³ Faculty of Medicine, Center of Investigation in Environment, Genetics and Oncobiology (CIMAGO), University of Coimbra, Coimbra, Portugal

⁴ Faculty of Medicine, Applied Molecular Biology and Clinical University of Hematology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

⁵ Radiation Oncology Department, Hospital and University Center of Coimbra, Coimbra, Portugal

⁶ Department Complementary Sciences, ESTESC-Coimbra Health School, Polytechnic Institute of Coimbra, Coimbra, Portugal

⁷ Institute for Systems Engineering and Computers at Coimbra, Coimbra, Portugal

⁸ Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

⁹ CNC.IBILI, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

¹⁰ Faculty of Medicine, Immunology Institute, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

However, in some cases, RT proves to be ineffective on account of tumor cells low radiosensitivity due to acquisition of radioresistance. So, rational and efficient use of ionizing radiation (IR) depends on molecular, cellular and tissue characteristics [4, 5].

Several studies suggest that P53 plays a central role in cell signaling response to IR, namely in resistance to treatment. Several authors described that P53 responds to diverse stress signals orchestrating specific cellular responses, cell cycle checkpoint activation, cellular senescence and apoptosis which are crucial to tumor suppression [6–9]. The purpose of this study was to evaluate effects of IR in three LC cell lines and respective underlying mechanisms.

We intend to study the influence of P53 expression profiles on effects induced by IR doses in three LC cell lines, namely in cell death, alterations in cell cycle (CC), reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential (MMP), B cell leukemia and lymphoma-2 (BCL-2) and BCL-2-associated X protein (BAX) to assess cell survival and death and, consequently, efficiency of IR in LC treatment.

Materials and methods

Cell lines

Experiments were performed with SCLC cell line NCI-H69/H69 (ATCC HTB-119[®] TM, P53^{Mut}) and NSCLC cell lines A549 (ATCC CCL-185[®] TM, P53^{Wild}) and NCI-H1299/H1299 (ATCC CRL-5803[®] TM, P53^{Null}). Cell lines were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium 1640 or Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) (Sigma, F7524, USA) and 1 % penicillin–streptomycin (GIBCO 15140-122, RU) maintained at 37 °C with 5 % CO₂ in a humidified incubator. For all experiments, cells were plated at an initial concentration of 0.5×10^6 cells/ml.

Irradiation

Cell suspensions were exposed to IR (0.5–60 Gy) in a Varian 600C Linear Accelerator 12D10 (LINAC, Radiology Oncology Systems Inc., USA), a low-photon-energy radiator delivering high-energy photon beams. The energy interval of LINAC ranges between 1 and 50 MeV. For samples, radiation energy of 4 MeV was used. Standards of the International Code of Practice for Dosimetry, TRS-398, published by International Atomic Energy Agency (IAEA) were assumed as references for calibration and dose calculations [10]. The capacity of the device allows administration of 50–250 MU/min. According to desired doses,

number of MU was calculated ($1 \text{ MU} = 0.022 \text{ Gy}$) [10, 11]. Administration of doses was cumulative and applied from two angles (90° and 270°) to assure conformity. Selected radiation doses and equivalent MU, for radiation regimes of single shot and fractions the BED (=EQD₂) of the compatible radiation doses was determined (Table 1). Irradiation was held at Radiotherapy Service of the Hospital and University Center of Coimbra—University Hospital.

Cell survival

Cell suspensions were irradiated, then plated into six-well plates and incubated as described above. After 7–12 days of growth, cells were fixed with methanol, stained with crystal violet (0.4 % on methanol) and counted. Plate efficiency (PE) and survival factor (SF) were calculated [12].

Flow cytometry studies

Cells not exposed (control condition) and exposed to increased doses of IR were maintained in culture, as described, for 48 h. Cell death, intracellular redox cell environment, BAX/BCL-2 expression levels, MMP and CC were assessed by flow cytometry (FC).

Detection of cell death

Cell death was evaluated using annexin V (AnV)/propidium iodide (PI) double staining according to the manufacturer's protocol (FITC Annexin V Apoptosis Detection kit I, BD Pharmingen, EUA). Briefly, 0.5×10^6 cells/ml were washed in ice-cold phosphate buffer saline (PBS), centrifuged at $500 \times g$ for 5 min, resuspended in AnV-binding buffer and incubated with AnV conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) and with PI. After 15 min of incubation in dark, cells were diluted in 400 µl of binding buffer and analyzed by FC. The analysis was performed using a six-parameter, four-color FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA) equipped with an argon laser 15 nW. For each test, 1×10^6 cells were used and data on at least 10,000 events were obtained using CellQuest software (Becton Dickinson) and analyzed by Paint-A-Gate software (Becton Dickinson) [13, 14].

Evaluation of apoptotic molecules

Modulation of BAX/BCL-2 expression levels was analyzed by FC. For this, 0.5×10^6 cells/ml were incubated with monoclonal antibodies, namely 3 µl anti-BAX-PE (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA, sc-20067) and 3 µl anti-BCL-2-FITC (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA, sc-

Table 1 Administrated doses of IR and the equivalent value of monitor units (MU)

Dose (Gy)	0.5	2 (0.5 + 1.5)	5 (2 + 3)	8 (5 + 3)	12 (8 + 4)	15 (12 + 3)	30 (15 + 15)	60 (30 + 30)
Angle 90° (MU)	23	67	133	133	178	133	669	1387
Angle 270° (MU)	23	67	134	134	179	134	669	1387
Number of fractions	1	1	5	1	1	1	1	1
α/β ratio (Gy)	10		10			10	10	10
EQD ₂	0.44	2	31.25	12.0	22.0	31.25	100	350

1 Gy = 67 MU. Radiation was performed from two angles (90° and 270°) and increases in a cumulative manner (numbers within brackets). Determined EQD₂ for various doses of IR according to the number of fractions applied and the conventional alpha/beta ratio for lung tissue of 10

509), according to manufacturer's protocol. Results are expressed as BAX/BCL-2 ratio as mean intensity of fluorescence [15, 16].

Mitochondrial membrane potential evaluation

MMP evaluation was performed using the lipophilic cationic dye 5.5'.6.6'-tetrachloro-1.1'.3.3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide (JC-1) (Molecular Probes, Invitrogen, USA) as previously described [13, 14, 16]. Concisely, 0.5×10^6 cells/ml were washed with PBS, centrifuged at $300 \times g$, 5 min and incubated with JC-1 at a final concentration of 5 $\mu\text{g/ml}$, 15 min at 37 °C in dark. Cells were washed with PBS and analyzed by FC. Results are presented as monomer (M)/aggregate (A) ratio of JC-1 [17].

Cell cycle analysis

Briefly, 0.5×10^6 cells/ml were washed with PBS, centrifuged at $500 \times g$ for 5 min and then fixed in 70 % ethanol at 4 °C for 30 min in dark. After, cells were washed in PBS and incubated with PI/RNase solution (PI/RNase, Immunostep, S.L., Spain) for 15 min in dark [15].

Detection of reactive oxygen species and antioxidative defense

Reactive oxygen species (ROS) production was determined by oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) and dihydroetidine (O₂⁻DHE) and antioxidative defense by expression of reduced glutathione (GSH) using mercury orange. 0.5×10^6 cells/ml were incubated with 5 μM of H₂DCF-DA (Molecular Probes, Invitrogen, USA) for 30 min, with 2 μM of O₂⁻DHE (Sigma, USA), or 40 μM of mercury orange (Sigma, USA), 15 min, at 37 °C in dark. Cells were washed with PBS, and fluorescence was detected by FC [18].

P53 levels

To detect P53 levels, western blotting analysis was performed as previously described [19]. Total protein extracts

were prepared, and protein content was determined [19]. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electrotransfer were performed as previously [19]. Incubation with primary antibodies, β -actin (anti- β -actin mouse monoclonal antibody 1:10,000, A5441, Sigma, USA), total P53 (1:200; P53 DO-7, Sc47698 Santa Cruz Biotechnology, USA) and phosphorylated P53 (pP53) (1:200; P53-18; sc-13580, Santa Cruz Biotechnology, USA) and with secondary antibody (anti-mouse) and analysis of the blots were performed as described [19].

Statistical analysis

All results are expressed as a mean \pm standard deviation (SD) of a minimum of four independent experiments performed in duplicate or triplicate. Statistical analysis was performed using software IBM SPSS[®] version 19 (National Opinion Research Center, USA). To evaluate the normality of distribution of variables, Shapiro–Wilk test was used. To variables with normal distribution, parametric tests were used; otherwise, tests used were nonparametric. Comparison of results was made using Mann–Whitney test (nonparametric test). Comparison of the qualitative between more than two groups was made using Kruskal–Wallis test (nonparametric test) or using the ANOVA 1 fixed factor test (parametric test). Multiple comparisons were made considering correction of Bonferroni. Relative to the results of the clonogenic assays, significant differences of conditions vs. control were considered when the conditions confidence interval of 95 % did not include the value 1.

Results

Ionizing radiation decreases LC cell survival in a cell type-dependent manner

Cell survival of the three cell lines studied was assessed, and cell survival curves were obtained and fitted to different cell survival models. For this adjustment, doses up to 12 Gy were used. Clonogenic assays showed that H1299 and A549 cells were more radiosensitive compared with

Table 2 Model and median lethal dose (LD50) calculated after irradiation with increasing doses of RX (0.5, 2, 5, 8 and 12 Gy) of lung cancer cell lines H69, A549 and H1299

Cell line	LD50 (Gy)	Model
H69	4.46	Linear
A549	2.77 ^{##}	Linear
H1299	1.95 ^{ooo}	Linear quadratic

The LD₅₀ was calculated as mean \pm SD of five independent experiments. One-way ANOVAs were performed with Bonferroni's correction comparing LD₅₀ all cell lines H69 versus A549 (^{##} $P < 0.01$) and H69 versus H1299 (^{ooo} $P < 0.001$)

H69 cells, as median lethal dose (LD50) is 1.95, 2.77 and 4.46 Gy, respectively (Table 2).

Ionizing radiation induces apoptosis by mitochondria pathway activation and ROS production

Cell death was assessed at an intermediate time point (48 h) following IR exposure, by FC. Our results showed that IR induces cell death in a dose- and cell line-dependent manner, mainly by apoptosis (Fig. 1a). We observed a significant decrease in the number of viable cells with increase in dose. In A549, we verified a significant decrease in cell viability with IR exposure to all doses, namely 60 Gy ($41.25 \pm 1.75 \%$, $P < 0.001$). This decrease was due to a significant increase in cells undergoing initial apoptosis compared with control, namely for higher doses [60 Gy ($34.00 \pm 2.45 \%$, $P < 0.001$)]. We also observed a significant increase in cells in late apoptosis/necrosis with exposure to higher doses [60 Gy ($8.00 \pm 0.71 \%$, $P < 0.001$)]. In H1299, we observed a significant decrease in viable cells with exposure to higher doses, namely 60 Gy ($65.00 \pm 3.19 \%$, $P < 0.001$). This decrease was due to a significant increase in cells undergoing late apoptosis/necrosis with exposure to 15 Gy ($8.40 \pm 1.03 \%$, $P = 0.001$) and a significant increase in cells undergoing necrosis with exposure to higher doses [60 Gy ($21.25 \pm 2.06 \%$, $P < 0.001$)]. For H69 cells, we observed a significant decrease in viable cells after IR exposure, namely 60 Gy (52.25 ± 1.31 , $P < 0.001$). This decrease was due to a significant increase in cells undergoing initial apoptosis after exposure to higher doses [60 Gy (36.00 ± 3.19 , $P < 0.001$)].

As IR induces cell death mainly by apoptosis, ratio between pro (BAX)- and anti-apoptotic (BCL-2) proteins was studied. As shown in Fig. 1b, increasing doses of IR induced a significant increase in BAX/BCL-2 ratio compared with control in all cell lines. Significant differences were observed between cells in study, where H69 showed a significant increase in BAX/BCL-2 ratio after exposure to

higher doses [60 Gy (1.72 ± 0.06 , $P < 0.01$)]. In A549 cells, we also observed a significant increase in BAX/BCL-2 ratio after exposure to IR [60 Gy (1.38 ± 0.04 , $P = 0.002$)] compared with control. For H1299 cells, we observed a significant increase in BAX/BCL-2 ratio compared with control after exposure to 15 Gy (1.40 ± 0.05 , $P = 0.009$) and 30 Gy (1.40 ± 0.05 , $P = 0.003$).

To assess specific contribution of mitochondria pathway, we evaluated alterations of MMP in cells exposed to IR and respective controls by FC with JC-1 probe. In apoptotic cells, MMP collapses and JC-1 cannot aggregate within mitochondria, remaining in monomeric form in cytosol. These cells exhibit a higher M/A ratio than viable cells. As shown in Fig. 1c, in A549 cells, increasing doses of IR induce significant increase in M/A ratio, namely after exposure to higher doses [60 Gy (2.43 ± 0.12 , $P < 0.001$)], reflecting a decrease in mitochondrial membrane potential. In H69 cells, we observed significantly increased JC-1 M/A ratio for 0.5 Gy (1.24 ± 0.06 , $P = 0.029$), 15 Gy (1.38 ± 0.09 , $P = 0.023$) and 30 Gy (1.69 ± 0.16 , $P = 0.022$). In H1299 cells, we observed a significant increase in JC-1 M/A ratio after exposure to 0.5 Gy (0.87 ± 0.05 , $P = 0.036$), 15 Gy (1.81 ± 0.02 , $P < 0.001$) and 30 Gy (1.73 ± 0.08 , $P = 0.021$).

Furthermore, IR is usually linked to oxidative stress mechanism activation with ROS production. To clarify this, we also evaluated redox environment. As shown in Fig. 2a, all cell lines showed an increase in H₂O₂ levels with increasing doses of IR. In A549 cells, we observed significantly increased levels of H₂O₂ after exposure to all doses, especially for higher doses [30 Gy (1.64 ± 0.02 , $P < 0.001$) and 60 Gy (1.69 ± 0.06 , $P = 0.001$)]. Moreover, in H69 cells, we observed a significant increase in H₂O₂ levels after exposure to higher doses [60 Gy (1.44 ± 0.03 , $P < 0.001$)]. In H1299 cells, we also observed a significant increase in H₂O₂ levels after exposure to higher doses [60 Gy (1.68 ± 0.01 , $P < 0.001$)].

We observed an increased O₂⁻ production dependent on IR dose (Fig. 2b) for all cell lines. In H69 cells, we observed significant increased levels for 30 Gy (1.26 ± 0.04 , $P = 0.010$) and 60 Gy (1.06 ± 0.02 , $P = 0.039$). Moreover, in A549 cells, we observed a significant increase in O₂⁻ levels after exposure to higher doses, namely 60 Gy (1.30 ± 0.06 , $P = 0.013$). In H1299, we observed a significant increased O₂⁻ production after exposure to higher doses [60 Gy (2.08 ± 0.05 , $P < 0.001$)].

Additionally, when cells were exposed to IR, GSH levels (Fig. 2c) were not altered significantly.

Ionizing radiation induces cell cycle arrest

Influence of IR in cell cycle progression was evaluated by FC. Figure 3 shows that IR induces CC arrest in H69 cells

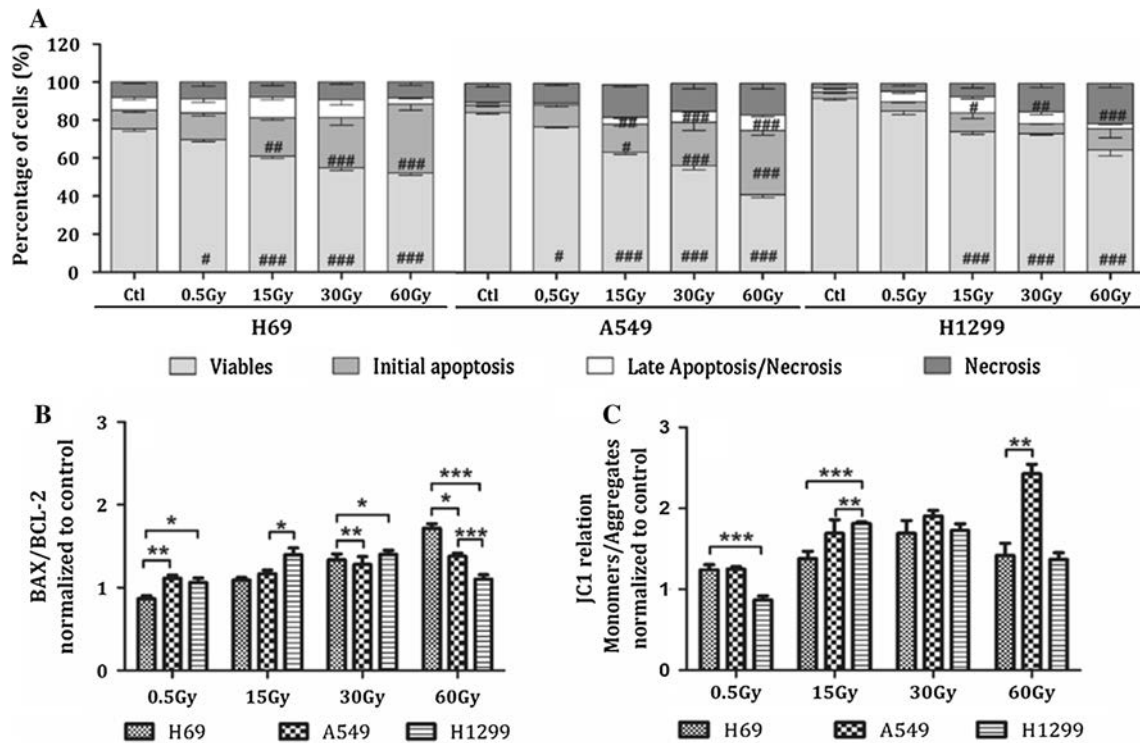


Fig. 1 Evaluation of cell death molecular mechanisms. H69, A549 and H1299 cells were exposed to IR (0.5–60 Gy), and flow cytometry was performed after 48 h of incubation. **a** Cell death and viability were assessed using annexin V (AnV)/propidium iodide (PI) double staining. Data are expressed as percentage (%) of viable cells, early apoptotic cells, late apoptotic/necrotic cells and necrotic cells compared with control. Statistical significance: #*P* < 0.05; ##*P* < 0.01; ###*P* < 0.001. **b** BAX and BCL-2 protein levels were analyzed using monoclonal antibodies. Results are expressed as the ratio between medium fluorescence intensity of BAX and BCL-2

normalized to control. Statistical significance of comparisons between cell lines is marked as **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. **c** The mitochondrial membrane potential (MMP) was evaluated using JC-1 fluorescent probe. JC-1 coexists in monomeric or aggregate form depending on the mitochondrial membrane potential; an increase in the monomer (M)/aggregate (A) ratio indicates a decrease in the mitochondrial membrane potential. Results are expressed as the mean ± SD of at least four independent experiments (*n* = 4). Statistical significance of comparisons between cell lines is marked as **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0

in S phase for lower doses (*P* < 0.01) and G₂/M for higher doses (*P* < 0.001) compared with control. In A549 cells, CC arrest is mainly on S phase for lower doses (0.5 Gy, *P* < 0.001) and G₂/M for higher doses (*P* < 0.001) and on H1299 cells is dose dependent, being in G₀/G₁ in lower doses (*P* < 0.001) and in G₂/M in higher doses (*P* < 0.001) with statistical significance. For all cell lines, we observe a pre-G₀/G₁ peak consistent with apoptosis observed on cell death evaluation.

Ionizing radiation induces P53 expression

We evaluated P53 and pP53 protein expression by western blot. In H69 and H1299 cells (Fig. 4a), total P53 basal levels could not be detected, once they present null and mutated phenotype, respectively [20–22]. When exposed to IR, no significant differences were observed. However, in A549 cells, which are P53 wild-type cells [21, 23], we observed a tendency for increased P53 and pP53 protein

levels with increased doses of IR, but only with significance for 15 Gy on pP53 (*P* < 0.001) (Fig. 4b).

Discussion

Despite advances in surgical techniques and multimodality treatments, survival outcomes for LC patients have not improved significantly. IR is an important tool in cancer therapy [24]. IR could induce direct effects on biomolecules, mainly in DNA and membrane lipids. However, IR can also act by indirect effects triggered mainly by water radiolysis products.

We focused in indirect effects induced by IR. Our results demonstrated an increase in ROS production in LC cells after exposure to IR that could be originated by water radiolysis. However, ROS can be produced by other biomolecules and pathways. Produced ROS can cross nuclear membrane, induce DNA damage, lipid peroxidation and

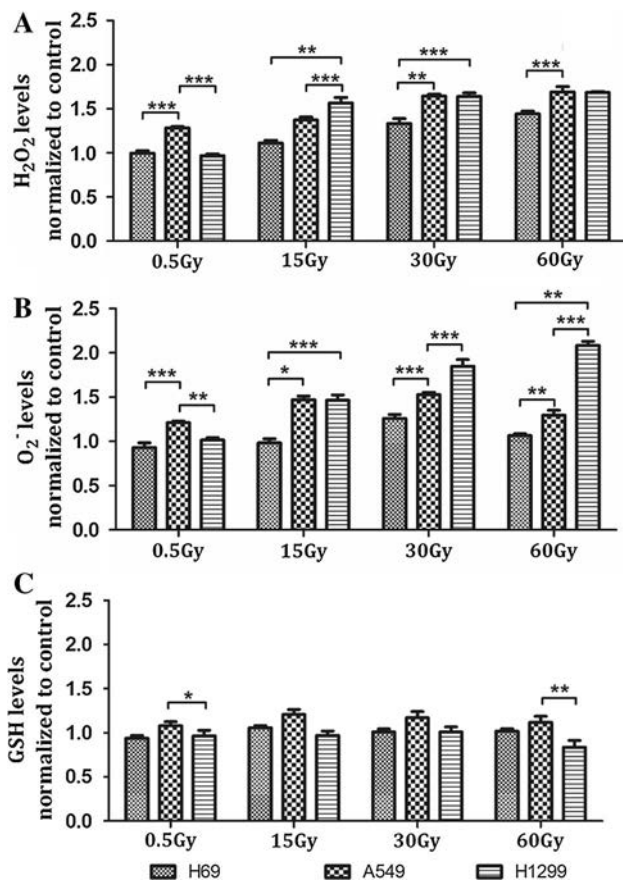


Fig. 2 ROS expression levels and antioxidant defense in H69, A549 and H1299 cells after IR exposure by flow cytometry. ROS levels **a** hydrogen peroxide (H_2O_2), **b** superoxide anion (O_2^-) and **c** free glutathione (GSH) were determined as described in “Material and methods” section. Results are shown in mean intensity of fluorescence (MIF) normalized to the control expressing mean \pm SD for each condition of at least four independent experiments ($n = 4$). Statistical significance of comparisons between cell lines is marked as $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$

protein oxidation and cause changes in calcium homeostasis and sulfhydryl groups [25, 26].

In H1299 cells, we observed that IR exposure increases ROS production which may be related to cell cycle arrest in G_2/M phase. These results may be also related to increased mitochondrial content previously referred [27]. Moreover, once mitochondria is involved in multiple processes activated by several mechanisms and is involved in cell death and in ROS production, MMP was evaluated [27]. Our results showed that IR induces cell death preferentially by apoptosis with increased BAX/BCL-2 ratio [9], suggesting that IR induces apoptosis by activating intrinsic (mitochondria) apoptotic signaling pathway. The different behavior after IR exposure in LC cell lines could also be explained by the fact that A549 cells express $P53^{wild}$ that induces cell cycle arrest to repair damage and also induces antioxidant activation pathways. Montero et al. showed

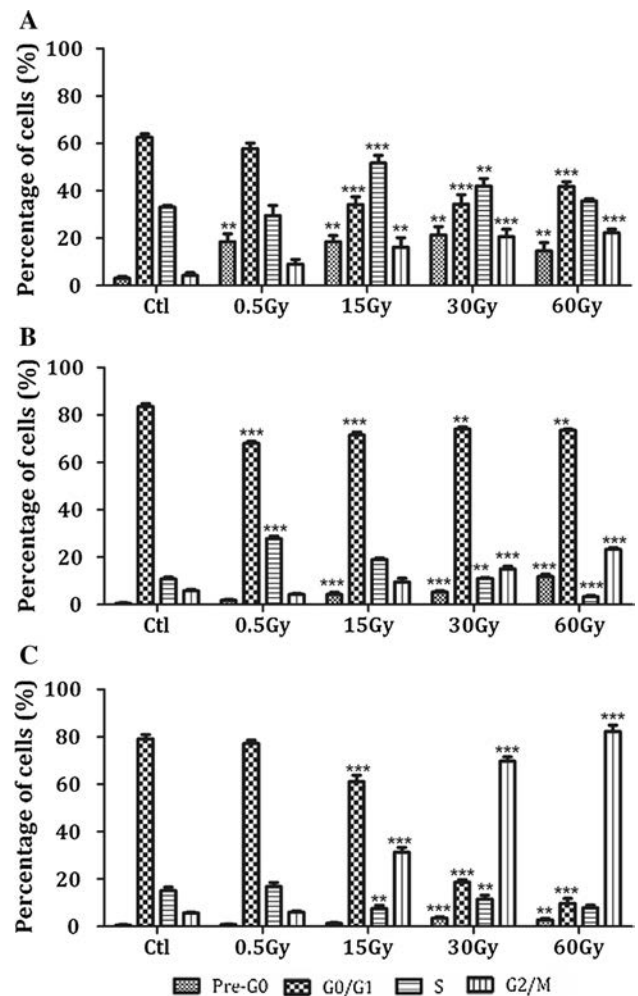


Fig. 3 Cell cycle evaluation. Cell cycle distribution of cell populations at different stages for **a** H69, **b** A549 and **c** H1299 cells, respectively, after 48 h of exposure to IR (0.5–60 Gy) by flow cytometry. Results are expressed as mean \pm SD of the percentage of cells in each phase condition for each of at least four independent experiments ($n = 4$). Significant differences from control are shown by $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$

that P53 can also control non-apoptotic cell death as loss of function of pro-apoptotic proteins does not prevent cell death induced by ROS while P53 loss does. Moreover, P53 mutations are selected by cancer cells to provide their resistance to apoptosis and necrosis, and explain resistance to chemo and radiotherapy even when leading non-apoptotic mechanisms [28]. After IR, injured cells could be delayed or even arrest CC progression. This arrest can occur in different phases of CC [27]. Other studies described that $TP53$ deficiency may provide nuclear accumulation and cells that lose its expression can be detected as aneuploid as a result of increased proliferation. This is associated with increased cell proportion in S phase and increased expression of related proteins such as cyclins [29]. Cells $P53^{wild}$ should respond to stress by halting at G_1

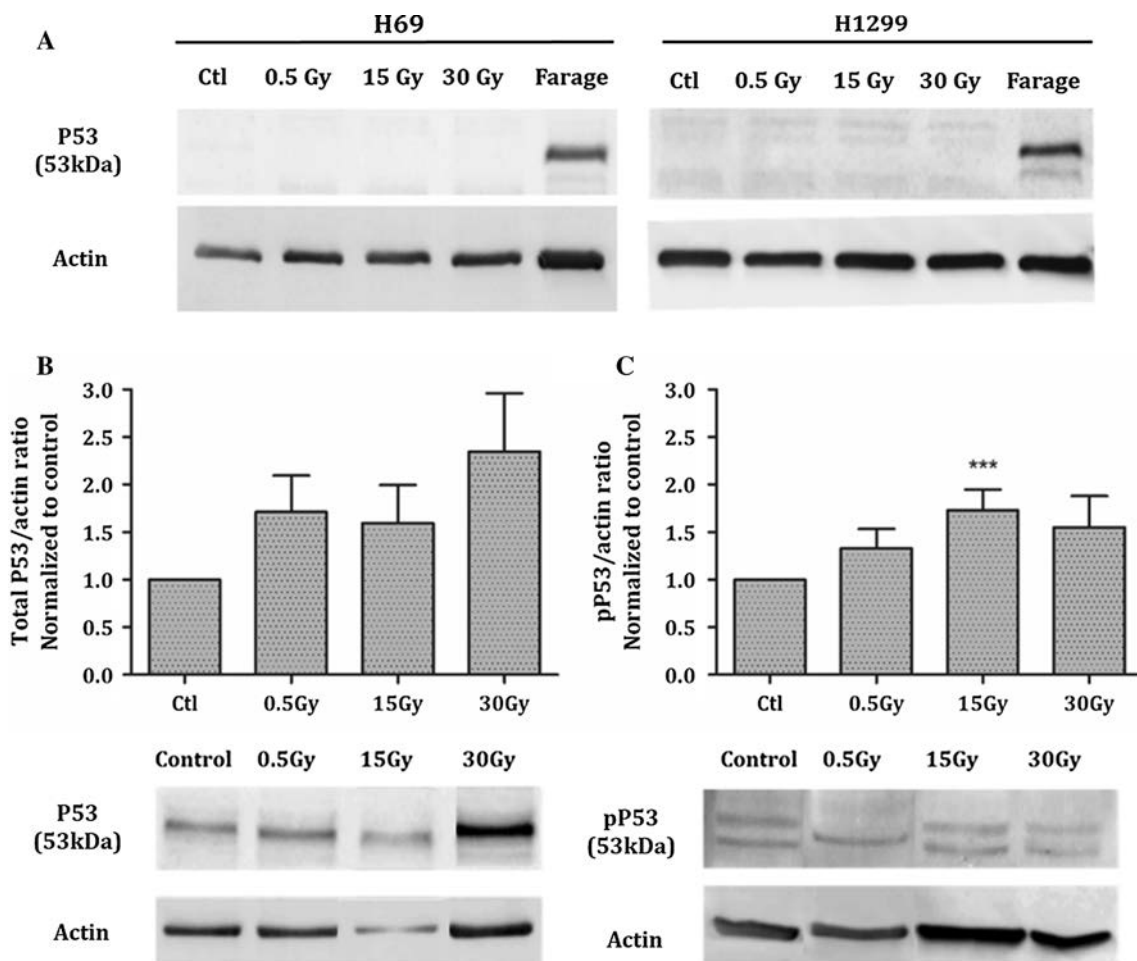


Fig. 4 Expression of P53 protein after IR exposure (0.5–30 Gy). **a** Evaluation of total P53 protein in H69 cells and H1299 cells. **b** Expression of total P53 protein and phosphorylated P53 protein in A549 cells. Data are presented as the ratio of P53 and actin

fluorescence intensities, normalized to control. The results are expressed as the mean ± SD for four independent experiments ($n = 4$). Significant differences from control are marked *** corresponding $P < 0.001$

checkpoint. Conversely, P53-deficient cells should rely exclusively on other pathways, like checkpoint kinase (Chk)1/2-mediated pathways, for CC arrest in response to stress [30]. Some cell cycle checkpoints require P53 protein for its activation. This could explain why some cell death pathways and cell cycle arrest may not be activated as a result of IR [31]. A549 cells (P53^{wild}) [21] and majority of cells are blocked at G0/G₁ phase, regardless of IR dose with significant increasing in pP53 expression. H1299 cells showed a higher percentage of necrosis compared with A549 and H69 cells which had a higher percentage of initial apoptosis. This could be explained by the absence of P53 in H1299 cells [21, 32] which leads to unregulated CC progression from G0/G₁ to S phase, with the eventual accumulation of mutations. Once achieved mitosis phases, accumulated errors induce mitotic catastrophe. H1299 cells showed arrest on G₂/M phase, characteristic of the absence of P53 and increased ROS [33,

34]. H69 cell line presents a transversion in exon 5 of *TP53* and consequently presents a reduced P53 expression [16, 35]. H1299 presents a partial deletion of *TP53* gene and does not express P53. Mutant P53 may be more metabolically stable than normal protein, allowing its accumulation [36, 37].

Resistance to apoptosis by tumor cells may be acquired by several mechanisms, one of most common mutations in *TP53* [36, 37]. This mutation features for interruption of P53 functions promoting defects in CC checkpoint, cell immortalization, genomic instability and inappropriate survival, allowing continuous proliferation and development of damaged cells [38]. P53 activation is well known to regulate apoptotic cell death, after exposure to cellular insults, including DNA damage, oncogene activation or hypoxia [28, 34, 39]. After DNA injury, P53 is activated, promoting CC arrest, transactivation of repairing enzymes and, if damage cannot be repaired, apoptosis. Thus, P53

promotes growth advantage and ensures survival in cancer cells by inhibiting apoptotic response [28, 36, 37, 40, 41].

In summary, our results showed that IR induces activation of multiple intracellular mechanisms dependent on P53 function in LC cell lines in study. As a result of this, IR induces cell death mainly by apoptosis in H69 and A549, which is dose dependent and dependent on mitochondrial pathway activation and ROS production. However, in H1299 cells, P53^{Null}, we observed an increased cell death by necrosis in a dose-dependent manner. Exposure to IR occurs due to involvement of several molecules, which are responsible for activation of different pathways and cellular radioresistance. A better understanding of pathways regulated by these molecules could contribute to target them and provide a new insight for lung cancer treatment.

Acknowledgments The authors would like to thank the Portuguese Foundation for Science and Technology for the award Portugal (Strategic Project PEst-C/SAU/UI3282/2013 and UID/NEU/04539/2013), COMPETE-FEDER.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest None.

References

- Dela CS, Cruz LT, Tanoue RA. Matthey, Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med*. 2011;32:605–44. doi:10.1016/j.ccm.2011.09.001.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65:87–108. doi:10.3322/caac.21262.
- Mendes F, Antunes C, Abrantes AM, Gonçalves A, Nobre-Gois I, Sarmiento-Ribeiro AB, et al. Lung cancer: the immune system and radiation. *Br J Biomed Sci*. 2015;72:78–84.
- Rosell R, Karachaliou N. Lung cancer in 2014: optimizing lung cancer treatment approaches. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;12(2014):75–6. doi:10.1038/nrclinonc.2014.225.
- Verma V. Lung cancer: implementing lung-cancer screening-oncological “grey areas”. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12:256–7. doi:10.1038/nrclinonc.2015.65.
- Muaddi H, Chowdhury S, Vellanki R, Zamiara P, Koritzinsky M. Contributions of AMPK and p53 dependent signaling to radiation response in the presence of metformin. *Radiother Oncol*. 2013;108:446–50. doi:10.1016/j.radonc.2013.06.014.
- Bieging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:359–70. doi:10.1038/nrc3711.
- Lee YS, Oh J-HH, Yoon S, Kwon M-SS, Song C-WW, Kim K-HH, et al. Differential gene expression profiles of radioresistant non-small-cell lung cancer cell lines established by fractionated irradiation: tumor protein p53-inducible protein 3 confers sensitivity to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010;77:858–66. doi:10.1016/j.ijrobp.2009.12.076.
- Stuschke M, Sak A, Wurm R, Sinn B, Wolf G, Stüben G, et al. Radiation-induced apoptosis in human non-small-cell lung cancer cell lines is secondary to cell-cycle progression beyond the G2-phase checkpoint. *Int J Radiat Biol*. 2002;78:807–19. doi:10.1080/0955300021014890.
- Andreo P, Burns DT, Hohlfield S, Huq MS, Kanai T, Laitano F, et al. Absorbed dose determination in external beam radiotherapy: an international code of practice for dosimetry based on standards of absorbed dose to water. Vienna: IAEA; 2011.
- Gibbons JP. Monitor unit calculations for external photon and electron beams. In: AAPM annual meeting refresher course, Salt Lake City; 2001. p. 1–10.
- Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1:2315–9. doi:10.1038/nprot.2006.339.
- Abrantes AM, Serra MES, Gonçalves AC, Rio J, Oliveiros B, Laranjo M, et al. Hypoxia-induced redox alterations and their correlation with 99mTc-MIBI and 99mTc-HL-91 uptake in colon cancer cells. *Nucl Med Biol*. 2010;37:125–32. doi:10.1016/j.nucmedbio.2009.11.001.
- Mamede AC, Pires AS, Abrantes AM, Tavares SD, Gonçalves AC, Casalta-Lopes JE, et al. Cytotoxicity of ascorbic acid in a human colorectal adenocarcinoma cell line (WiDr): in vitro and in vivo studies. *Nutr Cancer*. 2012;64:1049–57. doi:10.1080/01635581.2012.713539.
- Serra AC, RochaGonsalves AMDA, Laranjo M, Abrantes AM, Gonçalves AC, Sarmiento-Ribeiro AB, et al. Synthesis of new 2-galactosylthiazolidine-4-carboxylic acid amides. Antitumor evaluation against melanoma and breast cancer cells. *Eur J Med Chem*. 2012;53:398–402. doi:10.1016/j.ejmech.2012.04.003.
- Sales TLF. Efeitos da radiação ionizante em linhas celulares de cancro do pulmão de não pequenas células: estudos in vitro. Coimbra: University of Coimbra; 2014.
- Gonçalves AC, Alves V, Silva T, Carvalho C, De Oliveira CR, Sarmiento-Ribeiro AB. Oxidative stress mediates apoptotic effects of ascorbate and dehydroascorbate in human Myelodysplasia cells in vitro. *Toxicol Vitro*. 2013;27:1542–9. doi:10.1016/j.tiv.2013.03.009.
- Almeida S, Sarmiento-ribeiro AB, Januário C, Rego AC, Oliveira CR. Evidence of apoptosis and mitochondrial abnormalities in peripheral blood cells of Huntington’ s disease patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374:599–603. doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.009.
- Santos K, Laranjo M, Abrantes AM, Brito AF, Gonçalves C, Sarmiento Ribeiro AB, et al. Targeting triple-negative breast cancer cells with 6,7-bis(hydroxymethyl)-1H,3H-pyrrolo[1,2-c]thiazoles. *Eur J Med Chem*. 2014;79:273–81. doi:10.1016/j.ejmech.2014.04.008.
- Han JY, Chung YJ, Park SW, Kim JS, Rhyu MG, Kim HK, et al. The relationship between cisplatin-induced apoptosis and p53, bcl-2 and bax expression in human lung cancer cells. *Korean J Intern Med*. 1999;14:42–52.
- Lien J-C, Huang C-C, Lu T-J, Tseng C-H, Sung P-J, Lee H-Z, et al. Naphthoquinone derivative PPE8 induces endoplasmic reticulum stress in p53 null H1299 cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:453679. doi:10.1155/2015/453679.
- Würtzen PA, Pedersen LO, Poulsen HS, Claesson MH. Specific killing of P53 mutated tumor cell lines by a cross-reactive human HLA-A2-restricted P53-specific CTL line. *Int J Cancer*. 2001;93:855–61.
- Balça-Silva J, Neves SS, Gonçalves AC, Abrantes AM, Casalta-Lopes J, Botelho MF, et al. Effect of miR-34b overexpression on the radiosensitivity of non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Res*. 2012;32:1603–10.
- Chen X, Liao C, Chu Q, Zhou G, Lin X, Li X, et al. Dissecting the molecular mechanism of ionizing radiation-induced tissue damage in the feather follicle. *PLoS ONE*. 2014;9:e89234. doi:10.1371/journal.pone.0089234.

25. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160:1–40. doi:[10.1016/j.cbi.2005.12.009](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009).
26. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279:L1005–28. doi:[10.1164/rccm.2206007](https://doi.org/10.1164/rccm.2206007).
27. Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, Wada Y, Nakamura Y, Nakamura H, et al. Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic Biol Med.* 2012;53:260–70. doi:[10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033).
28. Montero J, Dutta C, van Bodegom D, Weinstock D, Letai A. p53 regulates a non-apoptotic death induced by ROS. *Cell Death Differ.* 2013;20:1465–74. doi:[10.1038/cdd.2013.52](https://doi.org/10.1038/cdd.2013.52).
29. Lao-Sirieix P, Brais R, Lovat L, Coleman N, Fitzgerald RC. Cell cycle phase abnormalities do not account for disordered proliferation in Barrett's carcinogenesis. *Neoplasia.* 2004;6:751–60. doi:[10.1593/neo.04280](https://doi.org/10.1593/neo.04280).
30. Gadhikar MA, Sciuto MR, Alves MVO, Pickering CR, Osman AA, Neskey DM, et al. Chk1/2 inhibition overcomes the cisplatin resistance of head and neck cancer cells secondary to the loss of functional p53. *Mol Cancer Ther.* 2013;12:1860–73. doi:[10.1158/1535-7163.MCT-13-0157](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0157).
31. Yang L, Zhou Y, Li Y, Zhou J, Wu Y, Cui Y, et al. Mutations of p53 and KRAS activate NF- κ B to promote chemoresistance and tumorigenesis via dysregulation of cell cycle and suppression of apoptosis in lung cancer cells. *Cancer Lett.* 2014; doi:[10.1016/j.canlet.2014.12.003](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.003).
32. Holbrook LAC, Butler RA, Cashon RE, Van Beneden RJ. Soft-shell clam (*Mya arenaria*) p53: a structural and functional comparison to human p53. *Gene.* 2009;433:81–7. doi:[10.1016/j.gene.2008.11.029](https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.11.029).
33. She QB, Bode AM, Ma WY, Chen NY, Dong Z. Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res.* 2001;61:1604–10.
34. Wu GS. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 2004;3:156–61.
35. Hennes S, Davey MW, Harvie RM, Davey RA. Fractionated irradiation of H69 small-cell lung cancer cells causes stable radiation and drug resistance with increased MRP1, MRP2, and topoisomerase IIalpha expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002;54:895–902. doi:[10.1016/S0360-3016\(02\)03037-7](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(02)03037-7).
36. Frutuoso C, Silva M, Amaral N. Valor prognóstico das proteínas p53, C-erB-2 E Ki67 no carcinoma do ovário. *Acta Med Port.* 2001;14:277–83.
37. Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. Is there a biological plausibility for p53 codon 72 polymorphism influence on cervical cancer development? *Acta Med Port.* 2011;24:127–34.
38. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene.* 2003;22:9030–40. doi:[10.1038/sj.onc.1207116](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207116).
39. She Q, Bode AM, Ma W. Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. 2001;1604–1610.
40. Duarte RLD, Paschoal MEM. Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. *J Bras Pneumol.* 2006;32:56–65. doi:[10.1590/S1806-37132006000100012](https://doi.org/10.1590/S1806-37132006000100012).
41. Abrantes A. Hipóxia Tumoral - Metabonômica e Imagem, Estudo Experimental. Coimbra: University of Coimbra; 2013.

Molecular Targets in Lung Cancer Therapy: A Current Review

Luís Pinho^{1#}, Fernando Mendes^{2-4#}, Maria Manuela Rodrigues⁵, Jéssica Estrela², Ricardo Jorge Teixo³ and Rui Santos Cruz^{1*}

¹Polytechnic Institute of Coimbra, ESTESC-Coimbra Health School, Department of Pharmacy, Coimbra Portugal

²Polytechnic Institute of Coimbra, ESTESC-Coimbra Health School, Department of Biomedical Laboratory Sciences, Coimbra, Portugal

³Biophysics Unit-IBILI, Faculty of Medicine of University of Coimbra, Portugal

⁴Center of Investigation in Environment, Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Faculty of Medicine of University of Coimbra, Portugal

⁵Farmacy, Coimbra University Hospital, Coimbra, Portugal

[#]Both authors had the same contribution for this paper

Abstract

Lung cancer presents a heterogeneous nature, which became more and more evident. Generally this type of cancer in an advanced state has a poor prognosis. The discovery of multiple molecular mechanisms, associated to the development, proliferation and prognosis of lung cancer has created new opportunities for a targeted therapy, improving clinical results. Non-small cells lung cancer is characterized by mutations on Epidermal Growth Factor Receptor and/or in the signaling pathways related to this receptor, which promoted the development of selective monoclonal antibodies and Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors, blocking the proliferation, differentiation, angiogenesis and tumor survival.

Thus, our review highlighted the importance of a continuous research of new molecular targets in lung cancer to achieve better therapeutic outcomes and overall survival rates.

Keywords: Directed therapy; Personalized therapy; Molecular targets and Lung cancer

Introduction

Cancer incidence worldwide has been increasing over the years [1]. Lung cancer (LC) is a disease with a poor prognosis once diagnosed. LC is the leading cause of death in men worldwide and the second cause of mortality in women [2-4]. In Portugal, LC remains as the leading cause of death due cancer in men [5].

LC origins from oncogenic alterations in tissues from the respiratory epithelium, namely in bronchi, bronchioles and alveoli [6]. This cancer results from multiple morphological, molecular and genetic changes, leading to an accumulation of malignant cells [7-9]. LC is mainly classified into two categories, according to its histological characteristics: non-small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC). NSCLC is categorized into three different categories, namely adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell carcinoma. NSCLC is the most common LC type (about 80% of total cases) and adenocarcinoma is the most common subtype (about 40%). Moreover, bronchioloalveolar carcinoma subtype is more associated with women and non-smokers. In contrast, squamous cell carcinoma is linked to tobacco consumption [2,10-12]. On the other hand, SCLC tends to affect the neuroendocrine system and is related to smoking habit, being diagnosed in only 1% of non-smokers patients [2].

Classification and staging of LC are critical for definitive diagnosis, treatment strategy and to predict the patient's outcome [2]. Treatment choice depends on a number of factors that are relate to the patient and the tumour, including histology, tumour stage and biology and the general health of the patient [13,14]. LC treatment is based on a set of procedures such as surgery, chemotherapy and radiotherapy [15]. Chemotherapy is widely used in cancer treatment, however, is rarely effective in this type of cancer due to the low amount of drug available in the lung tissue, even if administered in high doses [16].

Recently, it has been investigated a large number of molecular changes such as mutations and gene amplification [17] that could be responsible for tumour survival and directly affect prognosis. Treatments based upon these changes are called targeted or

personalized therapies. These treatment protocols aim to target common molecular changes and may increase the survival rate in non-surgical stages [18,19]. Specific therapy can be used to identify patients at risk for disease, regarding their genomic profile, and provide the appropriate drug with administration of a specific dose at the right time [20]. Thus, there are some mediators which may play a predominant role in the treatment of LC, such as Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), [21], Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK), among others [18].

Thus, this study aims to highlight the importance of targeting therapies in lung cancer treatment.

Materials and Methods

This study consists in a review of the literature concerning targeted therapies focused at molecular targets in lung cancer.

The survey of information was carried out in online databases, namely PubMed and Medline database. In this research it was used the keywords: "personalized treatment" and "lung cancer".

An initial trial of papers of interest was performed by the relevance of the title and content of abstract. Pre-selected articles were completely analysed and properly selected. Selection was performed based on the inclusion criteria: papers in English or Portuguese; review articles or original research papers available in free full text. Exclusion criteria were established as unavailability of selected papers in free full text and papers published before 2005.

***Corresponding author:** Rui Santos Cruz, Rua 5 de Outubro, São Martinho do Bispo, 3046-854 Coimbra, Portugal, Tel: +351917060167; E-mail: ruic@estescoimbra.pt

Received September 21, 2015; **Accepted** October 05, 2015; **Published** October 15, 2015

Citation: Pinho L, Mendes F, Rodrigues MM, Estrela J, Teixo RJ, et al. (2015) Molecular Targets in Lung Cancer Therapy: A Current Review. J Integr Oncol 4: 148. doi:10.4172/2329-6771.1000148

Copyright: © 2015 Pinho L, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

In addition to this, it was also used some information contained in technical books. Finally, all ethical questions have been fulfilled, and all the sources that provided the theoretical support have been properly referenced.

Results

Our survey highlighted the importance of the exploration of specific genetic alterations described in lung cancer cells. Several studies had already described the role of molecular targets such as EGFR and ALK in the development and progression of lung cancer, namely in the cases of NSCLC. However there are other oncogenic alterations in genes that have been identified in NSCLC that we reported in this review as follows, namely VEGF, BRAS, KAS and MET [22].

Epidermal growth factor receptor (Egfr)

EGFR is a transmembrane glycoprotein that plays an important role in carcinogenesis [18]. This receptor is also a critical component of signalling pathway activation, including Ras-Raf-MEK and PI3K-Akt-mTOR pathways [23-25]. EGFR is a member of the tyrosine kinase family and therefore have a response of about 70% to tyrosine kinase inhibitors (TKI) [22].

In NSCLC, EGFR dysregulation has been shown and it could be due to different mechanisms, including overexpression and gene amplification. This receptor has a higher expression in the case of non-smokers and women [26].

EGFR-TKI are a class of drugs well tolerated. However, this class of drugs can induce low to moderate cytotoxic effects at dermatological and gastrointestinal systems [27,28]. Currently, most widely used EGFR-TKI are Gefitinib [29] and Erlotinib. Both are able to inhibiting the catalytic activity of the receptor and thereby inhibiting its auto phosphorylation. This way signal transduction pathway could be inhibited and thus it can induce an anti-tumour effect [18,30]. In a study conducted in Asia and Europe, both drugs showed a very similar activity spectrum, with differences in pharmacokinetics and bioavailability, where Erlotinib showed a higher bioavailability [27].

Another strategy to inhibit the activity of EGFR is the use of monoclonal antibodies, such as cetuximab, panitumumab and others that block ligand binding to the receptor [31]. This type of treatment does not inhibit auto phosphorylation of the tyrosine kinase domain through constitutive activation. Therefore, these mutations can still activate other pathways that regulate cell cycle progression, cell growth and angiogenesis [32,33].

Vascular endothelial growth factor receptor (Vegfr)

VEGF is a major mediator of angiogenesis and it has been found to be overexpressed in several tumours in advanced stages. Higher levels of VEGF has been described in squamous cell carcinoma adenocarcinoma [34]. VEGF family is composed of different proteins denominated VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D and placental growth factor (PIGF) [18]. VEGF-A is the most important member, since it is primarily responsible for physiological and pathological mechanisms of angiogenesis. It normally acts by binding to VEGFR-2, causing a signalling cascade. This cascade leads to the activation of transcription factors in the nucleus and, consequently, the formation of new vessels [35].

In tumour cells, this pathway is involved in the induction of tumour cells self-survival and proliferation, as well as formation of new vessels in solid tumours which is essential for the nutrition of tumour cells and its survival [26].

VEGF function can increase mitosis rate of endothelial cells, control vascular permeability and consequently the survival of the vascular endothelium, mechanisms that are activated by the binding of VEGF to its receptors (VEGFR-1, VEGFR-2 and VEGFR-3) [18,26].

VEGF, by its crucial role in carcinogenesis and tumour progression, is an important molecular target for the development of cancer targeted therapies. Bevacizumab is a monoclonal antibody that binds to VEGF-A and is able to neutralize VEGFR isoforms. It was observed that treatment with Bevacizumab increases the risk of bleeding, especially into tumours located near the great vessels related to squamous cell carcinoma.

The dual inhibition of EGFR and VEGF is also a treatment option currently used and it could be performed under two strategies. The first one is the combination of two specific anti-targeted drugs such as Erlotinib and Bevacizumab, and the second one is the use of an agent with dual activity, Vandetanib, which is a small molecule with anti-VEGFR-2, -3 and anti-EGFR activity [18].

Anaplastic lymphoma kinase (Alk)

ALK is a member of tyrosine kinase receptors [36,37], namely insulin superfamily, which is normally expressed in the central nervous system, small intestine and testis [31,38].

EML4-ALK is a fusion protein which results from a short reversal in chromosome 2 and that comprises the intron 13 of EML4 and the intron 19 of ALK, generating an oncogenic fusion encoding a constitutively activated protein [32]. This protein has been found to be overexpressed in some patients with NSCLC. EML4-ALK is able to inhibit apoptosis, thereby favouring proliferation of tumour cells [39]. It is more common in younger patients, non-smokers or smokers with low concentration of accumulated tobacco and adenocarcinoma [18,40]. This translocation is usually linked to unique mutations in EGFR or KRAS and is also associated with resistance to treatment based in EGFR-TKI [31].

Crizotinib was approved for the treatment of patients with mutations in ALK and it was found that it induced a better outcome than common chemotherapy. However, a minority of patients with NSCLC, who had EML4-ALK mutation did not respond to treatment based on Crizotinib which was attributed to mutations related with ALK [41]. Ceritinib (inhibitor of ALK) was approved in April 2014 by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of patients with NSCLC with resistance to Crizotinib [42].

Braf: BRAF gene encodes a protein (serine/threonine kinase) which has a very important role at KRAS signalling pathway. BRAF is related to activation of important cellular functions, including proliferation and cell survival [31,32]. B-RAF, is a RAF kinase which is one of three members of this family: A-RAF, B-RAF and RAF-1 (also known as c-RAF) [31]. Both KRAS and BRAF are intervenient of signalling cascade of EGFR family proteins.

Mutations in BRAF can be found in about 1-3% in LC cases, mainly in adenocarcinoma. These are unique mutations in EGFR and KRAS and tend to be associated to a poor response to treatment with EGFR-TKI [32].

Some specific inhibitors of BRAF have been approved by the FDA, such as Vemurafenib and Dabrafenib. This drugs act at specific mutations in BRAF-V600E, however only 40 to 50% of patients with BRAF mutation have this specific mutation in BRAF-V600E.

For patients with a mutation in BRAF (V600E-free), are still being developed targeted-therapies [43,44].

Kras: Ras proteins or P21 Ras belong to the superfamily guanosine-triphosphate where the three best-known members are KRAS, HRAS and NRAS [10].

KRAS is a GTPase usually located on cell membrane and it is activated by receptors of transmembrane growth factor such as EGFR, HER2, ALK, FGFR and MET [45]. Point mutations in some aminoacids could lead to a compromised GTPase activity. This could result in constitutive activation of downstream signalling cascades. These mutations are found in about 20 to 30% of lung cancer adenocarcinomas [46] and are usually present in conjunction with other mutations in other genes [47].

Usually KRAS is inactivated after GTP to GDP conversion, leading to regulation of cell proliferation and growth. Mutations in KRAS gene result in conversion of GTP to GDP, which induces uncontrolled growth and proliferation of tumour cells [42].

There is currently no effective targeted therapy approved for mutations in the KRAS gene due to loss of normal enzymatic function of Ras [48], which could represent an important area of research in the near future.

Mesenchymal epithelial transition factor (Met)

MET is a proto-oncogene located on chromosome 7q21, which encodes a transmembrane receptor tyrosine kinase, the hepatocyte growth factor receptor (HGFR) [31,49]. It can induce inhibition of EGFR protein and then may be a “kinase switch” to ensure cell survival [50].

An increase of MET expression means an acquired resistance to EGFR-TKI and about 20% of patients with resistance to EGFR-TKI treatment had shown an increased amplification of the MET [42,50,51].

There are already some MET inhibitors, such as Cabozatinib that have been approved by FDA for the treatment of specific cancers, but still no clinical evidence on the efficacy of Cabozatinib in patients with NSCLC [42].

Conclusion

In the last years, it has been made a significant improvement in the knowledge and perception of biological complexity of the tumour and its microenvironment. This improvement allowed starting a new era of targeted therapy for lung cancer treatment. These new therapeutic strategies based on the identification of specific molecular targets in cancer development and progression mechanisms aims to customize and drive these targets drugs with greater efficacy.

Genetic changes that occur on tumour cells allow oncogenic deregulation of tumour suppressor genes as well as overexpression or activation of genes that promote cancer growth. Structural changes in tyrosine kinase receptors lead to proliferation of tumour cells and thereby creating opportunities for personalized therapy.

Thus, therapy with, for example, EGFR-TKIs and ALK inhibitors, has provided a new treatment for patients diagnosed with lung adenocarcinoma. However, resistance to targeted therapy remains a major obstacle to satisfactory clinical results.

Nowadays, there is a great effort to identify new targets and drugs that can improve the actual therapeutic outcome in which concerns lung cancer treatment. However, this research is still in development,

where the great majority of the studies have not yet pass through clinical trials. Most of the targets that are being studied are not fully described and understood, which can lead to the development of several selective drugs for the same molecular target.

Thus, we believe that, in the future, a continuous effort to overcome resistance to targeted therapies already applied in the clinical practice would be of great importance in the advance of LC treatment. Moreover, it is also of crucial importance the continuous study of molecular pathways described as essential for tumour development and progression and the development of new targeted drugs designed to block these pathways.

This research, hopefully, will allow not only a better outcome but also the elimination of severe side effects such those observed in the common chemotherapeutic regimens and a significant increase in quality of life and long-term survival.

References

1. Teixeira SF, Guimarães Idos S, Madeira KP, Daltoé RD, Silva IV, et al. (2013) Metformin synergistically enhances antiproliferative effects of cisplatin and etoposide in NCI-H460 human lung cancer cells. *J Bras Pneumol* 39: 644-649.
2. Mendes F, Antunes C, Abrantes AM, Gonçalves AC, Nobre-Gois I, et al. (2015) Lung cancer: the immune system and radiation. *Br J Biomed Sci* 72: 78-84.
3. Travis WD (2011) Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 32: 669-692.
4. Shimizu K, Okita R, Nakata M (2013) Clinical significance of the tumor microenvironment in non-small cell lung cancer. *Ann Transl Med* 1: 8-10.
5. Hespanhol V, Parente B, Araújo A, J. Cunha, A. Fernandes, et al. (2014) Cancro do pulmão no norte de Portugal?: um estudo de base hospitalar. *Port J Pulmonol* 19: 245-251.
6. Longo DL, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson JL, et al. (2011) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, (18th edtn). McGraw-Hill.
7. Davidson MR, Gazdar AF, Clarke BE (2013) The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. *J Thorac Dis* 5 Suppl 5: S463-478.
8. Cagle PT, Allen TC, Dacic S, Beasley MB, Borczuk AC, et al. (2011) Revolution in lung cancer: new challenges for the surgical pathologist. *Arch Pathol Lab Med* 135: 110-116.
9. Andrews TD, Baird JW, Wallace WA, Harrison DJ (2011) Routinely obtained diagnostic material as a source of RNA for personalized medicine in lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 6: 884-888.
10. Raparia K, Villa C, DeCamp MM, Patel JD, Mehta MP (2013) Molecular profiling in non-small cell lung cancer: a step toward personalized medicine. *Arch Pathol Lab Med* 137: 481-491.
11. MacConaill LE1 (2012) Advancing personalized cancer medicine in lung cancer. *Arch Pathol Lab Med* 136: 1210-1216.
12. Yoshiyama K, Terazaki Y, Matsueda S, Shichijo S, Noguchi M, et al. (2012) Personalized peptide vaccination in patients with refractory non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 40: 1492-1500.
13. Mollberg N, Surati M, Demchuk C, Fathi R, Salama AK, et al. (2011) Mind-mapping for lung cancer: towards a personalized therapeutics approach. *Adv Ther* 28: 173-194.
14. Fortunato O, Boeri M, Verri C, Moro M, Sozzi G1 (2014) Therapeutic use of microRNAs in lung cancer. *Biomed Res Int* 2014: 756975.
15. Hammerschmidt S, Wirtz H (2009) Lung Cancer: Current Diagnosis and Treatment. *Dtsch Arztebl Int* 106: 809-821.
16. Long J, Cheang T, Zhuo S, Zeng RF, Dai QS, et al. (2014) Anticancer drug-loaded multifunctional nanoparticles to enhance the chemotherapeutic efficacy in lung cancer metastasis. *J Nanobiotechnology* 12: 1-11.
17. Tovar I, Expósito J, Jaén J, Alonso E, Martínez M, et al. (2014) Pattern of use of radiotherapy for lung cancer: a descriptive study. *BMC Cancer* 14: 697.
18. Parente Lamelas I, Abal Arca J, Fírvida Pérez JL (2012) Directed therapies in lung cancer: new hope? *Arch Bronconeumol* 48: 367-371.

19. Chung TW, Tan K, Chan H, Lai MD, Yen MC, et al. (2014) Induction of Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) Enzymatic Activity Contributes to Interferon-Gamma Induced Apoptosis and Death Receptor 5 Expression in Human Non-small Cell Lung Cancer Cells. *Asian Pacific J Cancer Prev* 15: 7995-8001.
20. SÅ,odkowska J, Rojo MG (2011) Digital pathology in personalized cancer therapy. *Folia Histochem Cytobiol* 49: 570-578.
21. Gold KA, Wistuba II, Kim ES (2012) New strategies in squamous cell carcinoma of the lung: identification of tumor drivers to personalize therapy. *Clin Cancer Res* 18: 3002-3007.
22. Roh MS (2014) Molecular Pathology of Lung Cancer: Current Status and Future Directions. *Korean Acad Tuberc Respir Dis* 3536: 49-54.
23. Villaruz LC, Socinski MA (2011) Personalized therapy for non-small cell lung cancer: which drug for which patient? *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 23: 281-290.
24. Qu Z, Song A, Feng W, Teng R, Gao J, et al. (2014) Grandinin down-regulates phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *Int J Clin Exp Pathol* 7: 5888-5894.
25. Liu R, Liu X, Zheng Y, Gu J, Xiong S, et al. (2014) MicroRNA-7 sensitizes non-small cell lung cancer cells to paclitaxel. *Oncol Lett* 8: 2193-2200.
26. West L, Vidwans SJ, Campbell NP, Shrager J, Simon GR, et al. (2012) A novel classification of lung cancer into molecular subtypes. *PLoS One* 7: e31906.
27. Antonicelli A, Cafarotti S, Indini A, Galli A, Russo A, et al. (2013) EGFR-targeted therapy for non-small cell lung cancer: focus on EGFR oncogenic mutation. *Int J Med Sci* 10: 320-330.
28. Asami K, Atagi S (2014) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for non-small cell lung cancer. *World J Clin Oncol* 5: 646-659.
29. Chen L, Chen R, Zhu Z, Zhang Y, Wen Z, et al. (2014) Predictive factors associated with gefitinib response in patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Chin J Cancer Res* 26: 466-470.
30. Varella-Garcia M (2010) Chromosomal and genomic changes in lung cancer. *Cell Adh Migr* 4: 100-106.
31. Planchard D (2013) Identification of driver mutations in lung cancer: first step in personalized cancer. *Target Oncol* 8: 3-14.
32. Cheng L, Alexander RE, Maclennan GT, Cummings OW, Montironi R, et al. (2012) Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Mod Pathol* 25: 347-369.
33. Chen J, Zheng X, Liu DY, Zhao Q, Wu YW, et al. (2014) Therapeutic effects and adverse drug reactions are affected by icotinib exposure and CYP2C19 and EGFR genotypes in Chinese non-small cell lung cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 15: 7195-7200.
34. Heuvers ME, Aerts JG, Cornelissen R, Groen H, Hoogsteden HC, et al. (2012) Patient-tailored modulation of the immune system may revolutionize future lung cancer treatment. *BMC Cancer* 12: 580.
35. de Mello RA, Costa BM, Reis RM, Hespagnol V (2012) Insights into angiogenesis in non-small cell lung cancer: molecular mechanisms, polymorphic genes, and targeted therapies. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 7: 118-131.
36. Hartel PH, Hartel J V, Fanburg-smith JC, Julie C, Gilmore RW, et al. (2013) Toward Personalized Medicine of Lung Cancer?: Response to Nontargeted Therapy in Invasive Pulmonary Adenocarcinoma as a Function of Tumor Cell Differentiation. *Int J Surg Pathol* 21: 224-228.
37. Symposium L (2013) Personalized medicine: Lung Cancer leads the way. *Indian J Cancer* 50: 2013-2015.
38. Shaw AT, Ou S-HI, Bang YJ, Ross Camidge, Benjamin J. Solomon, et al. (2014) Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 371:1963-1971.
39. Nishino Mizuki, Jagannathan JP, Krajewski KM, O'Regan, K, Hatabu, H, et al. (2012) Personalized Tumor Response Assessment in the Era of Molecular Medicine: Cancer-Specific and Therapy-Specific Response Criteria to Complement Pitfalls of RECIST. *AJR Am J Roentgenol* 198: 737-745.
40. Kobayashi K, Hagiwara K (2013) Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation and personalized therapy in advanced nonsmall cell lung cancer (NSCLC). *Target Oncol* 8: 27-33.
41. Moreira AL, Thornton RH (2012) Personalized Medicine for Non - Small-Cell Lung Cancer: Implications of Recent Advances in Tissue Acquisition for Molecular and Histologic Testing. *CLLC* 13: 334-339.
42. Haghgoo SM, Allameh A, Mortaz E, Garssen J, Folkerts G, et al. (2015) Pharmacogenomics and targeted therapy of cancer: Focusing on non-small cell lung cancer. *Eur J Pharmacol* 754: 82-91.
43. Okimoto RA, Bivona TG (2014) Recent advances in personalized lung cancer medicine. *Per Med* 11: 309-321.
44. Forde PM, Ettinger DS (2013) Targeted therapy for non-small-cell lung cancer: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther* 13: 745-758.
45. Dienstmann R, Martinez P, Felip E (2011) Personalizing therapy with targeted agents in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2: 165-177.
46. Cagle PT, Allen TC, Olsen RJ (2013) Lung cancer biomarkers: present status and future developments. *Arch Pathol Lab Med* 137: 1191-1198.
47. Girard N (2013) Other signalization targets. *Target Oncol* 8: 69-77.
48. Kerr KM (2012) Personalized medicine for lung cancer: new challenges for pathology. *Histopathology* 60: 531-546.
49. Kim HS, Mitsudomi T, Soo RA, Cho BC (2013) Personalized therapy on the horizon for squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 80: 249-255.
50. Dacic S (2011) Molecular diagnostics of lung carcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 135: 622-629.
51. Früh M (2011) The search for improved systemic therapy of non-small cell lung cancer--what are today's options? *Lung Cancer* 72: 265-270.

Citation: Pinho L, Mendes F, Rodrigues MM, Estrela J, Teixo RJ, et al. (2015) Molecular Targets in Lung Cancer Therapy: A Current Review. *J Integr Oncol* 4: 148. doi:10.4172/2329-6771.1000148

OMICS International: Publication Benefits & Features

Unique features:

- Increased global visibility of articles through worldwide distribution and indexing
- Showcasing recent research output in a timely and updated manner
- Special issues on the current trends of scientific research

Special features:

- 700 Open Access Journals
- 50,000 Editorial team
- Rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, EBSCO, Index Copernicus, Google Scholar etc.
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.omicsonline.org/submission>

Lung cancer: the immune system and radiation

F. MENDES*^{†‡}, C. ANTUNES[†], A. M. ABRANTES*[‡],
A. C. GONÇALVES^{‡§}, I. NOBRE-GOIS[#], A. B. SARMENTO^{‡§},
M. F. BOTELHO*[‡] and M. S. ROSA[¥]

*Biophysics Unit–IBILI, Faculty of Medicine, University of Coimbra; [†]Polytechnic Institute of Coimbra, ESTESC–Coimbra Health School; [‡]Center of Investigation in Environment, Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Faculty of Medicine;

[§]Applied Molecular Biology and Clinical University of Hematology, Faculty of Medicine, University of Coimbra; [#]Radiation Oncology Department, Hospital and University Center of Coimbra; and [¥]Immunology Institute, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

Accepted: 9 March 2015

Introduction

Lung cancer (LC) is a disease with a poor prognosis once diagnosed, making it a very aggressive cancer with high mortality. The latest global statistics (GLOBOCAN 2012), show that LC was the most often diagnosed cancer, with 1.82 million diagnosed cases (13% of all cancers) and 1.59 million deaths (19.4% of all cancers).^{1,2} It mostly affects males (68.4%), but in recent years the percentage has been declining, with the increase in females especially in developed countries.

Smoking is the most well-known risk factor, where we can find over 60 carcinogenic substances in cigarette smoke. Some 85–90% of LC cases involve a history of current or past smoking habit.^{3,4} The remaining 10–15% of non-smoker LC cases are a combination of genetic alterations caused by pollution, passive smoking and gene mutations in epidermal growth factor receptor (*EGFR*), human epidermal growth factor receptor 2 (*HER2*) and in the protein B-Raf (*BRAF*), usually more related to cases of LC in younger people.^{5,6} Exposure to specific substances can be an oncogenic factor, such as asbestos and radon gas.^{7,8} The fact that the majority of LC cases appear at older ages makes the patient's age a background factor.⁶

Classification and staging of LC are critical for definitive diagnosis, treatment strategy and to predict the patient's outcome. As 70% of patients are diagnosed in advanced stages, the pathologist has a crucial role in the classification of LC, for which the diagnosis is established by histopathology and molecular analysis of tissue biopsies. In general, LC can be divided into two main types: non-small-cell (NSCLC) and small-cell (SCLC) tumours.

The NSCLC type includes adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, and large cell carcinoma, each with its subtypes. They represent nearly 85% of LC cases and are

Correspondence to: Fernando José Figueiredo Agostinho D'Abreu Mendes
Biophysics Unit, Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences, Faculty of
Medicine, University of Coimbra, Polytechnic Institute of Coimbra, ESTESC-
Coimbra Health School, Azinhaga Santa Comba, Celas 3000-548, Coimbra, Portugal
Email: fjmendes@estescoimbra.pt

ABSTRACT

Lung cancer has a known relationship with smoking and is one of the leading causes of cancer-related death worldwide. Although the number of studies discussing lung cancer is vast, treatment efficacy is still suboptimal due to the wide range of factors that affect patient outcome. This review aims to collect information on lung cancer treatment, specially focused on radiation therapy. It also compiles information regarding the influence of radiotherapy on the immune system and its response to tumour cells. It evaluates how immune cells react after radiation exposure and the influence of their cytokines in the tumour microenvironment. The literature analysis points out that the immune system is a very promising field of investigation regarding prognosis, mostly because the stromal microenvironment in the tumour can provide some information about what can succeed in the future concerning treatment choices and perspectives. T cells (CD4⁺ and CD8⁺), interleukin-8, vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β seem to have a key role in the immune response after radiation exposure. The lack of large scale studies means there is no common consensus in the scientific community about the role of the immune system in lung cancer patients treated with radiotherapy. Clarification of the mechanism behind the immune response after radiation can lead to better treatments and better quality life for patients.

KEY WORDS: Carcinoma, non-small-cell lung.
Immune system.
Lung neoplasms.
Radiotherapy.
Small cell lung carcinoma.

typically unresponsive to treatment protocols.⁸ Adenocarcinoma is the most common type of LC (40%) and the bronchioloalveolar carcinoma subtype is more associated with women and non-smokers, in contrast to squamous cell carcinoma that is linked to tobacco consumption.⁹

On the other hand, SCLC tends to affect the neuroendocrine system and is related to smoking habit (only 1% of non-smokers). They are likely to have a good response to radiotherapy (RT) and chemotherapy but there is often extensive lymph node metastasis.^{10–14} The staging of LC is a way of assessing the extent of the disease, and has a major role in prognosis and treatment.¹²

Treatment

Therapy for LC depends on several factors such as cell type, extent of spread, and the person's performance status (PS). The main local treatments include surgery and RT, while at the systemic level there is chemotherapy. In the last years an

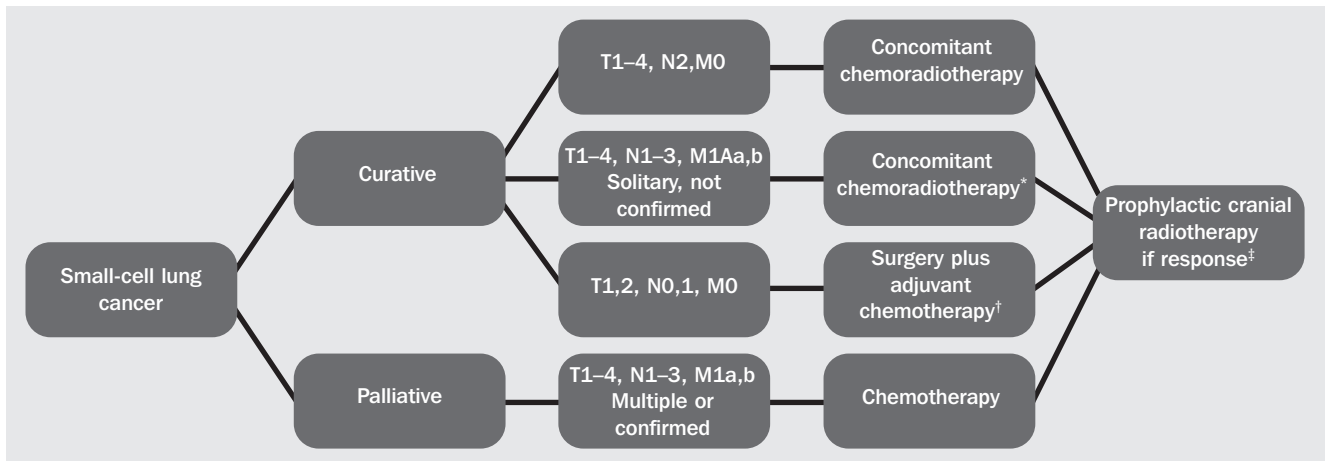


Fig. 1. Small-cell lung cancer treatment algorithm (Adapted from Ref 25).

*If no confirmation of solitary metastasis is obtained, radiotherapy may be added after first response evaluation and is omitted in case of obvious metastatic involvement; †concomitant chemotherapy as an alternative option; ‡or stable disease in case of localised disease.

increase of targeted based therapies has been noticed, in order to achieve tumour-specific structures at the molecular level.^{15–17} In most cases, treatment of LC encompasses a set of some of these therapies. Radiotherapy and chemotherapy may precede surgery (neoadjuvant therapy) or may follow it (adjuvant therapy).^{9,18–20}

Resection is the treatment of choice for patients with early diagnosed NSCLC (stage I or II) who are able to withstand surgery. Platinum-based adjuvant chemotherapy and targeted therapies are recommended for some patients (stage II) to assist the treatment and lower the risk of metastasis. Radiotherapy is not suggested in stage I or II LC, being used in the later stages when the tumour is unresectable. Patients with stage III LC have different treatment perspectives depending on which lymph node chains are affected by tumour spread (if any).

If the malignant cells have not spread to other lobes and the lymphatic system is only minimally affected (stage IIIA), treatment is similar to that for stage I/II disease but includes adjuvant chemotherapy. Otherwise, if there is involvement of lymph nodes and surgery is not recommended, platinum-based radio/chemotherapy should be applied. Patients with stage IIIB or IV disease have considerable involvement of lymph nodes with large tumour masses, and therapy is based on local RT with chemotherapy. Owing to the extent of such lesions, palliative treatment is offered in most cases.^{9,15,19,21,22}

Small-cell lung cancer is known to be aggressive with a tendency to grow and spread quickly; this explains why surgery is performed in very few cases, especially in stage I, followed by chemotherapy or radiotherapy, or both (Fig. 1). The patients with stage II or III disease usually are treated with a combination of platinum-based chemotherapy and radiotherapy if the patient is able to tolerate both at the same time. In stage IV SCLC, palliative platinum-based chemotherapy is indicated, if the patient's general condition allows.^{19,23,24} Targeted therapies have been well studied, with the subsequent release of drugs that block tumour vascularisation (angiogenesis) or interfere with the activity of growth factor receptors and molecular pathways triggered downstream.^{15–17}

Radiotherapy has an important role because it can provide quick symptom control, and usually the indications are the

pain due to chest mass, presence of bone metastases or neural compression, presence of haemoptysis, presence of cough and dyspnoea due to local obstruction of airways, signs of superior vena cava syndrome or spinal cord compression. If there are pathological bone fractures (or risk of bone fractures) the post-operative RT after stabilising should be considered.²¹

The use of RT has increased in the treatment of patients due to the improvement in high-precision RT equipment as well as the development of medical imaging, in particular the widespread use of three-dimensional imaging systems. It is possible to target the oncogenic lesion with high doses of radiation with great accuracy. As a consequence, better tumour control rates make RT an alternative to surgery for some tumour stages.²⁵

Radiotherapy: physical and biological basis

Applying radiation to a tumour is one of the most important therapies for LC, being a option at different tumour stages, although the goal is always to deliver a high dose to the whole tumour and produce as much cell destruction as possible while simultaneously reducing injury to surrounding normal tissue.^{14,18,26}

Radiation is delivered primarily with high-energy photons (gamma rays or X-rays) or charged particles (electrons or protons). The interaction of a photon beam with matter results in the attenuation of the beam. The photoelectric effect (Compton Effect) and pair production are the main forms of interaction between photons and the tissue. As a result, tissue electrons are ejected causing ionisation and excitation of atoms or molecules of the medium to which radiation is applied, in a cascade reaction. The exposure describes the amount of X-ray or gamma radiation that travels through a volume of air at 0°C, producing pairs of ions. The units for exposure are the Roentgen (R) and coulomb/kilogram (C/kg).²⁷

When ionising radiation interacts with the human body, it gives energy to the body tissues. The amount of energy absorbed per unit weight of the organ or tissue is called the absorbed dose (Gy). One Gy corresponds to the release of

the energy of one joule per kilogram of organ or tissue weight (1 Gy = 1J/kg).²⁷

Considering tissue irradiation with high-energy photons, there are diverse possibilities of interaction, resulting in various possible molecular lesions. Those effects are developed in three phases: physical, chemical and biological. Initially, a few milliseconds after interaction, the electrons from atoms of the involved tissue are ejected (ionisation) or they pass into a higher energy level (excitation). These ejected electrons can ionise or excite other nearby atoms or molecules, resulting in an ionisation cascade. Chemical reactions occur almost instantly both in a direct or indirect way. If the photon directly interacts with DNA, changes in the ability of the cell to divide can occur with eventual induction of cell death. However, as most of the cell is water the possibility of DNA damage is fairly low.

When radiation interacts with water, a process named water radiolysis occurs. In this process, an electron is extracted from the water molecule, initiating a chemical reaction that ends with the production of free radicals and ions that are highly reactive. These free radicals and ions produced form hydrogen peroxide (H₂O₂), which is responsible for approximately two-thirds of the destructive effect on the lesion. Among the free radicals produced, the hydroxyl radical (*HO) is especially aggressive to DNA, being responsible for 60–70% of the damage. After a short period, biological effects begin, with aggression and repair mechanism involvement. Enzymes begin to repair damaged DNA in order to restore stability. In some cases, however, they fail to repair some lesions and it is the accumulation of pathogenic mutations that lead, eventually, to cell death.^{9,28,29}

One characteristic of radiation effects is latency time, which means that the effects begin sometime after radiation exposure. This is why RT requires several sessions for its effects to be noticed. Also, due to the biological effects of radiation, adverse effects can be observed some weeks or months after irradiation caused by injuries to stem cells and cells of the surrounded normal tissues. Damage to the intestinal mucosa or haematopoietic cells are examples of lesions caused by radiation exposure during treatment.³⁰

Radiation treatments are usually given in several sessions per week in small doses, called fractions. The total dose is normally fractionated in small doses given five or six days

per week, over several weeks. After interactions by ionising photons, cells are redistributed into different phases of the cell cycle into to attempt repair of the damage caused. Solid tumours are frequently hypoxic, which reduces the sensitivity to radiation; however, if the radiation is given in fractions, tumour cells may have time to reoxygenate between sessions, increasing the sensitivity to RT of the residual tumour cells.⁶

Radiotherapy: dose and fractionation

Although LC is the most prevalent cancer among tumour types, there are no global official guidelines to apply radiation. This can be explained by the fact that the treatments are highly variable, depending on tumour characteristics, on the number and localisation of lymph nodes affected, and on the presence or absence of metastasis.^{9,31,32}

As previously mentioned there are two main histological types of LC, NSCLC and SCLC, for which treatment guidelines vary. Radiotherapy has a potential role in all stages of NSCLC, as either definitive or palliative therapy. The critical goals of modern RT are to maximise tumour control with minimal treatment toxicity,¹⁹ When applying RT, three-dimensional imaging techniques are recommended in order to avoid collateral damage to normal tissue.³³

Non-small-cell LC is the most common type, but only 15–20% of the cases are potentially curable, the majority of them at early stages. In these cases, radical RT also known as continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy (CHART) is recommended but the prognosis is still not very satisfying, with low five-year overall survival rates.

According to UK guidelines (2006) there are three main schedules of RT with curative intent: accelerated hypofractionated RT, conventional radiotherapy and CHART. In accelerated hypofractionated RT the dose of 52.5–55 Gy is delivered in 20 daily fractions over four weeks, with or without chemotherapy. In conventional radiotherapy a dose of 60–66 Gy is delivered in 2-Gy fractions over 6.5 weeks and run usually with chemotherapy. In the CHART option, more than one fraction is given each day, delivering 54 Gy in 36 fractions. Each fraction is applied three times per day over 12 days.¹⁹

Table 1. Conventionally fractionated and palliative RT for non-small-cell lung cancer treatment combinations.

Treatment type	Total dose	Fraction size	Treatment duration
Definitive RT with or without chemotherapy	60–74 Gy	2 Gy	6–7.5 weeks
Pre-operative RT	45–50 Gy	1.8–2 Gy	6–7.5 weeks
Post-operative RT			
Negative margins	50–54 Gy	1.8–2 Gy	5–6 weeks
Extracapsular nodal extension or microscopic positive margins	54–60 Gy	1.8–2 Gy	6 weeks
Gross residual tumor	60–70 Gy	2 Gy	6–7 weeks
Palliative RT			
Obstructive disease (superior vena cava syndrome or obstructive pneumonia)	30–45 Gy	3 Gy	2–3 weeks
Bone metastases with soft tissue mass	20–30 Gy	4–3 Gy	1–2 weeks
Bone metastases without soft tissue mass	8–30 Gy	8–3 Gy	1 day–2 weeks
Brain metastases	CNS GLs	CNS GLs	CNS GLs
Symptomatic chest disease in patients with poor PS	17 Gy	8.5 Gy	1–2 weeks
Any metastasis in patients with poor PS	8–20 Gy	8–4 Gy	1 day–1 week

CNS-GLs: Central nervous system – guidelines; PS: Performance status. Adapted from ref 22.

Radiotherapy for NSCLC is applied with palliative intent whenever specific conditions are present; for example, obstructive disease such as superior vena cava syndrome or an obstructive pneumonia, bone metastases with or without soft tissue masses, brain metastases, presence of symptomatic chest disease or any metastasis. For this approach the patients are divided in two main groups according to PS. For patients with NSCLC and poor PS, a dose of 10 Gy applied once is suggested. In patients with medium or good PS, a dose of 39 Gy distributed over 13 sessions with spinal cord protection, or 20 Gy in five fractions, is recommended.^{31,32,34–36}

Currently, and according to the National Comprehensive Cancer Network guidelines (2013), in early-stage NSCLC (stage I), stereotactic ablative RT (SABR), also known as stereotactic body RT (SBRT), is recommended for patients who have inoperable tumour or who refuse surgery. For locally advanced NSCLC (stage II-III) in patients with inoperable tumour, the standard of care is RT concurrent with chemotherapy. In advanced/metastatic NSCLC (stage IV), RT is recommended for local palliation or relief of symptoms such as pain, bleeding or obstruction. Definitive local therapy to isolated or metastatic sites (oligometastases) including but not limited to brain, lung and adrenal gland, achieves prolonged survival in a small number of well selected patients with good PS who have received radical therapy to the intrathoracic disease.¹⁹

Patients with node-negative early-stage disease, SABR is recommended.^{18,34} For centrally located tumours, defined as within 2 cm of the proximal bronchial tree, an adapted SABR regimens of 4–10 fractions appears to be effective and safe.^{18,19,37–40} Table 1 summarised the most commonly used doses and types of treatment combinations with RT for NSCLC.

Until recently, SCLC patients were grouped into limited SCLC and extensive SCLC depending on the area affected by the tumour. Currently, and according to ESMO clinical practice guidelines and National Comprehensive Cancer Network (version 2. 2013) guidelines, SCLC is classified under the tumour-node-metastasis (TNM) version 7 staging system.^{19,21} In this group, patients usually receive cycles of chemotherapy as a firstline treatment. Radiotherapy only has a role in SCLC when applied after, or simultaneously with, chemotherapy, depending on patient performance and acceptable response to chemotherapy.^{41,42} In these circumstances, RT is delivered as either 1.5 Gy twice daily up to a total dose of 45 Gy, or as fractions of 1.8–2.0 Gy once daily up to a total dose of 60–70 Gy.¹⁹ Cranial irradiation also has a prophylactic role, with a dose of 25 Gy given in 10 fractions, or 30 Gy in 10–15 fractions, in order to reduce the probability of brain metastasis (Fig 1).^{32,35,41–43}

Immune system and radiation

Living cells have different sensitivities to ionising radiation exposure, but, in general, actively reproducing cells are more radiosensitive. This behaviour reflects the Bergonie-Tribondeau Law which states that the radiosensitivity of a cell, tissue or organs increases with its reproductive capacity and decreases with its degree of differentiation. Oncogenic cells are constantly reproducing and are thus much more sensitive to radiation effects; however, blood cell precursors

Table 2. Tumour node metastasis classification.

TX	Positive cytology only
T1	≤3 cm
T1a	≤2 cm
T1b	>2–3 cm
T2	Main bronchus ≥2 cm from carina, invades visceral pleura, partial atelectasis
T2a	>3–5 cm
T2b	>5–7 cm
T3	>7 cm chest wall, diaphragm, pericardium, mediastinal pleura, main bronchus <2 cm from carina, total atelectasis, separate nodule(s) in the same lobe
T4	Mediastinum, heart, great vessels, carina, trachea, oesophagus, vertebra; separate tumour nodule(s) in a different ipsilateral lobe
N1	Ipsilateral peribronchial, ipsilateral hilar
N2	Subcarinal, ipsilateral mediastinal
N3	Contralateral mediastinal or hilar, scalene or supraclavicular
M1	Distant metastasis
M1a	Separate tumour nodule(s) in a contralateral lobe; pleural nodules or malignant pleural, or pericardial effusion
M1b	Distant metastasis

are also constantly reproducing and are eliminated as a collateral damage, what leads to leucopenia.^{32,44}

Lymphocytes are known to be vulnerable to radiation, due to induced apoptosis in mature T cells and B cells, lowering their levels in peripheral blood. This can also be detected in bone marrow where radiation damages precursors of monocytes and granulocytes as well as natural killer (NK) cells, compromising innate immunity.^{24,26,45}

Previous studies have shown that subpopulations of T lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺) tend to reduce in number after RT, and in such cases patients have a poor prognosis; if CD4⁺/CD8⁺ count is normal the five-year survival rate is better.^{26,28,46} The most plausible reason is that, in the immune response to cancer cells, the tumour-infiltrating CD8⁺ T cells have a crucial role, recognising TAA peptides. These peptides are associated with major histocompatibility complex class I molecules (MHC1), which can be expressed on the cancer cell surface and recognised by tumour-specific CD8⁺ T cells.^{24,26,45}

In NSCLC the presence of infiltrating CD8⁺ cells alone does not result in a better prognosis, as CD4⁺ T cells have a key role in this particular carcinoma. The synergistic effect of high number of CD4⁺ and CD8⁺ T cells infiltrating the cancer stroma illustrates cooperation between these two cell lines, as activation of CD4⁺ T cells is required for immunisation of CD8⁺ cells against the tumour cells. Cytokines such as interleukin-2 (IL-2) released by CD4⁺ T cells are important in growth and proliferation of CD8⁺ cells.^{26,46}

In RT there are sequences of reactions that follow after the injury to cells, which involve multiple immune mechanisms that can boost immune feedback against the tumour. The tumour tissue responds to ionising photons by the upregulation of acute-phase proteins such as tumour necrosis factor- α (TNF α), IL-1 and IL-6. MHC 1 and adhesion molecules such as intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1

(VCAM-1) or the E-selectin are also upregulated in endothelial cells and can assist in leucocyte passage across endothelial barriers near the tumour. Dead cells release ATP and high-mobility group protein 1 (HMGB1) to the extracellular space, increasing the inflammatory process. Subsequently, the inflammatory process recruits macrophages and dendritic cells to the tumour, which in turn will present antigens to T lymphocytes and stimulate T-cell responses, resulting in death of the previously damaged malignant cells.^{29,31}

During the inflammatory process caused by radiation, cytokines are released and have a key role in the physiopathology of LC. The tumour microenvironment has its own specific cytokine concentrations and these can influence the outcome of RT. The inflammation caused by radiation can change these concentrations, leading also to different treatment outcomes.^{31,36}

As mentioned by Crohns *et al.* IL-6, IL-8 and VEGF are elevated both locally and systemically in patients with LC of squamous cell type.³⁵ Interleukin-6 is a primary inflammation protein and is produced as an immune response by the tumour to radiation damage, and may be found mostly in sputum. Interleukin-8 and VEGF are strongly associated with patients who have a shorter survival time.^{34,47}

Macrophages can also have impact on prognosis in NSCLC, where their high tumour infiltration and high IL-8 production lead to poor prognosis. Interleukin-8 and VEGF are known to be potent promoters of angiogenesis, which in turn leads to faster tumour growth and lower average survival.^{37,48}

The microenvironment changes caused by ionising photon damage can boost the immunological response but the cytokines released can benefit the growth of the tumour. Further studies are needed to assess the prognostic value of these data.^{29,31,32} The main information obtained from the literature is compiled in Table 4.

Hald *et al.*⁴⁶ attempted to understand why RT can stimulate the immune cells and facilitate an antitumour immune response. They analysed several immune cell markers in 55 patients with NSCLC treated with RT after surgical resection. After construction of tissue microarrays (TMAs), the expression of the markers CD1a⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, CD56⁺, CD68⁺, CD117⁺, CD138⁺ were studied by immunohistochemistry in the tumour and stroma. This was the first published paper that studied these markers in

Table 3. Tumour stage grouping.

Occult carcinoma	TX	N0	M0
Stage 0	Tis	N0	M0
Stage IA	T1a,b	N0	M0
Stage IB	T2a	N0	M0
Stage IIA	T2b	N0	M0
	T1a,b	N1	M0
	T2a	N1	M0
Stage IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stage IIIA	T1a,b,T2a, b	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
	T4	N0,N1	M0
Stage IIIB	T4	N2	M0
	Any T	N3	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1

Adapted from Früh *et al.*, 'Small-Cell Lung Cancer (SCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up'.

stroma, and it showed that CD4⁺ and CD8⁺stroma co-expression can be a relevant prognostic factor.⁴⁶ Lower levels of CD4⁺/CD8⁺ co-expression lead to poor prognosis, and the benefit from RT is lower. However, the authors advised caution in the interpretation of the results as only a small population ($n=12$) presented with elevated CD4⁺/CD8⁺.

Crohns *et al.* designed a study to understand the role of several cytokines in LC. For this they collected bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and blood serum from 36 patients with NSCLC, and 36 controls at baseline.³⁵ Blood samples were collected during RT and again three months later, in patients and controls. They measured TNF α , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 and VEGF using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. The authors observed higher levels of IL-6 and IL-8 in patients than in controls, both in BAL and blood, and concluded that these two cytokines are upregulated in LC. After radiation the IL-6 increased in BAL, mostly because of oxidative stress caused by the radiation, resulting in inflammation. The authors also concluded that higher basal levels of IL-8 and VEGF determine a decrease in survival rates. These two

Table 4. Summary of studies used from literature review.

	Hald <i>et al.</i> (2013)	Crohns <i>et al.</i> (2010)	Wang <i>et al.</i> (2009)	Zhao <i>et al.</i> (2008)	Gridley <i>et al.</i> (2004)	Novakova-Jiresova <i>et al.</i> (2004)
Patients (n)	55	36	23	26	12	46
Stage	NSCLCI-IIIa	NSCLCI-IV	NSCLCI-IIIB	NSCLCI-III	NSCLCI-IIIa	NSCLCIIIA-IIIB
Chemotherapy (CHT)	None	14% received CHT	78% CHT	65% treated with carboplatin and taxol	None	Carboplatin
Radiotherapy (total dose and fractions)	≥ 50 Gy (various Fx regimes)	30–60 Gy (Fx not mentioned)	> 50 Gy (Fx: 25–27)	64–70.1 Gy (various Fx regimes)	51 Gy (Fx: 20)	60 Gy (Fx: 30)
Surgery	Surgical resection	Not mentioned	Inoperable	Inoperable	Inoperable	Unresectable
Median overall survival	24 months	9.9 months	Not mentioned	Not mentioned	Not Mentioned	Not mentioned
Immune cells or cytokines studied	T cell (CD4+ and CD8+)	IL-8 and VEGF	TGF β 1	TGF β 1	bFGF, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10	TGF β

molecules are related to angiogenesis and may play a role in assessing LC prognosis through serum and BAL testing.³⁵

Gridley *et al.* studied cytokine change during RT in 12 patients with inoperable NSCLC. Basic fibroblast growth factor (bFGF), TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10 and procollagen III peptide (P III P) were studied in serum.³⁸ Levels of these cytokines were analysed at baseline and 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 days after the beginning of RT. This study also compared patients treated with proton treatment alone with those who received combined photon and proton therapy. bFGF, TNF α , and IL-6 were significantly higher in patients receiving the combination RT mainly because tissue damage is greater. No other significant data were presented by the authors.³⁸

Transforming growth factor (TGF) is one the best studied cytokine in LC and has an important role in immunity. Some studies attempted to find a correlation between TGF β and radiation pneumonitis (RP), and found a predictive role in the quantification of this molecule.^{39,40} As RP is one of the most predominant secondary effects of RT, it is important to evaluate any tendency for this to develop.^{37,40-42}

Wang *et al.* aimed to clarify the predictive role of TGF β 1 in RP. They assessed TGF β 1 level both in blood serum and induced sputum, and quantified them before and near the end of RT. Twenty-three patients with NSCLC were enrolled and the levels of serum TGF β 1 were analysed by double antibody sandwich ELISA. During the RT sessions, nine of the 23 patients (39%) had RP and the patients with higher concentrations of TGF β 1 showed a greater tendency to RP, although the results were not statistically significant. TGF β 1 was detected in macrophages and epithelial cells by immunohistochemistry techniques. The authors concluded that use of TGF β 1 alone was not a good predictor of RP, but could have some importance combined with tumour response.⁴⁰

Novakova-Jiresova *et al.* studied 46 subjects, 24% of whom developed symptoms of RP. After analysis of the TGF β levels during the six weeks of RT sessions, the patients who did not develop RP showed a tendency to lower TGF β levels. However, levels of TGF β in patients who developed RP increased mid way through the therapy. The difference in the TGF β dynamics between the groups reached marginal statistical significance only in the third week of treatment, and subsequently the correlation diminished.^{41,42}

Zhao *et al.* aimed to investigate the role of circulating TGF β 1 during radiation therapy in predicting radiation-induced lung toxicity (RILT). TGF β 1 level was determined before radiation therapy and at two and four weeks after the beginning of RT; by the end, 23% of patients had symptoms of RILT. The results showed a radiation-induced elevation of circulating TGF β 1 after four weeks of RT. No correlation was found between the levels of this cytokine and patients with and without RILT.³⁸

After analysis of the literature regarding cytokines and immune cells, it is highly suggestive that the immune system response is strongly correlates with radiation effects. Although the scientific community generally associates RT with immunosuppressive effects, some new information shows the opposite, and RT could have a stimulating effect on the immune system.³⁸ Understanding how the immune system behaves in response to radiation and in tumour tissue, it is possible that these cells, or their cytokines, can be used as prognostic factors. However, these processes are complex and further research is needed.^{35,46,49}

Pro-angiogenic molecules stimulated by radiation, such as IL-8 and VEGF, indicate a poor prognosis, although the presence of T cells indicates a positive response by the immune system against tumour tissue. Clearly, the effect of RT is a balance of several factors that can lead to different outcomes.^{35,46}

Radiation has many benefits in the treatment of LC, but adverse effects such as RP and RILT can diminish the final result.³³ To help predict the appearance of these effects in NSCLC patients treated with RT, TGF β is already being studied widely.⁴⁰⁻⁴² The results show that TGF β 1 has some relevance in predicting radiation-induced side-effects, as levels of this cytokine increase in the third or fourth week after commencement of RT in patients who later suffer these effects.^{39-41,43,44}

Conclusions

The link between radiation therapy and the immune system is noticeable. T cells, macrophages, NK cells and other immune cells have a key role in the control of the tumour microenvironment. The lack of large-scale clinical trials makes the data unreliable, but potentially contain promising information. These difficulties aside, there are too many variables in the studies related to radiation and the immune system. Among the variables, RT treatment, stages of disease, patient characteristics and the small amount of studied subjects are factors that make it difficult for the scientific community to use these data in the routine diagnosis, treatment and prognosis of LC. Clarification of the mechanism behind the immune response after radiation exposure can help to predict the reactions to the treatment of LC and result in better therapy results. This improvement could lead to a better quality of life and a better prognosis for patients. □

References

- 1 International Agency for Research on Cancer. Lung Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Lyon: IARC, 2014.
- 2 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; **63** (2): 11-30.
- 3 Gaughan EM, Cryer SK, Yeap BY, Jackman DM, Costa DB. Family history of lung cancer in never smokers with non-small-cell lung cancer and its association with tumors harboring EGFR mutations. *Lung Cancer* 2013; **79** (3): 193-7.
- 4 Barnard S. Lung cancer: epidemiology, treatment. *Surgery* 2004; **22** (5): 97-100.
- 5 Toloza EM, Harpole L, Detterbeck F, McCrory DC. Invasive staging of non-small cell lung cancer: a review of the current evidence. *Chest* 2003; **123** (1 Suppl): 157S-166S.
- 6 Stewart DJ ed. *Lung cancer: prevention, management and emerging therapies*. Chichester: Humana, 2010.
- 7 Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M, Heath C Jr, Doll R. Mortality from smoking worldwide. *Br Med Bull* 1996; **52** (1): 12-21.
- 8 Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* 2008; **83** (5): 584-94.
- 9 Goldstraw P, Ball D, Jett JR *et al.* Non-small-cell lung cancer. *Lancet* 2011; **378** (9804): 1727-40.

- 10 Wistuba II, Gazdar a F. Molecular pathology of lung cancer. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2000; **84**: 96–105.
- 11 Rosti G, Bevilacqua G, Bidoli P, Portalone L, Santo a, Genestreti G. Small cell lung cancer. *Ann Oncol* 2006; **17** (Suppl 2): ii5–10.
- 12 Saeed I, Anderson J. Cancer of the lung: staging, radiology, surgery. *Surgery* 2011; **29** (5): 221–6.
- 13 Bearz A, Berretta M, Lleshi A, Tirelli U. Target therapies in lung cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011; **2011**: 921231.
- 14 Ray M, Jablons D, He B. Lung cancer therapeutics that target signaling pathways: an update. *Expert Rev Respir Med* 2010; **4** (5): 631–45.
- 15 Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR *et al.* Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; **363** (18): 1693–703.
- 16 Cameron SE, Andrade RS, Pambuccian SE. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration cytology: a state of the art review. *Cytopathology* 2010; **21** (1): 6–26.
- 17 Husain AN, Colby T, Ordonez N *et al.*; International Mesothelioma Interest Group. Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: 2012 update of the consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med* 2013; **137** (5): 647–67.
- 18 Rekhman N, Ang DC, Sima CS, Travis WD, Moreira AL. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol* 2011; **24** (10): 1348–59.
- 19 National Comprehensive Cancer Network. *Non-small cell lung cancer*. NCCN Clinical Practice Guidelines. Fort Washington: NCCN, 2013 (Version 2).
- 20 Rossi A, Martelli O, Di Maio M. Treatment of patients with small-cell lung cancer: from meta-analyses to clinical practice. *Cancer Treat Rev* 2013; **39** (5): 498–506.
- 21 Früh M, De Ruyscher D, Popat S *et al.* Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; **24** (Suppl 6): vi99–105.
- 22 Paumier A, Le Péchoux C. Radiotherapy in small-cell lung cancer: where should it go? *Lung Cancer* 2010; **69** (2): 133–40.
- 23 Formenti SC, Demaria S. Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncol* 2009; **10** (7): 718–26.
- 24 Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8 (+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res* 2001; **61** (10): 3932–6.
- 25 Ikushima H. Radiation therapy: state of the art and the future. *J Med Invest* 2010; **57** (1–2): 1–11.
- 26 Hiraoka K, Miyamoto M, Cho Y *et al.* Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *Br J Cancer* 2006; **94** (2): 275–80.
- 27 de Lima JJ. *Biofísica médica* 3rd edn (in Portuguese). University of Coimbra: 2014, 873.
- 28 Maehata Y, Onishi H, Kuriyama K *et al.* Immune responses following stereotactic body radiotherapy for stage I primary lung cancer. *Biomed Res Int* 2013; **2013**: 731346.
- 29 Lumniczky K, Sáfrány G. The impact of radiation therapy on the antitumor immunity: local effects and systemic consequences. *Cancer Lett* 2015; **356** (1): 114–25.
- 30 Joiner M, van der Kogel A eds. *Basic clinical radiobiology* 4th edn. Boca Raton: CDC, 2009.
- 31 Shiao SL, Coussens LM. The tumor-immune microenvironment and response to radiation therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; **15** (4): 411–21.
- 32 Dienstmann R, Martinez P, Felip E. Personalizing therapy with targeted agents in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2011; **2** (3): 165–77.
- 33 Jeremic B ed. *Advances in radiation oncology in lung cancer* 2nd edn. Heidelberg: Springer-Verlag, 2005.
- 34 Yuan A, Yu CJ, Chen WJ *et al.* Correlation of total VEGF mRNA and protein expression with histologic type, tumor angiogenesis, patient survival and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 2000; **89** (6): 475–83.
- 35 Crohns M, Saarelainen S, Laine S, Poussa T, Alho H, Kellokumpu-Lehtinen P. Cytokines in bronchoalveolar lavage fluid and serum of lung cancer patients during radiotherapy – association of interleukin-8 and VEGF with survival. *Cytokine* 2010; **50** (1): 30–6.
- 36 Durante M, Reppingen N, Held KD. Immunologically augmented cancer treatment using modern radiotherapy. *Trends Mol Med* 2013; **19** (9): 565–82.
- 37 Chen JJ, Yao P, Yuan A *et al.* Up-regulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003; **9** (2): 729–37.
- 38 Gridley DS, Bonnet RB, Bush DA *et al.* Time course of serum cytokines in patients receiving proton or combined photon/proton beam radiation for resectable but medically inoperable non-small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; **60** (3): 759–66.
- 39 Rube CE, Palm J, Erren M *et al.* Cytokine plasma levels: reliable predictors for radiation pneumonitis? *PLoS One* 2008; **3** (8): e2898.
- 40 Wang J, Qiao XY, Lu FH *et al.* TGF-beta 1 in serum and induced sputum for predicting radiation pneumonitis in patients with non-small cell lung cancer after radiotherapy. *Chin J Cancer* 2010; **29** (3): 325–9.
- 41 Zhao L, Sheldon K, Chen M *et al.* The predictive role of plasma TGF-beta1 during radiation therapy for radiation-induced lung toxicity deserves further study in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008; **59** (2): 232–9.
- 42 Novakova-Jiresova A, Van Gameren MM, Coppes RP, Kampinga HH, Groen HJ. Transforming growth factor-beta plasma dynamics and post-irradiation lung injury in lung cancer patients. *Radiother Oncol* 2004; **71** (2): 183–9.
- 43 Anscher MS. Targeting the TGF-beta1 pathway to prevent normal tissue injury after cancer therapy. *Oncologist* 2010; **15** (4): 350–9.
- 44 Marks LB, Bentzen SM, Deasy JO *et al.* Radiation dose-volume effects in the lung. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; **76** (3 Suppl): S70–6.
- 45 Nakakubo Y, Miyamoto M, Cho Y *et al.* Clinical significance of immune cell infiltration within gallbladder cancer. *Br J Cancer* 2003; **89** (9): 1736–42.
- 46 Hald SM, Bremnes RM, Al-Shibli K *et al.* CD4/CD8 co-expression shows independent prognostic impact in resected non-small cell lung cancer patients treated with adjuvant radiotherapy. *Lung Cancer* 2013; **80** (2): 209–15.
- 47 Yuan A, Yang PC, Yu CJ *et al.* Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival, and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **162** (5): 1957–63.
- 48 Zhu YM, Bagstaff SM, Woll PJ. Production and upregulation of granulocyte chemotactic protein-2/CXCL6 by IL-1beta and hypoxia in small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2006; **94** (12): 1936–41.
- 49 Xu QY, Gao Y, Liu Y, Yang WZ, Xu XY. Identification of differential gene expression profiles of radioresistant lung cancer cell line established by fractionated ionizing radiation *in vitro*. *Chin Med J (Engl)* 2008; **121** (18): 1830–7.

PARTE VII ANEXOS

Anexo 1

Solicitação à Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra relativamente ao projeto de investigação- Caracterização Celular e Molecular dos Efeitos da Radiação em Neoplasias -Estudo experimental em Linfoma e Carcinoma de Pequenas Células do Pulmão – Experimentação Clínica.



COMISSÃO DE ÉTICA

PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO - EXPERIMENTAÇÃO CLÍNICA

Instruções: o(a) aluno(a)/investigador(a) deve preencher os campos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 em computador. Posteriormente, assina o formulário e entrega-o na **Divisão Académica** (em caso de se tratar de um projecto de investigação inserido num curso de mestrado e/ou doutoramento) **OU** no **Secretariado Executivo** (em caso de se tratar de um projecto de investigação autónomo) **em PAPEL E EM SUPORTE DIGITAL** JUNTAMENTE com os anexos constantes dos pontos 3 e 4 (se aplicável) e COM OS CONSENTIMENTOS DESCRITOS NO PONTO 11. **Todas as comunicações serão efectuadas via e-mail.**

1. IDENTIFICAÇÃO DO(A) ALUNO(A)/INVESTIGADOR(A) PRINCIPAL

Nome (completo): Fernando José Figueiredo Agostinho D' Abreu Mendes

Nome (completo): Fernando José Figueiredo Agostinho D' Abreu Mendes

Morada: Rua Gentil Ribeiro Lt4-3D

C. Postal: 3080 - 017 Localidade: Figueira da Foz

Telemóvel: 9619462299 Endereço de e-mail: fjmendes@netcabo.pt

1.1. IDENTIFICAÇÃO DO(S) CO-INVESTIGADOR(ES) (se aplicável)

Nome (completo):

Telemóvel:

Endereço de e-mail:

Nome (completo):

Telemóvel:

Endereço de e-mail:

Nome (completo):

Telemóvel:

Endereço de e-mail:

2. IDENTIFICAÇÃO DO PROJECTO

Modalidade do projecto:

Título do projecto:

Caracterização Celular e Molecular dos Efeitos da Radiação em Neoplasias - Estudo experimental em Linfoma e Carcinoma de Pequenas Células do Pulmão

Serviço(s) onde o projecto será executado:

Laboratório da Unidade Curricular de Biologia Molecular Aplicada e Instituto de Biofísica e Biomatemática, Subunidade I de Ensino - Faculdade de Medicina (Pólo III), Instituto de Imunologia, Faculdade de Medicina (Pólo 1), Universidade de Coimbra

Existem outros centros, nacionais ou não, onde a mesma investigação será feita?

não

Em caso afirmativo indique-os:

Descreva sucintamente os objectivos da investigação:

O PRINCIPAL OBJECTIVO DO ESTUDO CONSISTE NA CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE MARCADORES CELULARES E MOLECULARES ENVOLVIDOS NOS EFEITOS DA RADIAÇÃO (EFEITOS DIRECTOS E INDIRECTOS) EM LINHAS CELULARES DE LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B (LDGC-B) E CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS DE PULMÃO (CPCP), SENSÍVEIS E RESISTENTES À RADIAÇÃO, BEM COMO A CARACTERIZAÇÃO DO REFLEXO PERIFÉRICO DA RADIOTERAPIA NO SISTEMA IMUNITÁRIO EM DOENTES COM ESTAS NEOPLASIAS, DE MODO A IDENTIFICAR MARCADORES DE SENSIBILIDADE, RESISTÊNCIA E/OU TOXICIDADE QUE PERMITAM PERSPECTIVAR TRATAMENTOS MAIS EFICAZES DESTAS PATOLOGIAS.

PARA ATINGIR ESTES OBJECTIVOS PRETENDE-SE:

- AVALIAR E CARACTERIZAR O TIPO DE MORTE E/OU PROLIFERAÇÃO CELULAR EM LINHAS CELULARES DE LDGC-B E CPCP APÓS IRRADIAÇÃO GAMA, NUMA GAMA DE DOSES DE 0,5 GY A 30 GY;
- CARACTERIZAR OS MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA CITOTOXICIDADE E/OU PROLIFERAÇÃO (EFEITOS DIRECTOS E INDIRECTOS) E/OU RESISTÊNCIA INDUZIDA PELA RADIAÇÃO EM LINHAS CELULARES DE LDGC-B E CPCP, EM PARTICULAR AS ALTERAÇÕES NA SINALIZAÇÃO CELULAR (NF-KB, TGF-BETA E TNF-ALFA) E NO STRESSE OXIDATIVO;
- AVALIAR E CARACTERIZAR AS DIFERENTES POPULAÇÕES CELULARES DO SISTEMA IMUNE NOS DOENTES SUBMETIDOS A RADIOTERAPIA (40 DOENTES COM LDGC-B E 30 DOENTES COM CPCP) (APÓS



CONSENTIMENTO INFORMADO) E RELACIONÁ-LAS COM A RESPOSTA AO TRATAMENTO;
- AVALIAR OS NÍVEIS DE CITOCINAS, DE STRESSE OXIDATIVO E DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS, ENVOLVIDAS NA SUSCEPTIBILIDADE E/OU RESISTÊNCIA À MORTE CELULAR EM DOENTES COM LDGC-B E CPCP SUJEITOS A RADIOTERAPIA, RELACIONANDO-OS COM O PERFIL DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE;
- RELACIONAR OS DADOS OBTIDOS COM A RADIOSENSIBILIDADE E/OU RADIORESISTÊNCIA DESTES DOENTES À RADIOTERAPIA .

3. OUTROS DADOS SOBRE O PROJECTO

A Investigação proposta envolve Exames Complementares
Em caso afirmativo, por favor, indique:

Tipo:	Citometria de Fluxo, quantificação de Citocinas e níveis de stresse oxidativo
Frequência:	Antes da primeira sessão de radioterapia, 48 após a primeira sessão e um mês após a primeira sessão, sendo executados no âmbito dos cuidados médicos habituais a prestar aos doentes.
Natureza da amostra	Amostra de sangue periférico

(NOTA: Especifique se estes exames são feitos especialmente para esta investigação ou se serão executados no âmbito dos cuidados médicos habituais a prestar aos doentes).

A Investigação proposta envolve Questionários?
Em caso afirmativo, por favor, indique:

A quem são feitos?	
Como será mantida a confidencialidade?	

(NOTA: [Junte 1 exemplar](#) do questionário que será utilizado).

4. ENSAIOS CLÍNICOS DE NOVOS FÁRMACOS

Tipo de ensaio:

Tipo de Fármaco:

Nome(s) Genérico(s):	não se aplica
Grupo farmacológico ou terapêutico:	não se aplica
Aprovação noutros países:	não se aplica
Aprovação pelo INFARMED:	não se aplica
Fármaco:	seleccionar
Forma Medicamentosa:	seleccionar
Indicação terapêutica contemplada na investigação:	seleccionar
Posologia contemplada na investigação:	seleccionar
Via de administração contemplada na investigação:	seleccionar
Tipo de Ensaio:	seleccionar
Comparação com placebo:	seleccionar
Comparação com fármaco padrão:	seleccionar
Ensaio com dupla ocultação randomizado:	seleccionar
Ensaio aberto:	seleccionar
Outro tipo (especifique)	

(NOTA: 1 – No caso de medicamentos já aprovados oficialmente junte a bula oficial do produto comercializado.

2 - No caso de medicamentos ainda não aprovados, junte documento do fabricante, certificando a segurança do produto no qual conste a posologia e vias de administração recomendadas, bem como as indicações terapêuticas.)

5. JUSTIFICAÇÃO CIENTÍFICA DA INVESTIGAÇÃO

(descreva sucintamente os fundamentos científicos da investigação. Indique, em particular, se a investigação já foi feita anteriormente com seres humanos, se o problema foi devidamente estudado a nível experimental de modo a otimizar os aspectos analíticos e técnicos e a avaliar os possíveis efeitos adversos).

Nos últimos anos, apesar do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, o cancro continua a ser responsável por elevado número de mortes em todo o mundo. O Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGC-B) e o Carcinoma de Pequenas Células do Pulmão (CPCP) representam duas neoplasias de elevada incidência e agressividade. A radioterapia faz parte dos esquemas de tratamento destas neoplasias malignas. No entanto, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na sua acção anti-cancerígena e na radioresistência, assim como as repercussões no sistema imune, não estão totalmente clarificados, o que constitui os objectivos deste projecto. Neste sentido, pretendemos caracterizar a nível molecular e celular os efeitos da radiação nas



diferentes populações celulares do sistema imune, através da avaliação de parâmetros de stresse oxidativo (ROS, defesas antioxidantes e lesão oxidativa) e mediadores de resposta inflamatória/imunitária. Este estudo será efectuado em linhas celulares sensíveis e resistentes à radiação, e, concomitantemente em amostras biológicas de 40 doentes com LDGC-B e 30 com CPCP. Deste modo, esperamos contribuir para a identificação de marcadores de sensibilidade, resistência e/ou toxicidade que permitam perspectivar tratamentos mais eficazes e melhorar a sobrevivência dos doentes.

6. DOENTES ABRANGIDOS NA INVESTIGAÇÃO

Número: As mulheres grávidas são excluídas?

Indique como se processará o recrutamento dos doentes:

40 doentes com Linfoma Difuso Grandes Células-B e 30 doentes com Carcinoma Pequenas Células Pulmão seleccionados nos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC) e Instituto Português de Oncologia de Coimbra (IPO) segundo os critérios internacionais de classificação/diagnóstico deste tipo de patologia

7. CONTROLOS

Número:

Indique, por favor, como serão escolhidos:

OS CONTROLOS SERÃO AS AMOSTRAS DOS DOENTES, PRÉ-TRATAMENTO DE RADIOTERAPIA

8. DESCRIÇÃO RESUMIDA DO PLANO DA INVESTIGAÇÃO

DE MODO A CONCRETIZAR OS OBJECTIVOS PROPOSTOS, O PRESENTE TRABALHO SERÁ EFECTUADO EM DOENTES E EM LINHAS CELULARES EM VÁRIAS TAREFAS DURANTE O PERÍODO DE 2 A 3 ANOS.

TAREFA 1 – ESTUDOS REALIZADOS EM DOENTES

TAREFA 1.1 - SELECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE DOENTES

OS ESTUDOS SERÃO EFECTUADOS EM APROXIMADAMENTE 40 DOENTES COM LDGC-B E 30 DOENTES COM CPCP SELECIONADOS NOS HOSPITAIS DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA (HUC) E INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DE COIMBRA (IPO) SEGUNDO OS CRITÉRIOS INTERNACIONAIS DE CLASSIFICAÇÃO/DIAGNÓSTICO DESTE TIPO DE PATOLOGIAS.

OS DOENTES SERÃO AVALIADOS DE ACORDO COM PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E RECOLHIDAS PERIODICAMENTE AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO NO DECURSO DOS SEUS EXAMES DE ROTINA (ANTES E APÓS RADIOTERAPIA) DE ACORDO COM OS PRINCÍPIOS DA DECLARAÇÃO DE HELSÍNQUIA II. OS PROTOCOLOS SERÃO APROVADOS PELA COMISSÃO DE ÉTICA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA, DOS HUC E IPO.

TODOS OS DOENTES NO ESTUDO SERÃO INFORMADOS DO TEOR DO PROJECTO, DOS SEUS POTENCIAIS RISCOS E BENEFÍCIOS, E TERÃO DE ASSINAR VOLUNTARIAMENTE O CONSENTIMENTO INFORMADO (ANEXO 1 E 2).

TAREFA 1.2 – CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE

A CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE, SERÁ EFECTUADA EM AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES NAS 24 HORAS ANTERIORES À PRIMEIRA SESSÃO DE RADIOTERAPIA (T=0), 48 HORAS (T=1) E 30 DIAS (T=2) APÓS A PRIMEIRA SESSÃO DE RADIOTERAPIA. A IDENTIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE SERÁ REALIZADA POR CITOMETRIA DE FLUXO, RECORRENDO À MARCAÇÃO COM UM PAINEL DE ANTICORPOS MONOCLONAIS (LYMPHOGRAM®, CYTOGONOS). A CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS T REGULADORAS (TREGS) SERÁ REALIZADA COM RECURSO A ANTICORPOS MONOCLONAIS: ANTI-CD4 CONJUGADO COM A PROTEÍNA PERIDINA CLOROFILA ASSOCIADA COM CIANINA 5.5 (BD BIOSCIENCES, SAN JOSÉ, CALIFORNIA, EUA), ANTI-CD25 CONJUGADO COM ISOTIOCINATO DE FLUORESCÉINA (BD PHARMINGEN, SAN DIEGO, EUA), ANTI-CD127 CONJUGADO COM FICOERITRINA (BECKMAN COULTER, CALIFORNIA, EUA) E ANTI FOXP-3 (BD PHARMINGEN, SAN DIEGO, EUA)

TAREFA 1.3 – CARACTERIZAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR EM DOENTES COM CPCP E LDGC-B

DE MODO A CARACTERIZAR E QUANTIFICAR O TIPO DE MORTE CELULAR COLHER-SE-ÃO AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO NOS MOMENTOS T=0, T=1 E T=2. A CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA MORTE CELULAR EM DOENTES COM CPCP SERÁ REALIZADA COM RECURSO AOS KITS M30-APOPTOSENSE E M65, POR ELISA (PEVIVA, ALEXIS BIOCHEMICALS). NOS DOENTES COM LDGC-B UTILIZAR-SE-Á A CITOMETRIA DE FLUXO RECORRENDO À DUPLA MARCAÇÃO ANEXINA V E IODETO DE PROPÍDEO (BELARDO ET AL., 2010, DOURADO M E SARMENTO AB ET AL., 2007)

TAREFA 1.4 - DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS

OS EFEITOS DA RADIAÇÃO NA SINALIZAÇÃO CELULAR SERÃO AVALIADOS NO PLASMA DE DOENTES, ATRAVÉS DA QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE: INTERFERON GAMA (INF-GAMA), FACTOR DE NECROSE TUMORAL - ALPHA (TNF-ALFA), FACTOR DE CRESCIMENTO DE TUMORAL-BETA (TGF-B), INTERLEUCINAS 1B, 2, 6, 8 E 10 POR ELISA (HUMAN IFN-GAMMA ELISA, HUMAN TNF ALPHA RECOMBINANT PROTEIN, HUMAN TGF BETA 1 RECOMBINANT PROTEIN, MOUSE IL-1B ELISA, HUMAN IL-2 RECOMBINANT PROTEIN, HUMAN IL-6



ELISA, HUMAN IL-8 ELISA, HUMAN IL-10 RECOMBINANT PROTEIN, ELISA).

TAREFA 1.4 - DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE STRESS OXIDATIVO

O STRESSE OXIDATIVO SERÁ ANALISADO ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE ROS (PERÓXIDOS) E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES. ESTA DETERMINAÇÃO SERÁ EFECTUADO NAS CÉLULAS MONONUCLEADAS. OS NÍVEIS DE PERÓXIDOS SERÃO AVALIADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO USANDO A SONDA DCFH2-DA (GAO ET AL., 2004). A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL SERÁ AVALIADA POR ESPECTROFOTOMETRIA E OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE GLUTATIÃO REDUZIDO POR CITOMETRIA DE FLUXO COM RECURSO À SONDA FLUORESCENTE ALARANJADO DE MERCÚRIO (AMER ET AL., 2004). A LESÃO OXIDATIVA DE MACROMOLÉCULAS SERÁ AVALIADA POR TÉCNICA DE ELISA ATRAVÉS DE BIOMARCADORES DE LESÃO OXIDATIVA DO DNA (8-HIDROXI-2'-DEOXIGUANOSIN/8-OHDG) (OXISELECT OXIDATIVE DNA DAMAGE ELISA, 8-OHDG QUANTITATION), DAS PROTEÍNAS (GRUPOS CARBONÍLO) (ICMT RABBIT ANTI-HUMAN POLYCLONAL ANTIBODY - LSBIO) E DOS LÍPIDOS (MALONILDIALDEÍDO/MDA) (THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES, OXISELECT TBARS ASSAY). (ALMEIDA S E SARMENTO RIBEIRO AB ET AL., 2008).

TAREFA 2 - ESTUDOS REALIZADOS EM LINHAS CELULARES

TAREFA 2.1 – AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR EM LINHAS CELULARES SENSÍVEIS E RESISTENTES À RADIAÇÃO

O PROJECTO SERÁ DESENVOLVIDO UTILIZANDO LINHAS CELULARES DE LDGC-B, AS CÉLULAS FARAGE, E DE CPCP, AS CÉLULAS H69 (ATCC) SENSÍVEIS E RESISTENTES À RADIOTERAPIA. APÓS O DESCONGELAMENTO E PROPAGAÇÃO DAS LINHAS CELULARES NAS CONDIÇÕES RECOMENDADAS PELA ATCC ESTAS SERÃO IRRADIADAS. PARA A IRRADIAÇÃO SERÁ UTILIZADA UMA FONTE DE RADIAÇÃO GAMA DE 140 KEV, SENDO AS CÉLULAS EXPOSTAS A DOSES VARIÁVEIS DE RADIAÇÃO ENTRE 0,5 E 30 GY.

A FIM DE INVESTIGARMOS POSSÍVEIS MECANISMOS INTRACELULARES ENVOLVIDOS NA RADIORESISTÊNCIA RESPONSÁVEIS PELA RECIDIVA APÓS RADIOTERAPIA, ESTABELECEMOS LINHAS CELULARES DE CANCRO RESISTENTES À RADIAÇÃO, AS CÉLULAS FARAGE-TIR E IRR H69, DERIVADAS DAS CONGÉNERES SENSÍVEIS, AS CÉLULAS FARAGE E H69, POR EXPOSIÇÃO REPETIDA À RADIAÇÃO IONIZANTE.

OS EFEITOS CITOTÓXICOS DA RADIAÇÃO SERÃO AVALIADOS ATRAVÉS DO TESTE DO ALAMAR E O TIPO DE MORTE SERÁ ANALISADO POR CITOMETRIA DE FLUXO ATRAVÉS DA DUPLA MARCAÇÃO ANEXINA V E IODETO DE PROPÍDEO (BELARDO ET AL., 2010). PARA COMPLEMENTAR ESTES RESULTADOS SERÃO REALIZADOS ENSAIOS CLONOGÉNICOS PARA DETERMINAR A PROLIFERAÇÃO CELULAR APÓS IRRADIAÇÃO (IVANOV ET AL., 2010) (OLIVEIRA, R ET AL., 2010)

TAREFA 2.2 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DIRECTOS DA RADIAÇÃO - ANÁLISE DE PARÂMETROS DE STRESSE OXIDATIVO

OS EFEITOS DIRECTOS DA RADIAÇÃO SERÃO AVALIADOS ATRAVÉS DE PARÂMETROS DE SO E LESÃO OXIDATIVA DE MACROMOLÉCULAS NAS CÉLULAS SENSÍVEIS E RESISTENTES À RADIAÇÃO, TAL COMO MENCIONADO NO PONTO 1.4.

TAREFA 2.3 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDIRECTOS DA RADIAÇÃO - DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA SINALIZAÇÃO CELULAR

OS EFEITOS DA RADIAÇÃO NA SINALIZAÇÃO CELULAR NAS LINHAS CELULARES SERÃO AVALIADOS ATRAVÉS DA QUANTIFICAÇÃO/EXPRESSÃO DE TNF-ALFA, TGF-BETA, NF-KB, ERK1/2, CICLINA D1, P53, BCL-2, BAX E SURVIVINA (BD PHARMINGEN, SAN DIEGO, EUA) COM RECURSO A ELISA E/OU CITOMETRIA DE FLUXO (CORTESÃO E, SARMENTO RIBEIRO AB ET AL., 2009).

TAREFA 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO PROJECTO, ATRAVÉS DE ESTATÍSTICA DESCRITIVA OS RESULTADOS OBTIDOS SERÃO ANALISADOS DE FORMA A CONTROLAR A VARIABILIDADE DOS MESMOS. SERÁ APLICADO UM MODELO DE LINEARIDADE GERAL, A FIM DE IDENTIFICAR AS DIFERENÇAS E AS CORRELAÇÕES ENTRE OS DADOS AJUSTADOS PARA A SUA DISTRIBUIÇÃO, PELOS MÉTODOS DE ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS, E ANÁLISE MULTIVARIADA UTILIZANDO O SPSS STATISTICS®, VERSÃO 17, CONSIDERANDO-SE UM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA DE 95% ($P < 0,05$).

9. ENUMERAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS, EXAMES OU SUBSTÂNCIAS QUE IRÃO SER ADMINISTRADAS AOS DOENTES (diets especiais, medicamentos, radioisótopos, contrastes radiológicos, etc.)

NÃO SE APLICA

10. RISCO/BENEFÍCIO

Que riscos ou incómodos podem ser causados aos doentes pelo estudo?

Nenhum, uma vez que todos os procedimentos (colheita de amostra biológica-sangue) já se encontra incluído nos procedimentos normais de seguimento e tratamento destes doentes.

Que benefícios imediatos poderão advir para os doentes pela sua anuência em participar no estudo?

Considera que os meios utilizados no estudo podem violar a privacidade do doente?

Não



Em caso afirmativo, por favor, indique as medidas que serão tomadas para assegurar a confidencialidade:

--

Os doentes que não aceitarem participar no estudo ficarão, por esse facto, prejudicados em termos de assistência médica, relativamente aos participantes:

Não

11. CONSENTIMENTO

A expressão do consentimento informado terá forma escrita, conforme a Lei.

(Nota: Deverá juntar um exemplar de um "Texto de informação ao doente" e um exemplar de um "Termo de consentimento informado" assinado pelo doente ou pelo seu representante legal.

Descreva resumidamente o conteúdo da informação a transmitir ao doente:

ESTÁ A SER CONVIDADO A PARTICIPAR NUM PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO CIENTÍFICA. PARA DECIDIR SE DESEJA, OU NÃO, PARTICIPAR NESTE ESTUDO, DEVERÁ COMPREENDER OS OBJECTIVOS DO ESTUDO, RISCOS A QUE ESTARÁ SUJEITO E OS BENEFÍCIOS QUE PODEM ADVIR DA REALIZAÇÃO DO ESTUDO.
TÍTULO DO PROJECTO: CARACTERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO - ESTUDO EXPERIMENTAL EM LINFOMA E CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS DO PULMÃO.
INVESTIGADOR RESPONSÁVEL: FERNANDO JOSÉ FIGUEIREDO AGOSTINHO D'ABREU MENDES/ANA BELA SARMENTO RIBEIRO
O SEU MÉDICO PROPÕE-LHE PARTICIPAR NUM ESTUDO EM QUE SE PRETENDE ESCLARECER AS OS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA SUA ACÇÃO ESTÃO POUCO ESCLARECIDOS. ASSIM, A IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA SINALIZAÇÃO CELULAR E A CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA IMUNE, ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE STRESSE OXIDATIVO (ROS, DEFESAS ANTIOXIDANTES E LESÃO OXIDATIVA) E DE MEDIADORES DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA/IMUNITÁRIA ASSIM COMO A CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA EM IMUNE EM DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE DOENTES. DESTE MODO, ESPERA-SE CONTRIBUIR PARA A DEFINIÇÃO DE PERFIS QUE PERMITAM PERSPECTIVAR TRATAMENTOS MAIS EFICAZES DESTAS PATOLOGIAS.
PARA TAL PRECISAREMOS DE ANALISAR AMOSTRAS DE SANGUE, INCLUINDO A OBTENÇÃO, ARMAZENAMENTO E ESTUDO DE MATERIAL BIOLÓGICO. ESTAS SERÃO ENVIADAS PARA A FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA, ONDE SERÃO EFECTUADAS ANÁLISES MOLECULARES POR UM GRUPO DE INVESTIGADORES DIRIGIDOS PELOS PROFESSORES DOUTORES MANUEL SANTOS ROSA, ANA BELA SARMENTO E MARIA FILOMENA BOTELHO
ESTES ESTUDOS NÃO AFECTARÃO DE NENHUM MODO O SEU ACOMPANHAMENTO MÉDICO. O SEU MÉDICO ASSISTENTE INFORMÁ-LO-Á DOS RISCOS E INCÓMODOS INERENTES AOS EXAMES CLÍNICOS QUE NECESSITARÁ DE REALIZAR. AS AMOSTRAS PARA O ESTUDO EM CAUSA SERÃO COLHIDAS APROVEITANDO UMA OCASIÃO EM QUE TENHA QUE FAZER EXAMES COMPLEMENTARES PARA O DIAGNÓSTICO OU PARA A AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO.
AS AMOSTRAS COLHIDAS SÃO ESSENCIAIS PARA O DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO E PERMITIRÃO OBTEN UM MAIOR CONHECIMENTO SOBRE ESTE TIPO DE DOENÇA, COM A ESPERANÇA DE SE CONSEGUIR COMPREENDER A RESPOSTA AO TRATAMENTO DESTA PATOLOGIA POR RADIOTERAPIA E COMO PODERÁ SER TRATADA DE FORMA MAIS EFICAZ.

A investigação ou estudo envolve:

Menores de 14 anos:

Não

Inimputáveis:

Não

Em caso afirmativo, por favor, indique as medidas que serão tomadas para respeitar os seus direitos e obter o seu consentimento esclarecido ou dos seus representantes legais:

--

12. RELATIVAMENTE AO ESTUDO

Data prevista de início: 2011/2/1

Data prevista de conclusão: 2013/7/1

Pagamento aos doentes:

Pelas deslocações:

Não

Pelas faltas ao serviço:

Não

Por danos resultantes da sua participação no estudo:

Não

Em caso afirmativo, por favor, especifique a entidade que assume a responsabilidade das indemnizações:



Outro tipo de pagamentos (especifique):

Do estudo, resulta alguma espécie de benefício financeiro ou outro para o investigador e/ou instituição?

Em caso afirmativo, por favor, especifique:

Os dados obtidos constituirão propriedade exclusiva de companhia farmacêutica ou outra entidade?

Em caso afirmativo, por favor, especifique a entidade:

Qual a forma de atribuição dos eventuais direitos de propriedade intelectual constituídos ou reconhecidos?

Patentes:

Certificados complementares de protecção para medicamentos de uso humano:

Pertencentes em exclusivo ao Investigador:

Pertencentes em exclusivo à Universidade ou a outra entidade:

Pertencentes em regime de contitularidade ao Investigador, Universidade ou a outra entidade:

Não se aplica:

13. TERMO DE RESPONSABILIDADE

Eu, abaixo assinado(a), declaro por minha honra, na qualidade de investigador(a) principal, que as informações prestadas neste questionário são verdadeiras. Mais declaro que durante o estudo serão respeitadas todas as disposições legais em vigor e as recomendações constantes da Declaração de Helsínquia (1964 e subseqüentes revisões) e da Organização Mundial de Saúde.

Data do pedido de aprovação: 2010/12/17

(assinatura)

14. PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA

Reunião de ___/___/___

A Comissão, _____

Anexo 2

Consentimento Informado - Caracterização Celular e Molecular dos Efeitos da Radiação em Neoplasias -Estudo experimental em Linfoma e Carcinoma de Pequenas Células do Pulmão.

Anexo 1

***Caracterização Celular e Molecular dos Efeitos da
Radiação em Neoplasias -
Estudo experimental em Linfoma e Carcinoma de
Pequenas Células do Pulmão***

- Consentimento Informado -

ID Doente: _____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Considerando a “Declaração de Helsínquia” da Associação Médica Mundial
(Helsínquia 1964: Tóquio 1975:Veneza 1983: Hong Kong 1989: Somerset West 1996 e Edimburgo 2000)

1. Informação

Está a ser convidado a participar num projecto de investigação científica. Para decidir se deseja, ou não, participar neste estudo, deverá compreender os objectivos do estudo, riscos a que estará sujeito e os benefícios que podem advir da realização do estudo.

Título do Projecto: Caracterização Celular e Molecular dos Efeitos da Radiação em Neoplasias - Estudo experimental em Linfoma e Carcinoma de Pequenas Células do Pulmão

Investigador Responsável: Fernando José Figueiredo Agostinho D’Abreu Mendes/Ana Bela Sarmento Ribeiro

O seu médico propõe-lhe participar num estudo em que se pretende esclarecer os mecanismos envolvidos na acção dos tratamentos com radiação e que estão pouco esclarecidos. Assim, a identificação de moléculas envolvidas na sinalização celular e a caracterização do sistema imune, através da avaliação dos parâmetros de stresse oxidativo (ROS, defesas antioxidantes e lesão oxidativa) e de mediadores de resposta inflamatória/imunitária assim como a caracterização do sistema imune em de amostras biológicas de doentes. Deste modo, espera-se contribuir para a definição de perfis que permitam perspectivar tratamentos mais eficazes destas patologias.

Para tal precisaremos de analisar amostras de sangue, incluindo a obtenção, armazenamento e estudo de material biológico. Estas serão enviadas para a Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, onde serão efectuadas análises moleculares por um grupo de investigadores dirigidos pelos Professores Doutores Manuel Santos Rosa, Ana Bela Sarmento e Maria Filomena Botelho

Estes estudos não afectarão de nenhum modo o seu acompanhamento médico. O seu médico assistente informá-lo-á dos riscos e incómodos inerentes aos exames clínicos que necessitará de realizar. As amostras para o estudo em causa serão colhidas aproveitando uma ocasião em que tenha que fazer exames complementares para o diagnóstico ou para a avaliação do tratamento.

As amostras colhidas são essenciais para o desenvolvimento do estudo e permitirão obter um maior conhecimento sobre este tipo de doença, com a esperança de se conseguir compreender a resposta ao tratamento desta patologia por radioterapia e como poderá ser tratada de forma mais eficaz.

2. Confidencialidade

As informações acerca da sua identidade serão mantidas confidenciais como é habitual em qualquer registo médico.

Os dados referentes ao seu tratamento serão anotados em formulários de registo e utilizados de forma anónima num relatório final que dará conta de todos os resultados observados, para que possam ser controlados segundo as leis em vigor. Os resultados obtidos poderão ser publicados em revistas científicas, mas sem qualquer dado pessoal do doente.

3. Consentimento

A sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Não ficará privado dos benefícios dos cuidados de saúde a que tem direito se decidir não participar, ou se desistir do mesmo em qualquer altura.

Se tem alguma dúvida, não hesite em expô-la ao seu médico. Se concordar em participar, pedimos-lhe que assine a folha de consentimento em anexo (a sua assinatura não afecta os seus direitos legais).

Consentimento de Participação

Eu, _____ abaixo-assinado,
_____ certifico

que:

a) O Dr. _____ explicou-me em pormenor a natureza e a forma como se desenrolará neste estudo.

b) Compreendi que este estudo poderá contribuir para um maior conhecimento e para o tratamento futuro dessa doença, apesar de não me trazer qualquer benefício imediato.

c) Fui informado que os procedimentos do estudo não envolvem qualquer intervenção adicional.

d) Compreendi que a confidencialidade de todos os dados respeitantes ao meu ficheiro médico será respeitada.

e) Compreendi que a minha participação é voluntária e que sou livre de suspender a minha participação no estudo a qualquer momento, sem ter de dar explicações e sem que seja afectada a qualidade dos cuidados futuros aos quais tenho direito.

f) Li e recebi uma cópia da nota de informação destinada aos doentes.

g) Aceito, com conhecimento de causa e liberdade, participar neste estudo, após me ter sido dado um período de reflexão suficiente para decidir.

Nestas circunstâncias, autorizo a colheita de uma amostra de sangue e/ou lavado bucal, incluindo a obtenção, armazenamento e estudo de material genético, para utilização no projecto de investigação "*Caracterização Celular e Molecular dos Efeitos da Radiação - Estudo experimental em linfoma e carcinoma de pequenas células do pulmão*".

Data: ____/____/____

Assinatura do médico:

Assinatura do doente:

Anexo 3

Parecer da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra relativamente ao projeto de investigação – Experimentação Clínica.

COMISSÃO DE ÉTICA DA FMUC

Of. Refª **082-CE-2010**

Data 20 / 1 / 2011

Exmo Senhor

Prof. Doutor Manuel Santos Rosa

Presidente do Conselho Científico da

Faculdade de Medicina

Assunto: Projecto de Investigação no âmbito do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde.

Candidato(a): Fernando José Figueiredo Agostinho D'Abreu Mendes

Título do Projecto: "Caracterização celular e molecular dos efeitos da Radiação em Neoplasias - Estudo Experimental em Linfoma e Carcinoma de pequenas células do pulmão".

A Comissão de Ética da Faculdade de Medicina, após análise do projecto de investigação supra identificado, decidiu emitir o parecer que a seguir se transcreve: "**Parecer Favorável**".

Queira aceitar os meus melhores cumprimentos.

O Presidente,


Prof. Doutor João Manuel Pedroso de Lima

GC

Anexo 4

Parecer da Comissão de Ética e do Conselho de Administração do Hospital
Universitário de Coimbra.

Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E.

COMISSÃO DE ÉTICA PARA A SAÚDE

Visto / À U.I.D.
para difusão
Prof. Doutor José Pedro Figueiredo
Director Clínico
C.H.U.C. - E.P.E.

Exmo. Senhor:
Director Clínico do
CHUC, E.P.E.

N/Ref^o
CES

Ofício Nº
0162

Data
03.10.2012

ASSUNTO: [CHUC-69-12] - *Estudo Observacional "Caracterização Celular e Molecular dos Efeitos da Radiação em Neoplasias - Estudo experimental em Linfoma e Carcinoma de Pequenas Células do Pulmão"* - Professora Doutora Maria Filomena Botelho - Faculdade de Medicina da Universidade Coimbra (estudo a ser realizado no Serviço de radioterapia dos HUC-CHUC).

Dado que o projecto referido em epígrafe já tem parecer ético, emitido pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, cumpre-nos informar Vossa Ex.^a que esta CES o considera válido, não vendo necessidade de mais uma apreciação, uma vez que é de opinião que os projectos de investigação devem ter um único parecer.

Com os melhores cumprimentos,

P^a A COMISSÃO DE ÉTICA PARA A SAÚDE
DO CHUC, E.P.E.

Prof. Doutor José Joaquim Sousa Barros
Presidente da CES dos HUC - CHUC

A CES do HUC-CHUC: Prof. Doutor José Joaquim Sousa Barros; Prof.^a Doutora Maria Fátima Pinto Saraiva Martins; Dr. Mário Rui Almeida Branco; Enf.^o Adélio Tinoco Mendes; Prof. Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro; Dra. Alexandra Vilela; Padre José António Afonso Pais.

A CES do HSC-CHUC: Dra. Cláudia Santos; Dra. Conceição Pascoal; Dra. Ana Maria Martins; Dr. Paulo Figueiredo; Enf.^a Fernanda Pereira;

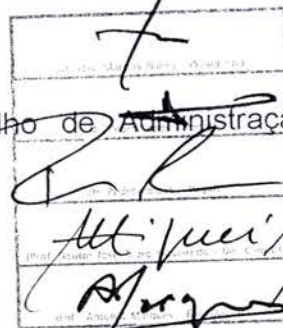
A CES do HS-CHUC: Dra. Maria Alice Torcato; Dr. José Alves Grilo Gonçalves; Enf.^o Fernando Mateus; Dra. Maria Helena Gomes; Dr. José António Pinheiro; Dra. Margarida Cunha Martins



Dr. José Martins Nunes
 Presidente do Conselho de Administração
 C.H.U.C. - EPE

Exm.º Senhor
 Presidente do Conselho de Administração do
 C.H.U.C.

8/11/11



28/09/2012

Ref.ª: CHUC-69-12

A pedido da **Sra. Professora Doutora Maria Filomena Botelho** recebeu esta Unidade um pedido de autorização de um Projecto de Investigação sobre “CARACTERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO EM NEOPLASIAS - ESTUDO EXPERIMENTAL EM LINFOMA E CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS DO PULMÃO”, ao qual não se aplicam as normas previstas na Lei n.º 46/2004 de 19 de Agosto e colheu parecer favorável da Comissão de Ética deste Hospital.

Informa-se V. Ex.ª que este projecto não acarreta qualquer encargo financeiro adicional para o CHUC.

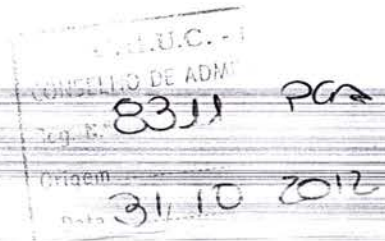
Solicita-se assim a autorização do Conselho de Administração para este Projecto.

Com os mais respeitosos cumprimentos,

O Director da Unidade de Inovação e Desenvolvimento

ML

(Prof. Doutor Pedro Monteiro)



* Todos os Documentos devem estar em Português!

NOTA: Na apresentação do projecto de investigação (ensaio clínico ou outro) deverá ser consultado o Regulamento de Procedimentos e Normas de Trabalho do Centro de Ensaios Clínicos, em vigor, e os procedimentos de trabalho para a apresentação de projectos de investigação. Esta documentação deve ser enviada também em suporte informático.



Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E.
Unidade de Inovação e Desenvolvimento
Centro de Ensaios Clínicos

AUTORIZAÇÃO DE PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO

CHUC	66	12
------	----	----

NOME DO PROJECTO:

"CARACTERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO EM NEOPLASIAS - ESTUDO EXPERIMENTAL EM LINFOMA E CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS DO PULMÃO"

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Sra. Professora Doutora Maria Filomena Botelho

De acordo com a Legislação em vigor é autorizada a realização nos Hospitais da Universidade de Coimbra, do Projecto de Investigação supracitado

DATA: 12/11/11

Presidente do Conselho de Administração

(Dr. José Martins Nunes)