



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Efeitos da Radiação Ionizante em Linhas Celulares de Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células - estudos *in vitro*.

*Dissertação apresentada à Universidade de
Coimbra para cumprimento dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica, realizada sob a orientação
científica da Professora Doutora Maria
Filomena Rabaça Roque Botelho
(Universidade de Coimbra) e do Professor
Doutor Rui de Albuquerque Carvalho
(Universidade de Coimbra)*

Tiago Luís Folgado Sales

2014

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

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

*“Segue o teu destino,
Rega as tuas plantas,
Ama as tuas rosas.
O resto é a sombra
De árvores alheias.”*

Ricardo Reis

Agradecimientos

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

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

Ao Professor Doutor Rui de Albuquerque Carvalho, por se disponibilizar a ser meu orientador interno, pela partilha de conhecimento e por ser o elo de ligação entre este trabalho e o Departamento de Ciências da Vida.

Ao Mestre Fernando Mendes por todo o ensinamento, disponibilidade, paciência e confiança depositada no meu trabalho, assim como toda a amizade que se foi formando ao longo deste ano.

À Susann por ser a companheira ideal para realizar este trabalho, por ser a pessoa que és, amiga e uma das melhores pessoas que já tive oportunidade de conhecer.

Ao Serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, por nos disponibilizarem tempo e recursos para a realização do trabalho de investigação desenvolvido. Também queria agradecer a todos os técnicos, engenheiros, enfermeiros e médicos do serviço, por serem sempre prestáveis a ajudar no necessário.

A todos os alunos de Doutoramento do Laboratório, Salomé, Catarina, Ana Brito, Mafalda, Maria João, Siri por estarem sempre disponíveis para ajudar em tudo o que é preciso e por serem pessoas cinco estrelas ao longo deste ano. Um especial agradecimento ao Casalta, pela ajuda na análise estatística dos resultados e pelas gomas nos sábados de trabalho.

A todos os alunos de mestrado do Serviço de Biofísica pelo ambiente brutal no laboratório, Teixeira, Telmo, Tânia, João, Filipa, Denise, Ana Claudia, Ana Isabel, Kathleen, Gonçalo e a todos os outros alunos que passaram pelo Serviço de Biofísica.

Ao Mário, Gonçalo, Mimi, Cláudia e Tixa por fazerem parte igualmente desta fase da minha vida.

Aos minados, Sara, Silvia, Renata e João, pela partilha de quase tudo, por serem grandes amigos e por estarem sempre lá, mesmo quando não estão fisicamente.

Ao André, ao PDM e ao pato pelo apoio, e porque a vida não é só trabalho e fazem-me ver que há outras coisas importantes para além disso. Também por este ano mudarem a minha vida.

A todos os meus amigos que me acompanharam e acompanham desde que sou gente, Simone, Bárbara, Joana, Ivan, Tânia e Daniel por serem as pessoas que são e por estarem lá quando é necessário, apesar de todo o tempo de ausência.

À minha família, pais, avós e ao meu irmão, por todo o apoio incondicional, pelo esforço que fizeram para que eu tivesse todas as condições para a realização dos meus estudos. Pela educação que me deram e por esta me permitir ser a pessoa que sou hoje.

Por fim, obrigado a todos os que fizeram parte da minha vida e que não me lembrei, porque não deixam de ser importantes para mim.

Resumo

O cancro de pulmão (CP) é uma das principais causas de morte por cancro em todo o mundo. Em geral, o CP pode ser classificado em dois tipos: cancro do pulmão não-pequenas células (CPNPC) e cancro do pulmão de pequenas células (CPPC). O CPNPC inclui ainda os subtipos adenocarcinoma, carcinoma de pulmão de células escamosas e carcinoma de pulmão de células grandes, cada um com subtipos. Embora o número de estudos sobre CP seja muito elevado, a eficácia dos tratamentos ainda se encontra abaixo do ideal, contribuindo para tal uma ampla gama de fatores que afetam o resultado do tratamento.

Avaliar os efeitos da radiação X (raios-X), em duas linhas celulares de CP após a irradiação de CPNPC (H1299 e A549) a nível da proliferação, viabilidade e tipo de morte celular. Para além disso estudaram-se alguns dos mecanismos envolvidos, o papel do stresse oxidativo, alterações no potencial de membrana mitocondrial (PMM), proteínas anti e proapoptóticas, citotoxicidade e ciclo celular.

Os estudos foram realizados após as linhas celulares serem expostas a RX de 4MeV no acelerador linear Varian 600C 12D10. Em todos os estudos foram incluídas células controlo (ausência de radiação), sendo as células irradiadas com várias doses, entre 0,5 a 60Gy. A sobrevivência das células foi estudada recorrendo ao ensaio clonogénico durante 12 dias. O efeito da radiação a nível intracelular foi avaliado com recurso à citometria de fluxo (CF) após um período de incubação de 48 horas. A morte celular foi avaliada recorrendo à dupla marcação com Anexina-V (AV)/iodeto de propídio (IP). O ciclo celular foi estudado através de IP/RNase. Recorremos a anticorpos monoclonais conjugados com FITC para determinar a razão BAX/BCL-2. Para avaliar a expressão Da proteína P53 usámos a técnica de Western blot. Os níveis de stresse oxidativo, foram determinados por CF, nomeadamente o anião superóxido,

peróxidos e níveis de glutathione reduzida recorrendo às seguintes sondas, Dihidroetídeo (DHE), 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) e alaranjado de mercúrio (1-(4-Chloromercuriophenylazo)-2-naphthol), respetivamente. Avaliámos ainda o PMM, utilizando a sonda fluorescente JC-1 (iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro 1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina), por CF.

Observámos uma diminuição na proliferação e da viabilidade celular dependente da dose, do tempo e da linha celular. O principal tipo de morte observado foi a apoptose. Os efeitos anti proliferativos e citotóxicos estão de acordo com o bloqueio de ciclo celular. No entanto, os nossos resultados demonstram que as células A549 são mais sensíveis à morte celular induzida por radiação, sendo que as células H1299 as mais resistentes. Estes resultados podem estar relacionados com diferenças na expressão da P53 e níveis de stresse oxidativo.

Os resultados sugerem que a radiação X diminui a viabilidade celular e induz morte preferencialmente por apoptose. No entanto, a sensibilidade e/ou a resistência à radiação, poderá estar dependente das características moleculares do CP influenciando assim a resposta à radioterapia e, por conseguinte, o sucesso do tratamento.

Abstract

Lung cancer (LC) is one of the leading causes of cancer-related death worldwide. Classification and staging of LC are critical for definitive diagnosis, treatment strategy and to predict the patient's outcome. Since 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 the histology and molecular analysis of biopsies collected from the involved place. In general, LC can be split into two main types: Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) and Small Cell Lung Cancer (SCLC). The NSCLC type includes adenocarcinoma, squamous-cell lung carcinoma, and large-cell lung carcinoma, each with its subtypes. Although the number of studies discussing lung cancer is vast, treatments efficacy is still suboptimal due to the wide range of factors that affect the patient's outcome.

To evaluate the effects of X radiation (X-rays), in two lung cancer cell lines after irradiation, two of non-small cell lung cancer (H1299 and A549 cells) namely in cell viability, proliferation and death. We also wanted to study some of the mechanisms involved, the role of oxidative stress and mitochondrial potential.

The assays were performed after the cell lines were exposed to 4MeV RX in the Varian 600C Linear Accelerator 12D10. Assays included control cells (absence of radiation) and cells irradiated with various doses from 0.5 to 60 Gy. Cell survival was studied by clonogenic assay, plated immediately after radiation and incubated for 12 days (37°C, 5% CO₂). Measurement of RX impact on intracellular activities was achieved by using flow cytometry (FC) after an incubation period of 48 hours. Cell death was evaluated using double staining with AnnexinV (AV)/ Propidium Iodide (PI). Cell cycle was performed with PI/RNase assay. By using FITC-conjugated monoclonal antibodies the quantity of BAX and BCL-2 was determined and subsequently a BAX/BCL-2 ratio was calculated. To evaluate OS was determined, by FC, the

superoxide anion, peroxides and reduced glutathione levels using the probes, dihydroethidium, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate and orange mercury, respectively. We also evaluate mitochondria membrane potential (MMP) by FC, using the fluorescent probe, 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl benzimidazolcarbocyanine.

X-rays induces a decrease in cell proliferation and viability in a dose, time and cell line dependent manner, inducing cell death preferentially by apoptosis. These anti-proliferative and cytotoxic effects are in agreement with the observed cell cycle arrest. However, our results show that A549 is more sensitive to cell death induced by radiation than H1299 cells. These results may be related with differences in the p53 expression or stress oxidative response and could contribute to radiotherapy failure in this type of cancer.

Our results suggest that X-rays leads to a decrease in LC cells viability inducing cell death mainly by initial apoptosis. However, the sensibility and/or resistance to radiation may be dependent on molecular LC characteristics which could influence the response to radiotherapy and consequently treatment success.

Índice

1.INTRODUÇÃO	1
1. Cancro	3
1.1. Epidemiologia das doenças neoplásicas	4
2. Cancro do pulmão	6
2.1. Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células.....	6
2.2. Cancro do Pulmão de Pequenas Células	7
3. Diagnóstico e Tratamento para Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células	7
4. Radiação ionizante	8
5. Tratamento com radiação ionizante	12
7. Morte celular.....	14
8. Stresse oxidativo	18
9. Ciclo celular	20
2.OBJETIVOS	23
3.MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Linhas celulares	29
3.3. Preparação das suspensões celulares	31
3.4. Ensaio do Alamar Blue	32
3.5. Ensaio clonogénico.....	33
3.6. Citometria de fluxo.....	34
3.6.1. Avaliação do tipo de morte celular.....	35
3.6.2. Detecção das espécies reativas de oxigénio (ROS).....	38
3.6.2.1.Detecção de peróxidos intracelulares.....	38
3.6.2.2. Avaliação da produção do radical superóxido no meio intracelular	40
3.6.3. Avaliação do Potencial Membrana Mitocondrial	41
3.6.4. Expressão de BAX/BCL-2.....	43
3.6.5. Avaliação do Ciclo celular	44

3.8. Avaliação da Citotoxicidade	45
3.9. Análise estatística.....	46
4.RESULTADOS	47
4.1. Viabilidade e proliferação celular	49
4.3. Tipo de Morte	53
4.4. Morfologia Celular	55
4.5. Ciclo Celular	58
4.6. Glutaciona e Espécies Reativas de Oxigênio.....	59
4.7. Expressão de BAX/BCL-2.....	61
4.8. Potencial de Membrana Mitocondrial	64
4.9. Citotoxicidade Celular	65
5.DISSCUSSÃO	71
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	83
BIBLIOGRAFIA	87
ANEXOS.....	97

Abreviaturas

Abs – Absorvância

ALK – Anaplastic lymphoma kinase

ATM – Ataxia telangiectasia mutated cinase

ATP – Adenosina trifosfato

AV – Anexina V

BAX – BCL-2 associated X protein

BCL-2 – B-cell lymphoma-2

CAT – Catalase

CDKs – Cinases ativadas por ciclinas

Cds1 – Phosphatidate cytidylytransferase

CF – Citometria de fluxo

CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Cit-c – Citocromo c

Cox-2 - Ciclooxigenase-2

CP – Cancro do pulmão

CPNPC - Cancro do pulmão de não pequenas células

CPPC – Cancro do pulmão de pequenas células

DCFH – Diclorofluorescina

DCFH-DA – 2',7'- Diclorofluorescina acetato

DHE – Dihidroetídeo

DL50 – Dose Letal para 50%

DMEM-HG – *Dulbeneco's modified eagle's medium-high glucose*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSB – Double strand breaks

EGFR – Epidermal growth factor receptor

Fas – Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6

FBS – Soro fetal bovino (do inglês *Fetal Bovine Serum*)

FGF – Fibroblast growth factors

FITC – Fluorescein isothiocyanate

FS – Fosfatidilserina

GSH – Glutathiona redutase

Gy – Gray

HMP – High melting point

IP – Iodeto de propídeo

JC1 – 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide

LDL – Low-density lipoprotein

LMP – Low melting point

M – Mitose

MAPK – *Mitogen activated protein kinases*

MDM-2 – Mouse double minute 2 homolog

MRI – Magnetic resonance imaging

MUs - Motor *units*

NOS – *Not otherwise specified*

OMS – Organização mundial de saúde

P53 – Proteína supressora tumoral

PARP – Poly (ADP-ribose) polymerase

PBS – *Phosphate buffered saline*

PE – *Plate efficiency*

PET/CT – Positrons emission tomography/ computed tomography

PMM – Potencial de membrana mitocondrial

Puma – P53 upregulated modulation of apoptosis

RB1 – Retinoblastoma 1

RI – Radiação ionizante

ROS – Espécies reativas de oxigénio

RPMI – *Roswell park memorial institute medium*

RX – Radiação X

S – Síntese

SF – *Survival factor*

SOD – Superóxido dismutase

SSB – Single strand breaks

T.A. – Temperatura ambiente

TP53 – Proteína tumoral 53

UV – Ultra-violeta

VEGF – *Vascular endothelial growth factors*

1.Introdução

1. Cancro

O cancro é uma patologia que se caracteriza por uma proliferação celular descontrolada, apresentando elevada incidência e prevalência no mundo atual, constituindo uma das principais causas de morte. Por norma é uma doença prolongada no tempo, requerendo anualmente elevado consumo de recursos humanos e económicos pelos sistemas de saúde (American Society for Therapeutic Radiology and Oncology, 2012).

O cancro é uma doença que pode ter origem em diversos factores. Podendo ser provocado por causas genéticas ou causas ambientais. Esta doença poderá envolver a sobreexpressão e inactivação de diferentes genes, originando células independentes do controlo local e central do organismo (Bower & Waxman, 2006).

Os oncogenes identificados em diferentes trabalhos envolvendo vírus tumorais, demonstraram contribuir para a autonomia do cancro devido à produção de fatores de crescimento e/ou presença de recetores de membrana plasmática, componentes das vias de transdução de sinais ou de fatores de transcrição (Bower & Waxman, 2006, Simms *et al.*, 1980).

A nível ambiental podem igualmente reunir-se diversas condições favoráveis à formação de células tumorais. Estas condições poderão ser divididas em físicas, químicas ou biológicas. A radiação é um carcinogénio de origem física e está presente nos mais diversos locais (radiação X (RX), radiação gama, radiação corpuscular resultante do decaimento de isótopos ou luz ultra violeta (UV)). A carcinogénese química é um processo pelo qual um químico desenvolve uma série de reações na célula que irão levar à carcinogénese. Este processo caracteriza-se por três diferentes fases, a fase de iniciação, a fase de promoção e a fase de progressão. Quanto às causas biológicas, estas podem ser as mais diversas, destacando-se os vírus (human papiloma

virus, hepatite B e C, virus herpes humano 4 e 8 entre outros), bactérias ou helmintas oncogénicos (Bower & Waxman, 2006).

Diversos processos metabólicos poderão apresentar-se alterados nas células tumorais, dando origem, nomeadamente, a um aumento de consumo de glicose (Caims *et al.*, 2011).

A maioria dos tumores sólidos apresenta uma grande quantidade de vasos sanguíneos altamente permeáveis. Este processo de formação destes novos vasos é denominado de neoangiogénese, e é de crucial importância para o crescimento dos diferentes tumores. Para além do crescimento tumoral, a angiogénese encontra-se ainda relacionada com a disseminação de células do tumor, visto que a partir deste processo surge uma forma bastante eficaz das células tumorais entrarem na corrente sanguínea, potenciando a metastização. Tendo sido já descritos vários de fatores angiogénicos, entre eles, os mais conhecidos são os pertencentes à família dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF do inglês *fibroblast growth factors*) e do fator de crescimento de vasos endoteliais (VEGF do inglês *vascular endothelial growth factor*). Os fatores angiogénicos poderão ser produzidos pelas células endoteliais ou por células recrutadas pelo tumor, tais como macrófagos ou linfócitos (Zetter, 1998).

1.1. Epidemiologia das doenças neoplásicas

De acordo com as estatísticas mundiais, as doenças neoplásicas ocupam o segundo lugar de causas de morte, seguidamente às doenças cardiovasculares, e os tipos de cancros mais diagnosticados são o cancro do pulmão (CP) no homem e o cancro da mama no caso da mulher, sendo estes dois tipos os que apresentam uma elevada taxa de mortalidade juntamente com o cancro do fígado e intestino (WHO, 2014).

A prevalência mundial destas doenças oscila de acordo com a região. A maior percentagem de casos observa-se nos países desenvolvidos, sendo que é nestes onde a esperança média de vida é igualmente superior, entre outros fatores (Jemal *et al.*, 2011)

Em Portugal, 21,5% das mortes são devidas a cancro e, dentro destas, 13,9% ocorrem devido a CP, sendo só ultrapassado pelo cancro colorretal (Araújo *et al.*, 2009).

No acesso ao tratamento de cancro observa-se uma desigualdade entre os diversos países, verificando-se um menor acesso nos países em desenvolvimento. Em relação ao acesso à radioterapia, na figura 1 podemos constatar a diferença no número de pessoas por centros de radioterapia em diferentes países, ao qual se verifica uma escassez destes centros em muitos países, principalmente no continente africano (Jemal *et al.*, 2011).

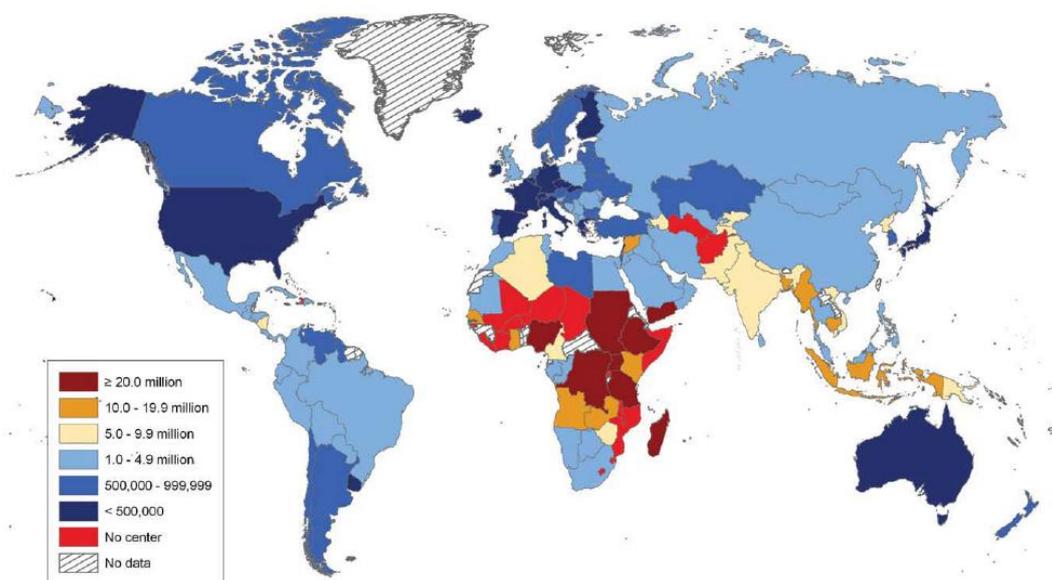


Figura 1 - Número de habitantes por cada centro de radioterapia no mundo (Jemal, 2011). *et al.*

2. Cancro do pulmão

O cancro do pulmão (CP) é o cancro com maior incidência se considerarmos ambos os sexos. Estima-se que em 2014, esta seja a neoplasia com uma taxa de mortalidade mais elevada, com cerca de 19,4% de todos os tipos de cancro (WHO, 2014).

Existem diferentes tipos de CP, podendo ser classificados em cancro do pulmão de não pequenas células (CPNPC) e cancro do pulmão de pequenas células (CPPC) e

O tabaco é uma das principais causas de desenvolvimento de CP, sendo que 50,96% dos doentes são fumadores e 24,78% são ex-fumadores (Hespanhol *et al.*, 2013).

A radioterapia (RT) é um tratamento que pode ser utilizado para este tipo de cancro dependendo do estágio em que se encontra, e é normalmente utilizada como terapia adjuvante (Bower & Waxman, 2006).

2.1. Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células

O CPNPC representa cerca de 85% dos cancros do pulmão que são diagnosticados, e esta neoplasia é geralmente menos agressiva do que o CPPC, pois habitualmente desenvolve-se e metastiza mais lentamente. O CPNPC pode ser ainda subdividido em diferentes subtipos, o adenocarcinoma, o carcinoma de células escamosas, o carcinoma de células grandes e o carcinoma *Not Otherwise Specified* (NOS). Estes subtipos de CP apresentam características morfológicas distintas bem como diferentes resistências à terapia. O CP, poderá ainda apresentar-se numa forma mista, significando uma mistura das duas formas (American Cancer Society, 2012).

2.2. Cancro do Pulmão de Pequenas Células

O CPPC apresenta uma incidência de cerca de 15% do total de casos de CP e é caracterizado pelos seus efeitos clínicos rápidos e agressivos (Bower & Waxman, 2006).

Por norma, o CPPC apresenta resistência à quimioterapia, o que se traduz por uma elevada taxa de mortalidade. Apenas 5% dos doentes diagnosticados sobrevivem dois anos após o diagnóstico, sendo que cerca de 95% das pessoas com este tipo de tumor apresenta metástases à data do diagnóstico (Jemal *et al.*, 2011).

Recentemente foram descobertas novas mutações em diferentes genes como o gene que codifica a *proteína tumoral 53* (TP53) e o gene do *retinoblastoma 1* (RB1), que ocorrem no CPPC e que poderão ser responsáveis pela sua elevada resistência. Estas mutações genéticas parecem ainda alterar o transporte e a atividade dos fármacos utilizados na terapêutica (Peifer, M., 2012).

3. Diagnóstico e Tratamento para Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células

O diagnóstico desta neoplasia deve ser realizado, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), recorrendo a diversos exames complementares de diagnóstico, como por exemplo, técnicas de imagiologia molecular, anatomia patológica ou citologia (Bower & Waxman, 2006).

O diagnóstico e estadiamento do CPNPC pode incluir biopsia, broncoscopia, tomografia por emissão de positrões co-registada com a tomografia computadorizada (PET/CT do inglês *positron emission tomography/computed tomography*) e ressonância magnética nuclear. No caso de metastização à distância é necessário a realização de uma tomografia computadorizada abdomino-pélvica (Brady, 2011; Ceresoli, 2012).

O subtipo histológico é um fator a ter em conta para o tratamento do tumor. O adenocarcinoma, os carcinoma das grandes células e o carcinoma *NOS* requerem muitas vezes análise de mutações do gene que codifica o *epidermal growth factor receptor* (EGFR) e do oncogene *anaplastic lymphoma kinase* (ALK) para definir qual o melhor tratamento a realizar (Kroemer *et al.*, 2009).

Após o diagnóstico, a extensão anatómica da doença é descrita através da classificação TNM, onde T se refere a tumor, N a gânglios linfáticos e M a metástases, o que tem implicações importantes no estadiamento e consequente prognóstico do CP. Adicionalmente, cada um destes pontos (T, N e M) têm uma classificação de 1 a 4, que revela qual o grau de magnitude de determinado tumor (Crinò *et al.*, 2010).

A cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia são os tratamentos mais frequentemente utilizados, no entanto poderão apresentar diversos efeitos secundários, pelo que se revela necessário estudar estes efeitos, de forma a os podermos minimizar (Bower & Waxman, 2006).

A cirurgia é, normalmente, limitada a doentes com estadio limitado da doença, ou seja, T1N0M0 e T2M0N0, o que significa que não existe metastização à distância. Se o doente não apresentar critérios para ser operado, devido a uma qualquer condição clínica desfavorável, poderá considerar-se a radioterapia radical, com intuito curativo. A radioterapia paliativa é outro tipo de aplicação para utilização da radiação ionizante, não no sentido de curar o doente, mas antes no sentido de controlar o crescimento tumoral e, eventualmente, minimizar os efeitos do cancro (Bower & Waxman, 2006).

4. Radiação ionizante

A radiação empregue no tratamento do cancro é a radiação ionizante (RI). Designa-se por RI toda e qualquer tipo de energia que se propaga através de ondas

eletromagnéticas (RX ou gama) ou partículas (neutrões, prótons, β ou α) que é capaz de arrancar eletrões a átomos ou moléculas com as quais interage (Forshier, 2002).

A RI está presente no quotidiano, podendo provir tanto de vias naturais como artificiais. Este tipo de radiação é utilizada pelo homem nas mais diversas atividades como em medicina, na agricultura, na indústria, entre outras. Na natureza, existe RI, que poderá derivar da radiação cósmica ou do decaimento de elementos radioativos, como é o caso do radão, um gás radioactivo que resulta do decaimento do urânio. Os átomos podem desintegrar-se espontaneamente e o excesso de energia resultante desse processo poderá resultar em emissão de RI. A exposição a radiação ionizante está relacionada com o aparecimento de cancro, por exemplo, a exposição a níveis elevados de radão aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de CP (WHO, 2011).

Quando a RI excede determinados níveis de segurança, esta poderá provocar lesões nos indivíduos a ela expostos, mesmo as baixas doses que poderão aumentar o risco de efeitos a longo prazo, como é o caso das doenças oncológicas. A exposição à radiação ionizante poderá ocorrer internamente ou externamente.

A RI possui diversos efeitos celulares, podendo estes ser diretos, indiretos, *bystander* ou originar uma resposta adaptativa (figura 2). Os efeitos diretos são provocados na célula após deposição de energia pela radiação, que diretamente interage com as biomoléculas, ionizando-as. As cadeias do ácido desoxirribonucleico (DNA do inglês *deoxyribonucleic acid*) podem, durante a irradiação, sofrer quebras numa ou em ambas as cadeias que formam a dupla hélice. Os efeitos indiretos não provocam lesão diretamente no DNA, mas sim através das espécies reativas de oxigénio (ROS do inglês *Reactive Oxygen Species*) que são produzidas pela radiólise da água, associada ou não ao efeito do oxigénio, e que poderão lesar o DNA, oxidando-o. As lesões celulares podem ser também causadas pelo efeito *bystander* que é um efeito dependente de

fatores e de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio que são libertados pelas células irradiadas. Todos estes tipos de efeitos podem originar a uma resposta adaptativa das células, ativando mecanismos de reparação e, caso estes mecanismos sejam suficientes, a célula poderá continuar a proliferar e a dividir-se normalmente (Morgan & Sowa, 2005).

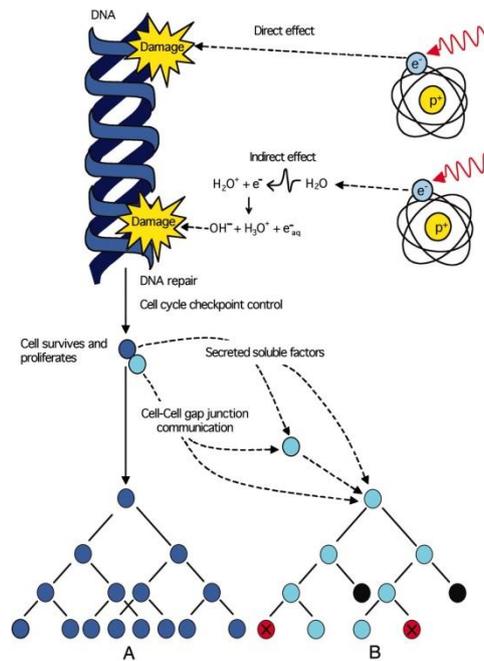


Figura 2 - Representação esquemática dos tipos de efeitos da radiação ionizante. Adaptado de (Morgan WF, and Sowa MB. PNAS 2005;102:14127-14128)

O efeito *bystander* é um processo pelo qual células que não foram irradiadas sofrem influência, indiretamente, pela irradiação de outras células. Vários estudos demonstraram que pela transferência de meio de células irradiadas para células não irradiadas, ocorrem nestas várias alterações. Estes resultados demonstram que poderá ocorrer uma secreção de fatores por parte das células irradiadas para o meio de cultura. Estes fatores libertados poderão induzir morte celular ou ativar outro tipo de mecanismos nas células não irradiadas (Mothersill & Seymour, 1997; Belyakov *et al.*, 2001). As células que estão sujeitas ao efeito *bystander*, poderão apresentar alterações genéticas significativas quando comparadas com as células que não sofreram com este

As proteínas da família das cinases ativadas por fatores relacionados com a divisão celular (MAPK do inglês *Mitogen-activated protein kinases*) apresentam igualmente um papel importante neste processo. Observou-se que após a inibição dos sinais extracelulares relacionados com estas cinases ocorria uma diminuição da resposta *bystander* (Asur *et al.*, 2009).

5. Tratamento com radiação ionizante

A radioterapia tem sido um dos tipos de tratamento mais utilizados para a irradiação de tumores e para o controlo do crescimento tumoral e pode ser utilizada em diferentes tipos de tumores e em diferentes estádios evolutivos da doença. A radioterapia não é seletiva, pelo que se revela essencial ocorrer a delimitação do volume a irradiar (Carvalho, 2002).

A dose aplicada ao tumor deve-se situar entre certos limites. Quando estes são ultrapassados, no caso do limite superior, poderão surgir alguns efeitos não desejados nos tecidos envolventes ao volume irradiado podendo mesmo ocorrer nos casos mais graves, necrose tecidular. Caso a dose depositada não atinja o limite inferior, poderemos estar a contribuir para a indução de radioresistência tumoral (Carvalho, 2002; Brady, 2011).

Assim, a caracterização do tipo tumoral será sempre um fator essencial a ter em conta para o cálculo da dose que um determinado doente irá receber. Outro dos fatores limitantes a ter em consideração é a localização do tumor, pois em determinadas localizações, podem surgir efeitos adversos para o doente a ser tratado (Cronò, 2012).

A terapia convencional normalmente envolve o fracionamento da dose total de radiação a ser recebida. Nesta terapia o doente é sujeito a fracções de 2 Gray (Gy) por dia durante o período de tempo necessário até prefazer a dose total estabelecida.

Normalmente os doentes com CP são tratados por períodos que prefazem aproximadamente 30 dias, o que resulta numa dose total de cerca de 60 Gy (Cronò, 2012).

Para além deste tipo da terapia utilizando um fraccionamento de dose convencional, existem outros tipos de fraccionamento como o hiperfraccionamento ou o hipofraccionamento. No primeiro, o doente recebe doses diárias abaixo da dose convencional, normalmente abaixo de 1,8 Gy. Já no segundo caso, o doente recebe doses mais elevadas por fracção por um menor período de tempo. Existem já estudos que demonstram um aumento do tempo de sobrevida quando comparado com a terapia convencional (Yin *et al.*, 2003; Mello *et al.*, 2003). O hipofraccionamento só é possível, visto que existem técnicas radioterapêuticas específicas que permitem irradiar menos os tecidos sãos, preservando-os (Anthony *et al.*, 2005). Estudos anteriores relacionaram a dose da RI com a proliferação celular (Cohen & Ellwein, 1990; Clowes *et al.*, 1983). Como esperado, com o aumento da dose de radiação observa-se uma inibição do crescimento celular, no entanto este efeito não é linear. Num estudo específico investigadores testaram o efeito no crescimento celular numa linha de astrocitoma humano com uma só dose de RI de 12,5 Gy comparando com doses fraccionadas de 4x5Gy (dose diária de 5Gy durante 4 dias consecutivos) onde se verificou que as doses fraccionadas apresentavam maior efeito na inibição da proliferação celular, ainda assim com um menor efeito de toxicidade (Bucci *et al.*, 2006).

A dose equivalente em frações de 2 Gy (BQD₂ do inglês *biological equivalent dose in 2 Gy fractions*), corresponde à dose que é fornecida ao doente, se esta fosse fornecida de acordo com a terapia convencional, que para estudos comparativos é amplamente usada. Esta calcula-se de acordo com a fórmula:

$$EQD_2 = \frac{n \times d \times \left(d + \frac{\alpha}{\beta}\right)}{\left(2 + \frac{\alpha}{\beta}\right)} \quad \text{Equação 1}$$

onde n representa o número de frações, d a dose que é fornecida ao doente em cada fração, o α/β é um parâmetro de cada tipo de tumor, que está diretamente relacionado com a radioresistência do tumor (De Leeuw *et al.*, 2010; Rades & Schild, 2006).

Quando é efetuado o hipo ou o hiperfracionamento, terá que se ter sempre em conta estes valores, de modo a tentar perceber quais os efeitos que esse fracionamento irá ter. Nos últimos anos têm sido realizados diversos estudos, na tentativa de clarificar qual o impacto da alteração do modo de fracionamento, na sobrevida dos doentes (Forman *et al.*, 1993; Cox *et al.*, 1990; Pahlajani *et al.*, 2012; King *et al.*, 2009).

7. Morte celular

A morte celular é o processo pelo qual são eliminadas as células e esta poderá ocorrer por vários mecanismos entre os quais salientamos a apoptose, a necrose ou a autofagia, sendo que a morte celular ocorre principalmente pelos dois primeiros mecanismos referidos e está representada na figura 4. Estes processos têm mecanismos de ação diferentes assim como consequências finais distintas (Kroemer *et al.*, 2009).

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo de autodestruição celular que requer uma prévia sinalização celular que desencadeia uma cascata de reações para a ativação deste mecanismo. Podendo ser induzida através da via intrínseca, via extrínseca ou ainda mediada por citotoxicidade (via perforina/granzina). As vias intrínseca e extrínseca, por norma, envolvem a ativação de caspases e consequente destruição das células. Este processo caracteriza-se por ocorrer

fragmentação do DNA, condensação da cromatina, seguido pela fragmentação do núcleo e posterior fragmentação celular (Kanduc *et al.*, 2002; Watson *et al.*, 2000; Lorimore *et al.*, 2001).

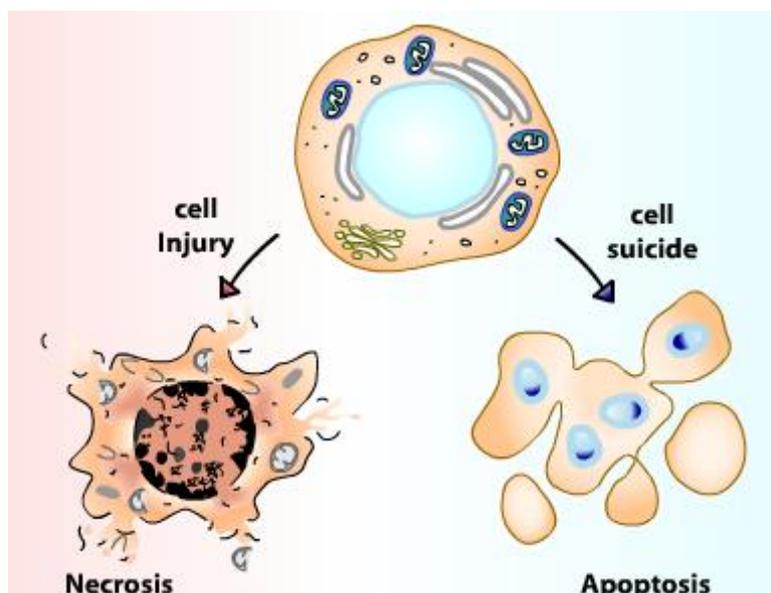


Figura 4 - Diferenças morfológicas entre o processo de apoptose e de necrose. Adaptado de <http://drrajivdesaimd.com/tag/senescence/>.

As células apoptóticas apresentam diversas alterações celulares onde podemos destacar as alterações na fluidez da membrana, na carga distribuída à superfície, na conformação das proteínas da membrana e mesmo na assimetria da bicamada lipídica. Estas alterações tornam possível detetar marcadores específicos de apoptose nas células que iniciaram este processo (Gaudenzi *et al.*, 2004).

A necrose é o tipo de morte celular provocada por diversos fatores fisiológicos ou externos. No caso da necrose, ocorre um colapso da membrana plasmática o que faz com que haja libertação do conteúdo citoplasmático. Neste processo os conteúdos libertados têm dificuldade em ser fagocitados, devido a uma falta de sinalização das células do sistema imunitário (Kanduc *et al.*, 2002).

A autofagia é o processo de degradação celular que envolve mecanismos associados ao lisossoma. Este processo é regulado por fatores de crescimento e pela insulina envolvendo uma série de segundos mensageiros. A morte celular por autofagia pode ser provocada por dois fenómenos distintos, podendo ativar a apoptose ou realizar a autofagia em larga escala, provocando lesões irreversíveis na célula. A autofagia está a ser estudada para possível futura utilização no tratamento de alguns casos de cancro (Klionsky, 2007).

Estudos recentes sugerem que a indução da apoptose em células tumorais apresenta um papel crucial na eficácia da radioterapia (WHO, 2011). Dependendo da intensidade de radiação, as células podem ser conduzidas para a apoptose ou para a necrose. De acordo com o trabalho apresentado por Bucci *et al.*, este descreveu que quando utilizada a menor dose de radiação, se observava um número superior de células em apoptose do que no caso em que se usaram maiores doses, situação em que as células morriam principalmente por necrose. Estes resultados foram comprovados recorrendo a western blot para a quantificação de caspase 3, os quais revelaram existir um aumento desta caspase ativa quando se utilizaram doses mais baixas, assim como uma diminuição da proteína BCL-2 (do inglês, *B-cell lymphoma-2*) e um aumento da proteína BAX (do inglês *BCL-2-associated X protein*)(Bucci *et al.*, 2006).

A proteína supressora tumoral P53 ativa três vias celulares opostas em resposta à lesão no DNA. Uma destas vias resulta no bloqueio do ciclo celular, outra na reparação celular e uma terceira na indução de morte celular por apoptose. A probabilidade de um indivíduo apresentar doença neoplásica parece estar relacionada com a presença desta proteína, visto vários estudos terem descrito que a sua expressão está inversamente relacionada com a incidência de cancro. Lesões no DNA induzem a ativação de uma série de cinases e de outras proteínas que, por sua vez, poderão modificar a proteína

P53, assim como a proteína MDM-2 (do inglês, *mouse double minute 2 homolog*) na célula. A P53 regula a transcrição de diferentes genes (p21, MDM-2, ciclina, *P53 upregulated modulator of apoptosis* (Puma), Noxa, *tumor necrosis factor receptor superfamily member 6* (Fas)) envolvidos no bloqueio do ciclo celular. A MDM-2 funciona como um regulador negativo da P53. Este regulador da P53 é fosforilado pela *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) cinase o que leva à sua autoubiquitinação e degradação, aumentando os níveis de P53 no citoplasma (Feng *et al.*, 2008).

Como previamente mencionado, um dos mecanismos envolvidos na apoptose é a ativação das várias caspases. A ativação das caspases de 1 a 10 foi descrita principalmente associada a agentes físicos e químicos. Em particular a caspase-3, que se encontra na forma inativa (pró-caspase-3) no citoplasma e que é convertida na forma ativa por proteólise, nas células em apoptose. A proteína PARP (do inglês, *poly (ADP-ribose) polymerase*), é um dos substratos da caspase-3, e é degradada por quebra proteolítica, revelando-se um importante marcador de apoptose (Ferrer, 1999).

O gene *BCL-2* é distinto de outros oncogenes existentes. A proteína BCL-2 está relacionada com o aumento da expressão da transcrição de ácido ribonucleico (RNA do inglês *ribonucleic acid*) do gene *Bcl-2* e parece estar envolvida na gênese de tumores. Elevados níveis de BCL-2 previnem a morte celular numa grande variedade de situações de stresse, como a presença de químicos citotóxicos, de radiação ionizante e de uma variedade de fármacos quimioterapêuticos (Ikegaki *et al.*, 1994; Watters, 1999).

Estudos anteriores demonstraram que mais de 90% das células de CPPC expressam a proteína BCL-2 em maior quantidade. Um estudo em que no CPPC se usou uma estratégia *antisense*, de modo a obter uma baixa expressão de BCL-2, demonstrou que havia uma diminuição de sobrevivência celular (Ziegler *et al.*, 1997).

8. Stresse oxidativo

O stresse oxidativo é o estado de um organismo quando se observa um desequilíbrio entre as espécies oxidantes e as antioxidantes. No organismo existem normalmente mecanismos pelos quais estas ROS e as espécies reativas de nitrogénio (do inglês *reactive nitrogen species* – RNS) são reguladas (Kirkinezos & Moraes, 2001).

O controlo homeostático das vias normais de crescimento celular demonstrou encontrar-se ligado e dependente de agentes oxidantes. Anteriormente, os agentes oxidantes eram associados apenas a degeneração celular (Valko *et al.*, 2006).

A mitocôndria é um organelo preferencialmente responsável pela produção de ROS. Durante a fosforilação oxidativa poderão ocorrer fugas de prótons e de eletrões da cadeia respiratória, o que poderá causar diversas lesões celulares. Enquanto a libertação de prótons está associada à termogénese, a fuga de eletrões está associada à formação de ROS. Uma disfunção mitocondrial ou metabólica pode estar na origem do aumento de ROS ou/e RNS (Kirkinezos & Moraes, 2001).

As ROS são espécies químicas altamente instáveis como o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$) ou o radical hidroxilo (HO^{\bullet}) ou, pelo contrário, têm um longo período de vida e se difundem rapidamente, como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ou o monóxido de azoto (NO^{\bullet}) (Valko *et al.*, 2006).

Quando ocorre um excesso de ROS ou de RNS, vários mecanismos antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos são ativados. Como exemplos de antioxidantes não enzimáticos são as formas ativas de várias vitaminas, como a A e a C, entre outras. Por outro lado existem os antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), ou a glutatona redutase (GSH). Apesar de

existirem estas defesas antioxidantes, por vezes não são suficientes, o que gera um estado de desequilíbrio e, por consequência, o stresse oxidativo (Valko *et al.*, 2006).

A enzima SOD é responsável pela conversão do radical $O_2^{\bullet-}$ no radical HO^{\bullet} , uma das ROS mais reactiva. O radical HO^{\bullet} por sua vez é transformado pela CAT em H_2O_2 uma espécie que não reage diretamente, mas que se difunde facilmente, podendo entrar no núcleo da célula e reagir através da reação de Fenton (equações 2 e 3).



Como resultado desta reação, são produzidas no núcleo espécies reativas altamente instáveis que poderão lesar o DNA, podendo ser precursoras de várias patologias como é o caso do cancro. As espécies reativas podem ainda lesar as mais variadas biomoléculas, desde proteínas, a glícidos ou lípidos.

As espécies radicalares formadas podem reagir com ácidos gordos polinsaturados e induzir a peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica, assim designada devido a parte dos seus intermediários e produtos finais serem peróxidos, ocorre através de um conjunto de reações em cadeia que inclui três fases distintas, a iniciação, a propagação e a terminação.

Este processo inicia-se pela oxidação de um lípido seguido de uma reação em cascata onde se originam outros tipos de radicais. A fase de terminação dá-se quando os radicais formados reagem entre si ou com um antioxidante. Como produtos finais da peroxidação lipídica poderemos ter aldeídos, cetonas, éteres, álcoois e hidrocarbonetos (Valko *et al.*, 2006).

A peroxidação lipídica pode ainda induzir diversas lesões celulares, tanto a nível das membranas como dos lípidos intra e extracelulares. Exemplos destas lesões são as alterações a nível da viscosidade membranar, do transporte iónico, e a nível das atividades enzimáticas. Os aldeídos podem difundir-se através da membrana originando efeitos citopatológicos ou oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL do inglês *low-density lipoprotein*) do plasma (Barrera, 2011).

Durante o processo de degeneração celular ocorre um aumento da produção de ROS que pode afetar os parâmetros mitocondriais como a produção de adenosina trifosfato (ATP), ou o potencial de membrana, entre outros (Toyokuni *et al.*, 1995).

9. Ciclo celular

O ciclo celular é um processo biológico que permite a todas as células originar células filhas geneticamente idênticas. Torna-se necessário entender o ciclo celular normal para compreender de que forma o tratamento com radiação o poderá influenciar. O ciclo celular desenvolve-se em três fases diferentes, fase G₀/G₁, fase de síntese (S) e por fim G₂/Mítose (M), representadas na figura 5 (Azevedo, 2005).

Na fase G₀ a célula ainda não iniciou a sua divisão. Nesta fase a célula poderá receber um estímulo para se começar a dividir e entrar na fase G₁. Em alternativa, se este estímulo não ocorrer, a célula não se dividirá. Após o estímulo, já na fase G₁, existe uma grande atividade metabólica, quer a nível da transcrição de RNA quer a nível da tradução de proteínas. Esta fase tem uma duração que varia entre as 18 e as 30 horas. Segue-se a fase S, onde ocorre a replicação do DNA, o que se traduz na duplicação da quantidade de DNA (de 2n passa para 4n) a qual tem uma duração que varia entre as 18 e as 20 horas. A fase seguinte é a fase G₂, que é relativamente mais rápida em comparação às fases anteriores, e que faz a transição entre a fase S e o início da divisão

mitótica. Finalmente a fase M ou fase de mitose, durante a qual a célula se divide. Esta fase contempla vários passos que são a prófase, a metáfase, a anáfase e a telófase. Após a telófase são obtidas duas células idênticas (American Cancer Society, 2012; Azevedo, 2005).

Apesar de a radiação ser eficaz na inibição do crescimento de tumores, a radiação poderá igualmente afetar a normal proliferação das células. Por isso, revela-se importante balancear a destruição de células tumorais com uma minimização das lesões induzidas no tecido normal (Forshier, 2002).

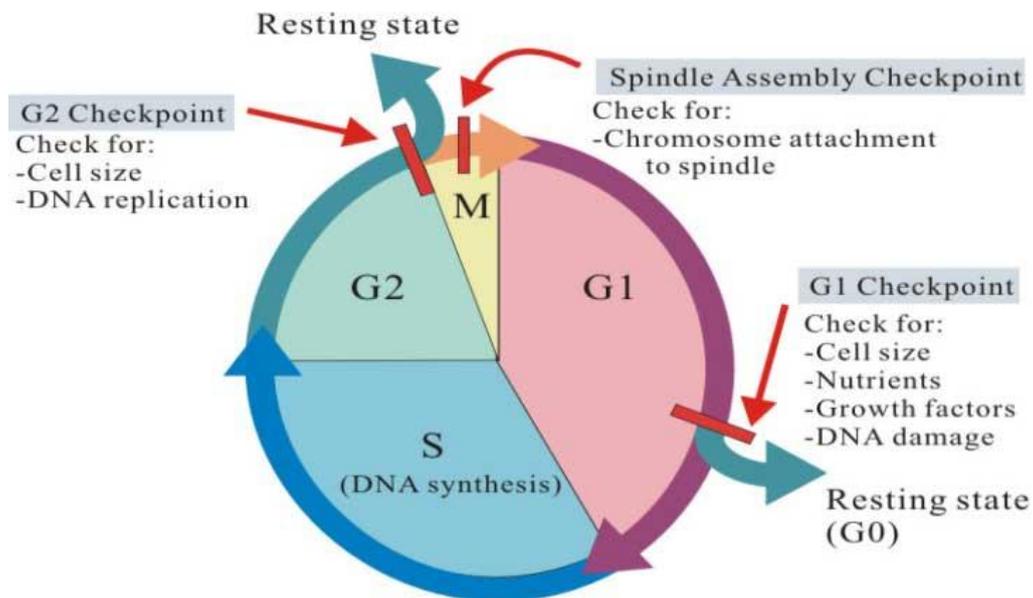


Figura 5 - Representação do ciclo celular e dos seus pontos de controlo. Adaptado de <http://gleesonbiology.pbworks.com/w/page/7537859/C9>.

Durante o processo de divisão celular ocorrem diversos controlos em pontos críticos (Figura 5). Nestes pontos críticos, de transição entre diferentes fases, existem mecanismos que regulam e reparam as lesões que possam provir do stresse oxidativo, da exposição a radiação ou de deficiências no metabolismo celular, entre outras. Se forem detetadas anomalias nos “*checkpoints*” do ciclo celular a divisão celular termina

nesse ponto, ou então a divisão é bloqueada, enquanto são ativados os mecanismos de reparação celular para que a divisão possa continuar a ocorrer (Novák *et al.*, 2002).

Existem inúmeras vias de sinalização envolvidas no bloqueio do ciclo celular, quando a integridade genômica está ameaçada, o que impede a transmissão de mutações genéticas às gerações celulares subsequentes. Falhas nestes sistemas de controle da divisão celular poderão estar associadas à carcinogénese, pois apesar da célula se encontrar alterada, a sua divisão continua a ocorrer (Novák *et al.*, 2002).

O tratamento com radiação ionizante causa atrasos na proliferação celular via ativação de diversos *checkpoints* nas fases pré-G0, G1, S e G2/M. Este processo ocorre na tentativa de reparar o DNA que se lesou por efeito da radiação ionizante. Dependendo da dose de radiação, podem ser ativados diferentes bloqueios no ciclo celular. Por exemplo, com recurso a elevadas doses de radiação, alguns autores mencionam que o principal *checkpoint* ativado é na passagem de G2 para M (Yannamori, 2012).

Todas as passagens das diversas fases do ciclo celular dependem de cinases ativadas por ciclinas (CDKs). Assim sendo, a ativação de *checkpoints* requiere a inibição dos complexos ciclina-CDK. A irradiação de células ativa diferentes mecanismos de ativação deste processo, como a ativação dos inibidores das CDKs, as alterações da fosforilação e a atividade da enzima CDK (Joiner & Kogel, 2009; Wang *et al.*, 2000).

2.Objetivos

O tratamento para o cancro do pulmão depende do tipo de tumor, das suas dimensões e do estadiamento aquando do diagnóstico. Para tumores pequenos e delimitados o tratamento passa maioritariamente por cirurgia, radio e quimioterapia. Caso os tumores ultrapassem a fase cirúrgica, o tratamento fica limitado a radio e quimioterapia de forma paliativa.

A radiação ionizante é utilizada como forma de tratamento para eliminar tumores, assim como para controlar o seu crescimento. Os tratamentos com radiação ionizante para o cancro do pulmão utilizados atualmente são ainda insuficientes para que os doentes apresentem uma taxa de controlo tumoral e uma sobrevivência comparável a outros tipos de tumores.

Com este trabalho pretende-se perceber qual o efeito da radiação ionizante em diferentes linhas de CPNPC, assim como os seus efeitos a nível molecular resultantes deste tipo de terapia. O objetivo foi clarificar e caraterizar quais os efeitos de diferentes doses de RX a nível da viabilidade celular, assim como qual o principal tipo de morte induzida.

Foram ainda avaliadas diversas moléculas relacionadas com o stresse oxidativo, proteínas pró e anti-apoptóticas, potencial de membrana mitocondrial, ciclo celular e lesões no DNA, de modo a melhor compreender, em cada linha celular, quais os mecanismos moleculares e celulares envolvidos.

3.Materiais e Métodos

3.1. Linhas celulares

Para este trabalho recorremos a um sistema *in vitro* que permitiu a sobrevivência, o crescimento e a multiplicação das linhas celulares. As células foram mantidas em condições propícias ao seu crescimento, utilizando meios de cultura específicos, com pH de 7,4, temperatura de 37°C e atmosfera com 5% de CO₂ (Silva, 2012).

Os estudos realizaram-se em linhas celulares distintas, A549 e H1299, ambas culturas aderentes com morfologia epitelial (figura 6). A linha celular A549 teve origem e foi isolada de um indivíduo caucasiano com idade de 58 anos e a linha celular H1299 foi isolada de um indivíduo caucasiano com 43 anos de idade. Ambas as linhas são de adenocarcinoma pulmonar, sendo que a linha H1299 foi isolada de um nódulo linfático deste doente. De referir ainda que as células da linha celular A549 expressam o gene TP53 na forma normal (TP53wt), enquanto as células da linha celular H1299 não expressam (TP53null).

A linha A549 foi cultivada em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (Sigma, 10011277506, St. Louis, USA) e a linha H1299 com *Dulbeneco's Modified Eagle's Medium – High Glucose* (DMEM-HG). Ambos os meios foram suplementados com soro fetal bovino (FBS do inglês *Fetal Bovine Serum* (10% (v/v)) (Sigma, 82024, Taufkirchen, Germany), 400mM piruvato de sódio (Life Technologies, 11360-039, New York, USA) e 1% de uma solução de antibiótico (Sigma, SLBB9277, St. Louis, USA) constituída por 100U/mL de penicilina e por 10µg/mL de estreptomicina (GIBCO 15140-122). Todos os ingredientes foram filtrados na câmara de fluxo, em condições de assepsia e posteriormente conservados à temperatura de 4°C. Para garantir as condições de assepsia os meios foram testados antes de proceder à sua utilização (Silva, 2012).

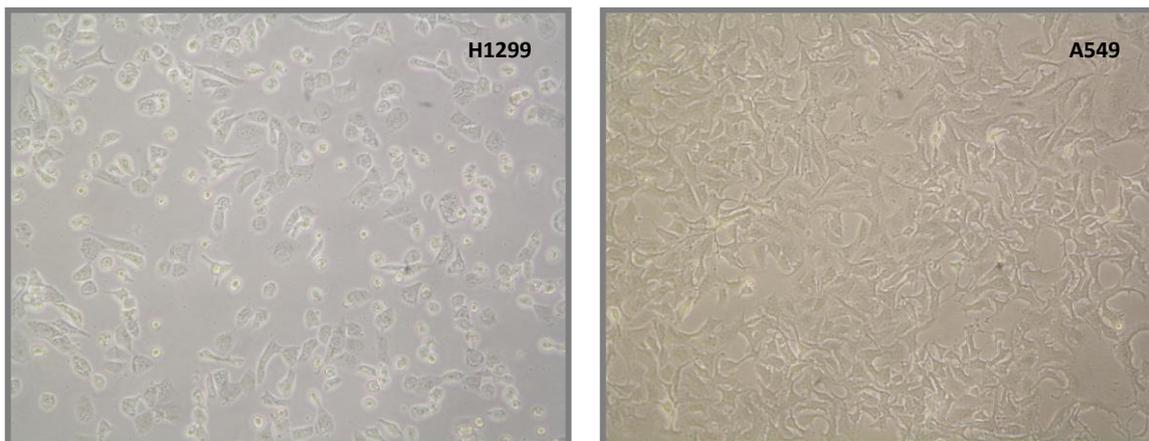


Figura 6 - Fotografias das linhas celulares em estudo (H1299 e A549), obtidas por microscopia ótica com uma ampliação de 100 vezes.

Os ensaios *in vitro* realizaram-se com diferentes tempos de incubação e após a irradiação das culturas às 24, 48, 72, 96 horas e 12 dias.

3.2 Irradiação das culturas celulares

A irradiação foi executada com as células contidas num dispositivo especificamente criado para esse propósito. A irradiação propriamente dita, foi realizada através de um acelerador linear Varian 600C 12D10 (LINAC, Radiology Oncology Systems Inc., San Diego/ U.S.).

As células foram preparadas previamente com uma concentração de $0,5 \times 10^6$ células/mL, e as suspensões foram colocadas em *falcons* ou *ependorfs* e transportadas para o Serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC), convenientemente acomodadas.

As diferentes doses são fornecidas em doses cumulativas que são diretamente proporcionais às *Monitor Units* (MUs). As MUs são o tempo em que o colimador se encontra aberto e que é proporcional à dose de radiação, de acordo com a tabela I.

Tabela I - *Monitor Units* cumulativas para as diferentes doses de RX

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

3.3. Preparação das suspensões celulares

A viabilidade celular é um parâmetro que pode ser medido com recurso a um marcador celular, denominado azul de tripano, e analisado por microscopia. O azul de tripano é um corante de exclusão que apenas é capaz de penetrar nas células não viáveis. Após a entrada pela membrana lesada, este corante atravessa o invólucro nuclear, corando os núcleos de azul. Deste modo as células mortas aparecem coradas e azul enquanto as vivas aparecem brilhantes e não coradas.

Para a realização deste ensaio, foi necessário utilizar uma suspensão celular devidamente homogeneizada, à qual se adicionam igual volume da solução de azul de tripano na concentração de 0,02% em *phosphate buffered saline* (PBS) constituída por 0,1M de fosfato de sódio e 0,15M de cloreto de sódio, com um pH de 7,2. A suspensão celular e o azul tripano diluído foram misturados na proporção de 1:1 e esta mistura foi transferida para o hemocitómetro (Figura 7), onde foi efetuada a contagem recorrendo a um microscópio ótico invertido Motic AE31 (Wetzlar, Alemanha) com uma ampliação de 100x. Relativamente à contagem, foi analisado o número de células viáveis e não viáveis nos quatro quadrantes do hemocitómetro e calculada a concentração celular (Santos, 2012).

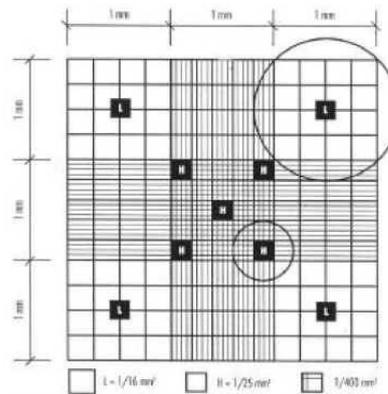


Figura 7 - Representação de um hemocítmetro. Os quatro quadrantes utilizados para a contagem de células estão representados pela letra L. Adaptada de <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/hematologia/hematologia-4.php>.

3.4. Avaliação de viabilidade e proliferação celular

O ensaio do alamar blue permite obter curvas de viabilidade celular das diferentes linhas celulares em estudo, avaliando a atividade metabólica.

Esta solução colorimétrica contém resazurina que, na presença de agentes redutores existentes nas células viáveis, é reduzida com formação de um novo composto chamado resorufina, a qual emite luz numa diferente porção do espectro de luz visível. Deste modo este ensaio permite avaliar indirectamente a da viabilidade celular (figura 8).

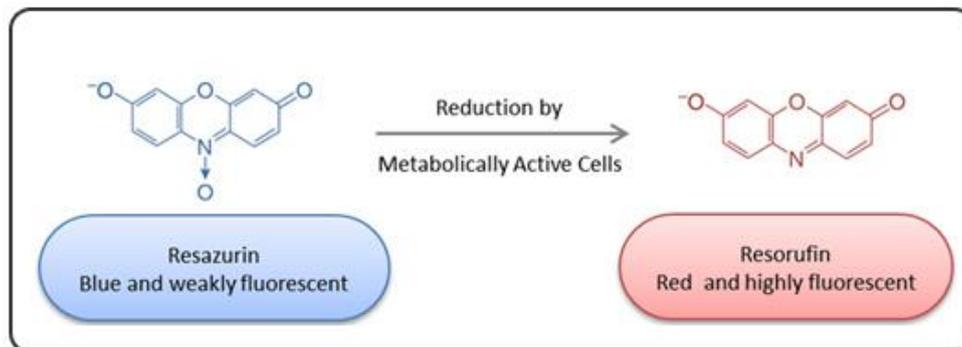


Figura 8 - Redução da resazurina a resorufina por células metabolicamente ativas.

Para realizar este ensaio, após irradiação celular, foram distribuídas 10 000 células por placas de cultura celular de 48 poços e incubadas por 24, 48, 72 e 96 horas. Após o tempo de incubação foi adicionado o corante alamar *blue* aos poços de modo a que a percentagem de corante seja de 10% em relação à quantidade de meio existente no poço. Foi monitorizada posteriormente a mudança de cor do meio, e a partir do momento em que existia uma alteração notória no controlo, foram transferidos 200µL, de todos os poços, para uma placa de 96 poços. Uma vez nesta placa, foi medida a absorvância nos comprimentos de onda de 570 e de 600nm num espetofotómetro. A proliferação celular, em percentagem, foi calculada com base na diferença de absorvâncias da condição em estudo e esta dividida pela diferença de absorvâncias do controlo, representado na equação 4.

$$\text{proliferação \%} = \frac{(\text{Abs}_{570} - \text{Abs}_{600})_{\text{condição}}}{(\text{Abs}_{570} - \text{Abs}_{600})_{\text{controlo}}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

3.5. Avaliação de sobrevivência celular

O ensaio clonogénico permite avaliar a viabilidade celular, sendo avaliada a capacidade das células formarem colónias. Este ensaio é um dos ensaios *gold standard* para avaliar a citotoxicidade induzida pela radiação ionizante (Pantelleva *et al.*, 2003).

A suspensão celular foi colocada em placas de seis poços e incubada a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂ durante sete dias. Ao sétimo dia foram retiradas as placas para se realizar a coloração com violeta de cristal seguida de contagem das colónias após a coloração. Após contagem foi calculada a eficiência da placa (PE do inglês *plate efficiency*) e o fator de sobrevivência (SF do inglês *survival factor*) celular para cada condição em estudo. A eficiência da placa (PE) é calculada através da razão entre o número de colónias contadas dividindo pelo número de células semeadas,

representado na equação 5, e o fator de sobrevivência (SF) foi calculado pela razão entre a PE das colónias tratadas e a PE dos controlos, representado na equação 6. A menor percentagem de formação de colónias corresponde a uma maior citotoxicidade (Franken *et al.*, 2006).

$$PE = \frac{\text{Número de colónias contadas}}{\text{Número de células semeadas}} \quad \text{Equação 5}$$

$$SF = \frac{\text{PE de determinada condição}}{\text{PE do controlo}} \quad \text{Equação 6}$$

3.6. Citometria de fluxo

Para proceder à análise de vários parâmetros celulares recorreu-se à citometria de fluxo (CF). No citómetro a suspensão celular é aspirada, atravessando uma câmara onde se dá a passagem célula a célula, intercetando o feixe de radiação laser, processo representado na Figura 9 (Mey *et al.*, 2012).

O citómetro é constituído por três sistemas principais, o fluídico, o ótico e o electrónico. O sistema fluídico é o responsável por transportar as suspensões até ao laser, o sistema ótico consiste numa série de lasers que irradiam as amostras e por filtros óticos do qual resultam sinais apropriados para os detetores. Por último, os sistemas eletrónicos os quais fazem a conversão dos sinais luminosos em sinais eletrónicos que poderão ser processados pelo computador (Biosciencies BD, 2000).

Usaram-se para as várias determinações, sondas e anticorpos, que se irão ligar e, conseqüentemente reagir com determinadas moléculas, permitindo a diferenciação seletiva de subpopulações celulares. A fluorescência destes compostos é então medida

por fotomultiplicadores, através de um sistema de lentes, espelhos dicroicos e filtros óticos (Biosciencias BD, 2000).

Para a análise das amostras foram obtidos 10^4 eventos, com o auxílio do programa *CellQuest*TM. Para análise e quantificação da informação utilizou-se um software específico que corre em computador dedicado (Paint-a-Gate 3.02, Machintosh Software).

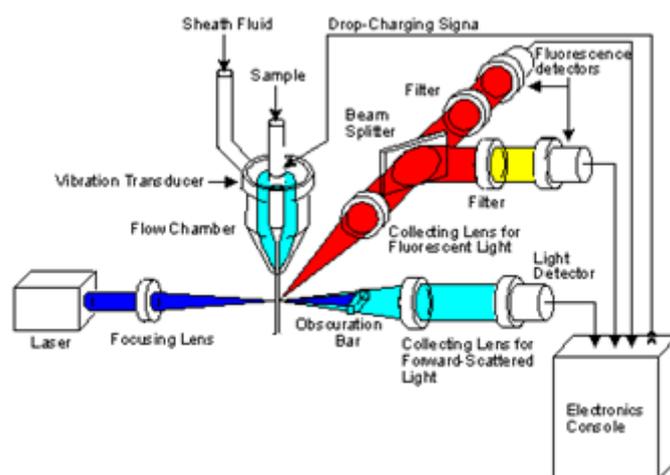


Figura 9 - Representação da constituição e funcionamento de um citômetro de fluxo (Adaptada de <http://olomouc.ueb.cas.cz/book/export/html/18>).

3.6.1. Avaliação do tipo de morte celular

A morte celular é um processo pelo qual são eliminadas algumas células podendo ser provocada por apoptose, necrose ou autofagia. Estes processos têm mecanismos de ação diferentes assim como consequências finais distintas (Kroemer *et al.*, 2009).

A partir dos ensaios de viabilidade celular efetuados com recurso à citometria de fluxo, com dupla marcação com anexina V (AV) e iodeto de propídeo (IP), podemos retirar informações sobre as células viáveis, com capacidade de se dividirem, ou as

células em morte celular. Em termos de células em processo de morte, este método permite-nos distinguir três subtipos, as células que se encontram em apoptose inicial, em apoptose tardia/necrose e em necrose (Elmore, 2007; Ormerod, 2002).

As anexinas são proteínas dependentes de cálcio que se ligam a fosfolípidos, com uma maior afinidade para a fosfatidilserina (FS). Esta encontra-se, na célula normal, no folheto interior da membrana citoplasmática, no entanto, quando a célula se encontra em apoptose, esta assimetria é desfeita sendo a fosfatidilserina externalizada. Esta externalização da fosfatidilserina permite a sua identificação por um ensaio de fluorescência, com recurso a AV (Darzynkiewicz *et al.*, 1992).

O iodeto de propídeo é um marcador das células que só tem a capacidade de entrar nas células se a membrana estiver lesada, pelo que permite distinguir as células que se encontram em necrose ou em apoptose tardia, devido a alteração lipídica membranar.

Usando estes dois marcadores em simultâneo, podemos diferenciar quatro populações distintas de células, as células viáveis quando o teste é negativo para os dois marcadores, células em apoptose, em que se a apoptose é inicial o teste é positivo para a AV e negativo para IP e se as células se encontrarem em apoptose tardia/necrose verifica-se o teste positivo para as duas sondas anteriormente. Para as células em necrose, o teste é apenas positivo para IP (tabela II) (Brown & Wouters, 1999; Darzynkiewicz *et al.*, 1992).

Tabela II - Representação dos diferentes tipos de morte celular avaliado por citometria de fluxo com recurso à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo.

GRUPOS DE CÉLULAS	ANEXINA V	IP
Viáveis	-	-
Apoptose Inicial	+	-
Apoptose Tardia / Necrose	+	+
Necrose	+	-

Para proceder a estes estudos, centrifugaram-se as duas linhas celulares a 1300G durante 5 minutos, aproveitando o sedimento, que foi lavado com PBS e posteriormente incubado com 100µL de tampão de ligação, ao qual foi adicionado 1µL de AnexinaV-FITC (*FITC - fluorescein isothiocyanate - annexin V apoptosis detection kit I, BD Pharmingen, E.U.A.*) e 5µL de iodeto de propídeo. Os resultados foram lidos num citómetro *FACSCalibur (BD Biociences, California, EUA)* e apresentados em percentagens de células presentes em cada grupo (Darzynkiewicz *et al.*, 1992; Brown & Wouters, 1999).

3.6.1.1. Confirmação do tipo de morte celular por citologia

O método May Grünwald – Giemsa, é um método que permite a coloração de células para estudos citológicos de elementos celulares, podendo observar-se também tipo de morte que está a ocorrer nas células dependendo dessas mesmas características.

O corante May Grünwald contém eosina e azul de metileno (180mg/dl) o corante Giemsa contém azul II(80mg/dl) e eosinato de azulII (100mg/dl). Estes dois corantes vão atuar na célula fazendo com que as diferentes estruturas fiquem marcadas de cor diferente de acordo com o pH e características dessa estrutura celular.

Fizeram-se esfregaços, e estes foram corados com os meios anteriormente referidos. Adicionaram-se primeiramente 20 gotas do corante May Grünwald ao esfregaço e deixou-se atuar durante 3 min. Após os 3 min decorridos, adicionaram-se 20 gotas de água da torneira, evitando o extravasamento do corante. Desprezou-se a mistura que recobria a lâmina e adicionouse o corante Giemsa, deixou-se atuar durante

12 a 15min e removeu-se posteriormente o líquido do topo da lâmina. Finalmente o esfregaço foi lavado em água corrente e deixou-se a secar na vertical.

As imagens foram observadas num microscópio apropriado com uma objetiva de imersão e foram retiradas fotografias destas células.

3.6.2. Detecção das espécies reativas de oxigénio (ROS)

Após a irradiação das células estas iniciam diferentes processos que podem conduzir à morte celular por diferentes vias, libertando um conjunto de fatores para o meio extracelular. Muitos destes fatores podem provocar alterações na homeostase de ROS sendo por isso relevante avaliar a alteração deste equilíbrio, assim como os efeitos que estas espécies poderão provocar (Kirkinezos *et al.*, 2001).

3.6.2.1. Detecção de peróxidos intracelulares

A sonda 2',7'-*dichlorfluorescein-diacetate* (DCFH-DA) permite a deteção de peróxidos intracelulares, em que a quantidade destes é diretamente proporcional à intensidade da fluorescência emitida. A sonda emite uma cor verde fluorescente com comprimento de onda de 530nm quando é oxidada e excitada a um comprimento de onda de 488nm (Wang *et al.*, 2013).

A molécula DCFH-DA é uma sonda que é constituída por grupos acetato e por esse motivo consegue facilmente atravessar a membrana citoplasmática e colocar-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 formando DCF que é altamente fluorescente (Wang *et al.*, 2013), como se pode ver na reação representada na figura 10.

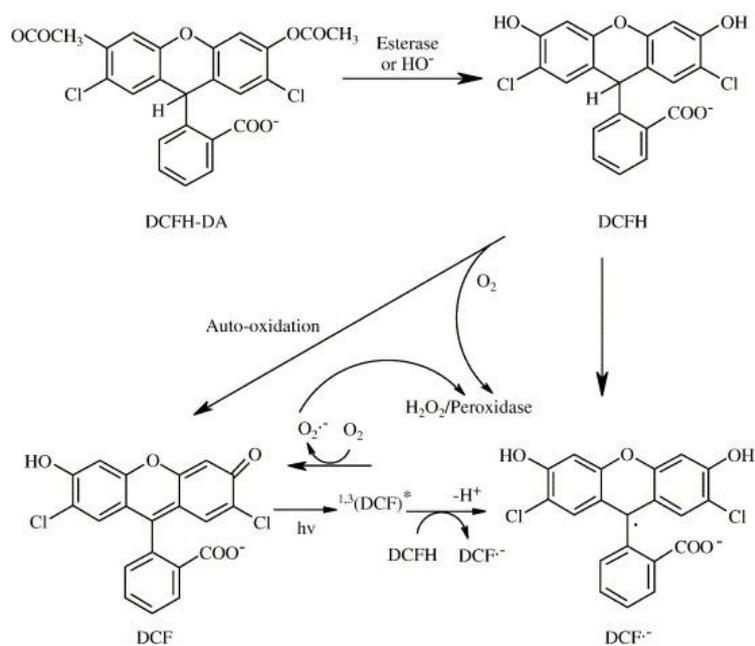


Figura 10 - Esterificação da diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) em diclorofluoresceína (DCFH) e posterior conversão em DCFH^{•-} (adaptado de Gomes *et al.*, 2005)

O procedimento deste método iniciou-se com a centrifugação das várias suspensões celulares a 1300G durante um período de 5min, onde foi aproveitado o sedimento, lavado com PBS e adicionado um tampão de incubação. A esta mistura foi adicionada a sonda DCFH₂-DA a qual permitirá monitorizar a oxidação levada a cabo pelos peróxidos. Esta sonda foi usada na concentração de 5μM dissolvida em dimetilformamida na concentração de 1mM, durante 45min, na ausência de luz e à temperatura de 37°C (Laranjo, 2010). Após o período de incubação, fez-se uma nova centrifugação a 1300G durante 5min, seguida de lavagem e de ressuspensão do sedimento. A leitura no citómetro foi feita com o comprimento de onda de 529nm e os resultados apresentados em média de intensidade de fluorescência (MIF) , posteriormente, normalizados relativamente ao controlo.

3.6.2.2. Avaliação da produção do radical superóxido no meio intracelular

O dihidroetídio (DHE), cuja estrutura molecular se encontra representado na Figura 11, é uma sonda utilizada também em citometria de fluxo para a detecção de ROS, 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 e é esta porção que se vai intercalar no DNA (Smits *et al.*, 1997).

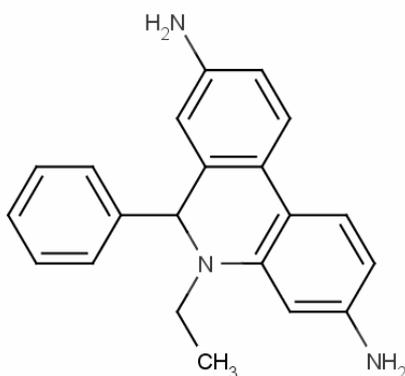


Figura 11 - Estrutura molecular da sonda DHE.

Iniciou-se o processo com uma centrifugação das suspensões celulares a 1300G durante 5min, com lavagem e ressuspensão do sedimento em PBS. Posteriormente, a suspensão foi incubada com a sonda DHE depois de dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 5 μ M, e foi colocada à temperatura ambiente (T.A.), em condições de ausência de luz, durante um período de 15min. De seguida a suspensão foi novamente centrifugada a 1300G durante 5min, lavada e ressuspensa em PBS e a leitura feita no citómetro a 620nm (Laranjo, 2010).

3.6.2.3. Avaliação da expressão do glutatião reduzido

O glutatião reduzido (GSH) é um nucleófilo forte e confere proteção às células contra danos advindos da presença de radicais livres, de oxidantes e de 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). Em 1975, foi desenvolvido um método rápido e simples para a marcação de GSH, de modo a evitar o recurso a métodos de citometria de fluxo que envolvessem a utilização de luz ultravioleta (UV). Este novo método 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 (O'Connor *et al.* 1988). Assim sendo, para a deteção de GSH, centrifugou-se uma suspensão celular com aproximadamente 3 milhões de células a 1300G, durante 5min, tendo-se ressuspenso o sedimento em 1mL de tampão PBS.

De seguida, adicionou-se o alaranjado de mercúrio (Sigma, EUA) na concentração de 40 μ M, incubando-se à temperatura de 37°C, na ausência de luz, durante 15min. Após a marcação, as células foram novamente centrifugadas a 1300G, durante 5min e ressuspendeu-se o sedimento em 400 μ L de PBS. A deteção foi efetuada com o comprimento de onda de excitação de 620nm.

3.6.3. Avaliação do Potencial Membrana Mitocondrial

Para medir o potencial de membrana mitocondrial com a citometria de fluxo, recorreremos à sonda lipofílica e catiónica *5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol carbocyanine iodide* (JC1), representada na figura 12, que emite

luz com um comprimento de onda de 527nm quando excitada com um comprimento de onda de 490nm (Hocsak *et al.*, 2010).

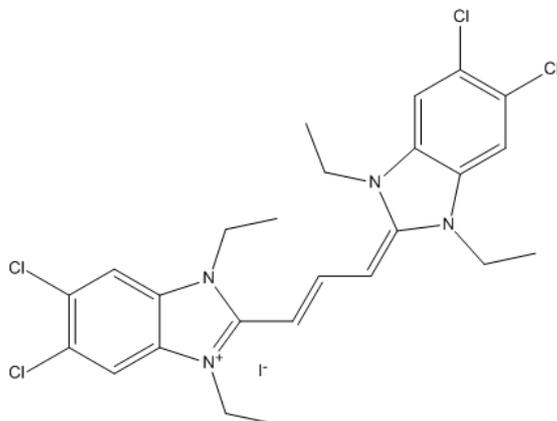


Figura 12 - Representação estrutural da sonda JC1. (Retirada de <http://www.biovision.com/jc-1-165.html>)

O JC1 poderá estar presente sob duas formas diferentes, na forma de monómeros ou na forma de agregados, os quais emitem fluorescência com comprimentos de onda distintos. A sonda entra na mitocôndria e forma agregados quando está polarizada, emitindo fluorescência vermelha, com comprimento de onda de 590nm. Quando o potencial mitocondrial diminui a sonda é extrusada e forma monómeros que emitem fluorescência verde com comprimento de onda de 527nm. Desta forma é possível determinar o potencial de membrana mitocondrial nas diferentes condições celulares (Hocsak *et al.*, 2010).

Para realizar este procedimento, centrifugaram-se as suspensões celulares a 1300G durante 5min, cujo sedimento foi lavado e ressuspendido em tampão PBS. De seguida, procedeu-se à incubação da suspensão celular com JC1 dissolvido em DMSO, numa concentração final de 5µM (Dernbach *et al.*, 2004; Laranjo, 2010), durante 15min à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após a incubação, procedeu-se a nova centrifugação com a mesma aceleração e o mesmo tempo anteriormente mencionado,

com posterior lavagem e ressuspensão em tampão PBS. A detecção foi efectuada com um comprimento de onda de excitação de 527nm e de 590nm e os resultados apresentados como MIF dos monómeros dividido pelo MIF dos agregados (Laranjo, 2010; Hocsak *et al.*, 2010).

3.6.4. Expressão de BAX/BCL-2

A proteína BCL-2 está relacionada com o aumento da expressão da transcrição de RNA do gene *BCL-2* e parece estar envolvida na génese de tumores. Elevados níveis de BCL-2 previnem a morte celular numa grande variedade de situações de stresse, na presença de químicos citotóxicos ou de radiação ionizante e de uma multiplicidade de fármacos quimioterapêuticos (Ikegaki *et al.*, 1994; Watters, 1999). A proteína BAX, contrariamente à BCL-2, é uma proteína pró-apoptótica que em situações de stresse está associada à formação de poros na membrana da mitocôndria induzindo a libertação do citocromo c (Cit-c). Esta libertação pressupõe o início do evento apoptótico através da via intrínseca (Motyl *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 2011).

Para proceder ao cálculo da relação entre as expressões de BAX e de BCL-2 foi necessário medir os níveis de BAX e de BCL-2, e para tal recorreremos à citometria de fluxo. Inicialmente, as células foram centrifugadas a 1300G durante 5min, lavadas e ressuspendidas em PBS. As células foram fixadas com uma solução de fixação (Immunostep, 416668, Salamanca, Espanha) durante 30min à temperatura ambiente e permeabilizadas em uma solução permeabilização (Immuostep, 416668, Salamanca, Espanha) por um período de 45min. Posteriormente, incubaram-se com anticorpos monoclonais anti-BCL-2 conjugados com FITC (Santa Cruz Biotechnology, E0611, Santa Cruz, USA) e anti-BAX conjugados com *phycoerythrin* (Santa Cruz Biotechnology, J0809, Santa Cruz, USA) no escuro à temperatura de 37°C. Após

lavagem em PBS, as amostras foram avaliadas no citómetro com comprimentos de onda de 575nm e de 521nm para a BAX-PE e a BCL-2-FITC, respetivamente. Os resultados foram obtidos em forma MIF, sendo feita a relação BAX/BCL-2 posteriormente (Williamson *et al.*, 1998; Zerp *et al.*, 2009).

3.6.5. Avaliação do Ciclo celular

Estão descritas várias vias de sinalização envolvidas no bloqueio do ciclo celular, quando a integridade genómica está ameaçada, impedindo a transmissão de mutações genéticas para as gerações celulares subsequentes. Falhas nestes sistemas de controlo de divisão celular poderão estar associadas à carcinogénese, pois apesar da célula apresentar anomalias, a sua divisão continua a ocorrer (Novák *et al.*, 2002).

Para o estudo do ciclo celular recorreu-se ao iodeto de propídeo. Esta molécula intercala-se no DNA e a fluorescência emitida é proporcional à quantidade deste ácido nucleico. O iodeto de propídeo liga-se igualmente ao RNA e, por isto, é necessário adicionar RNase para eliminar esta interferência. A quantidade de DNA presente em cada fase do ciclo celular, permite dividir as células em subpopulações diferentes, correspondentes às fases G0, G1, S ou G2/M e avaliar a partir da intensidade da fluorescência emitida pelo iodeto de propídeo (Bryan *et al.*, 2010; Jonhson & Walker, 1999).

O ensaio iniciou-se com a centrifugação da suspensão celular a 1300G durante 5min, lavagem e ressuspensão do sedimento em álcool a 70% com agitação no vórtex e incubação por um período de 30min à temperatura ambiente, posteriormente lavado com PBS, centrifugado e novamente ressuspendido em PBS. De seguida adicionou-se a solução de IP/RNase com a qual a amostra foi incubada à temperatura ambiente durante 15min, na ausência de luz. A leitura foi feita após este último passo num citómetro com

um comprimento de onda de excitação de 488nm. Os resultados foram obtidos em percentagem de células em cada fase do ciclo celular (Schwartz *et al.*, 1994).

3.8. Avaliação da Citotoxicidade

O ensaio cometa avalia os efeitos citotóxicos de diferentes compostos ou de radiação ionizante através da extensão da lesão provocada no DNA, a qual é diretamente proporcional ao tamanho da cauda e a largura do cometa.

Para este ensaio as células foram incubadas por um período de 48h após tratamento com radiação ionizante. Cerca de 25 000 células foram misturadas com agarose com um *low melting point* (LMP) numa proporção de 1:1 e posteriormente colocada a suspensão em lâminas que já se encontravam revestidas com agarose de *high melting point* (HMP). As lâminas foram colocadas à temperatura de 4°C por um período de aproximadamente 15min de modo a solidificar a agarose. Preparou-se uma solução de lise com 2,5M de NaCl, 100mM de EDTA, 10mM de trizimabase, DMSO a 10% e triton-X a 1%, com pH de 10, onde foram colocadas as lâminas durante a noite.

Após as membranas celulares serem lisadas, realizou-se uma eletroforese durante 15min, com potência de 25 watts e intensidade de corrente de 750mA para separar o DNA pelos seus diferentes tamanhos. O DNA foi visualizado recorrendo a uma coloração com brometo de etídio posteriormente às lavagens após a eletroforese e as fotografias foram adquiridas num microscópio ótico e as imagem processadas usando o *software CometScore*. Nos resultados apresentamos o parâmetros correspondente ao momento da cauda para cada condição em estudo.

3.9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM SPSS® v.19. (*National Opinion Research Center*, Chicago, USA) para *Windows*. Na análise descritiva foram determinadas medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio-padrão e amplitude inter-quartil) para as variáveis quantitativas. Os resultados dos ensaios clonogénicos são apresentados sob a forma de razão relativamente ao controlo. Para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis recorreu-se ao teste *Shapiro-Wilk*. Para variáveis com distribuição normal foram utilizados testes paramétricos e em caso contrário recorreu-se a testes não paramétricos. A comparação de variáveis quantitativas entre dois grupos foi realizada com recurso ao teste de *U-Mann-Whitney* (teste 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 correcção de Bonferroni. A comparação dos resultados dos ensaios clonogénicos com o respetivo controlo foi realizada pela determinação do intervalo de confiança a 95% (IConf 95%) do valor da condição, considerando-se significativamente diferente do controlo caso o intervalo de confiança de 95% não englobe 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* (*OriginLab Corporation*, Northampton, Massachusetts, USA) utilizando o modelo “DoseResp”. As curvas referentes aos ensaios clonogénicos foram obtidas considerando o modelo linear de agressão celular ($SF = e^{D/D_0}$), utilizando o mesmo *software*. Foi considerado um nível de significância de 5%.

4.Resultados*

* Resultados obtidos em coautoria com Fernando José Figueiredo Agostinho
D'Abreu Mendes

Este trabalho tem como objectivo o estudo do efeito da radiação ionizante em linhas celulares de CPNPC. Assim, e de acordo com as metodologias descritas, neste capítulo serão descritos os resultados obtidos para cada técnica.

4.1. Viabilidade e proliferação celular

A viabilidade e a proliferação celular constituem indicadores para avaliação da citotoxicidade. Assim, para avaliar qual o efeito da radiação ionizante nas linhas celulares foi realizado inicialmente o ensaio de alamar *blue* que mede indiretamente estes parâmetros. O ensaio foi realizado às 24, 48, 72 e 96 horas após irradiação e mede a presença de compostos redutores presentes nas células viáveis (Al-Nasiry *et al.*, 2007).

De acordo com os resultados obtidos e representados na figura 13, verificou-se que nas linhas celulares H1299 e A549 ocorre uma diminuição na viabilidade celular, sendo que esta se revela dose e tempo dependente.

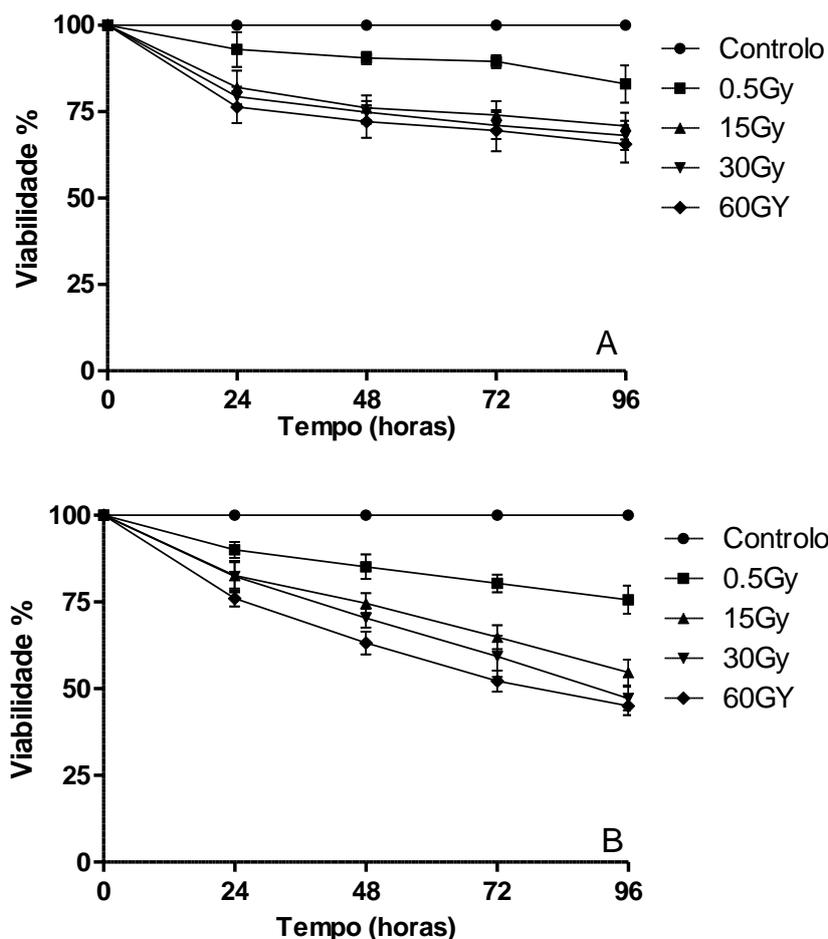


Figura 13 – Curvas dose/resposta do efeito da radiação ionizante obtida pelo ensaio de alamar blue 24, 48, 72 e 96 hora s após irradiação das linhas celulares A) H1299 e B) A549. Os dados expressam a média e o desvio padrão de seis experiências independentes.

Na linha celular H1299 verificamos uma redução significativa na viabilidade com 0,5Gy a partir das 48h em relação ao controlo ($p < 0,001$). Com doses de 15, 30 e 60Gy, na linha H1299, verificámos também diferenças significativas na viabilidade quando comparadas com a condição controlo, sendo que estas alterações se verificaram a todos os tempos de incubação ($p < 0,001$).

A linha celular A549 comporta-se de forma diferente comparativamente à linha anterior, verificando-se uma maior diminuição na viabilidade celular com todas as doses e em praticamente todos os tempos de incubação estudados. Entre as diferentes doses, observou-se que existem diferenças estatisticamente significativas logo às 24h, mesmo

com a dose mais baixa estudada de 0,5Gy ($p<0,001$), sendo que as diferenças são ainda maiores nas doses mais elevadas relativamente ao controlo ($p<0,001$). Ainda às 24h, entre as doses mais elevadas testadas (15, 30 e 60Gy) constatou-se a existência de diferenças significativas entre os 15 e os 60Gy ($p=0,027$) e também entre os 30 e os 60Gy ($p=0,04$). Com o aumento do tempo de incubação, a viabilidade decresce de forma mais pronunciada, obtendo-se às 48, 72 e 96h diferenças entre o controlo e as restantes doses, assim como entre a dose de 0,5Gy e as restantes doses testadas, sempre com significado estatístico ($p<0,001$).

4.2. Sobrevivência Celular

Recorrendo ao ensaio clonogénico, foi determinado o valor da SF para as duas linhas celulares em estudo, assim como a dose responsável por matar 50% da colónia de células (DL_{50}). Podemos observar na figura 14, que existe uma diminuição do fator de sobrevivência registado quando se aumenta a dose de radiação.

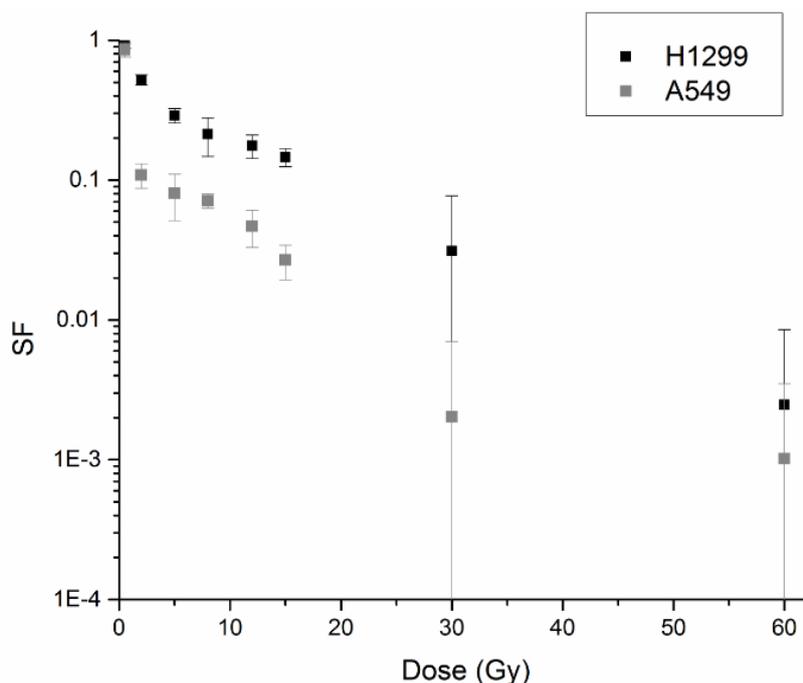


Figura 14 - Curvas de dose/resposta obtidas pelo ensaio clonogénico nas linhas H1299 e A549, 12 dias após irradiação. Os dados expressam a média e o desvio padrão de seis experiências independentes.

Quando avaliado o SF, observou-se uma diminuição do mesmo com as doses mais baixas testadas, 2 Gy, que quando comparado com o controlo, se verificou possuir diferenças com significado estatístico ($p < 0,001$). Todas as doses mais elevadas testadas apresentaram diferenças com significado estatístico na sobrevivência celular em relação ao controlo ($p < 0,001$).

A linha A549 mostrou o mesmo comportamento que a anterior, com diferenças na diminuição da viabilidade a partir dos 2Gy com significância em relação ao controlo ($p < 0,001$).

A linha celular H1299, mais uma vez, mostrou ser mais resistente que a linha celular A549. Quando comparados os resultados das duas linhas celulares, observou-se que dos 2 aos 15 Gy, para a linha celular H1299, se verificou um maior valor de SF com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$), ou seja, uma linha celular mais resistente à radioterapia.

4.3. Tipo de Morte

Tendo-se verificado uma diminuição da sobrevivência celular em resultado da irradiação foi necessário avaliar o tipo de morte. Os gráficos representados na figura 15 mostram qual o tipo de morte pelo qual as células morrem 48 horas após a irradiação.

Na linha celular H1299, representada no gráfico A, verificou-se uma tendência para a diminuição da viabilidade celular com a dose mais baixa, aumentando as diferenças para as doses mais elevadas. A linha celular A549 também mostrou uma diminuição da viabilidade com o aumento da dose de radiação ionizante, no entanto, para as mesmas doses de radiação utilizadas existe uma maior diminuição da viabilidade em relação à linha celular H1299, com significado estatístico, relativamente às doses de 30 e de 60 Gy ($p < 0,001$).

Relativamente ao mecanismo preferencial de morte celular, as duas linhas apresentaram um padrão distinto. A linha celular H1299 não mostrou diferenças significativas no aumento de apoptose inicial nas doses mais elevadas, no entanto, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,012$) relativas à morte por necrose na condição de irradiação com 60Gy em relação com o controlo.

A linha celular A549 revelou outro padrão, com uma tendência para o aumento progressivo da morte por apoptose inicial com o aumento de dose de radiação, verificando alterações significativas entre o controlo e os 30Gy ($p = 0,025$) e 60Gy ($p = 0,02$). A necrose não apresenta diferenças estatisticamente significativas com o aumento da dose de radiação e parece haver apenas uma tendência para o aumento a partir dos 15Gy.

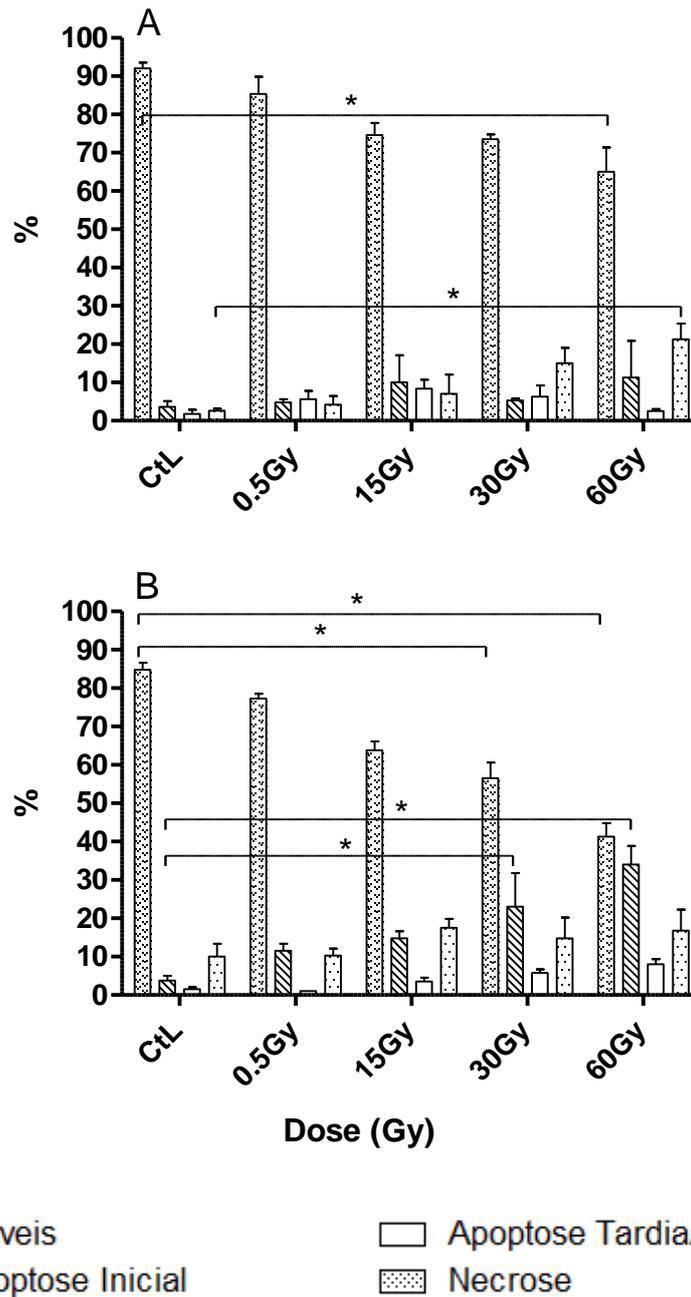


Figura 15 - Viabilidade Celular recorrendo à dupla marcação AV/IP, 48h após irradiação, nas linhas celulares H1299(A) e A549 (B). Nos gráficos encontram-se representados os conjuntos de células, em percentagem, de células viáveis, em apoptose inicial, apoptose tardia/necrose e necrose. Os dados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes.

Os resultados obtidos por citometria acompanham os resultados do ensaio indireto de viabilidade celular realizado com o alamar *blue*, ou seja, verificou-se uma diminuição da viabilidade celular com o aumento de dose de radiação, sendo que, a

linha celular H1299, às 48h, revela maior resistência a este tipo de terapia que a linha celular A549. A linha celular H1299, às 48h, apresentou uma sobrevivência de 65%, enquanto que a linha celular A549, a mais sensível, apresentou uma viabilidade de aproximadamente 40%.

4.4. Morfologia Celular

Com o objectivo de avaliar as principais características dos diferentes tipos de morte, nomeadamente, a apoptose e a necrose, foram realizados ensaios de morfologia das células controlo e das células irradiadas com diferentes doses de radiação ionizante.

Os resultados referentes à linha celular H1299, representados na figura 16, revelaram alterações da morfologia. Nos grupos de células irradiadas, com doses superiores a 15Gy, estas apresentaram notoriamente características de morte celular, particularmente *beblings*, um padrão característico da apoptose. Relativamente à dose de 60Gy existem algumas células que revelaram aumento do volume celular, característico da necrose.

As células da linha celular A549 mostraram também características distintas após irradiação com as diferentes doses de radiação. As células irradiadas com 0,5Gy parecem não sofrer alterações relativamente ao controlo. Com as doses mais elevadas, de 15, de 30 e de 60 Gy, representadas respetivamente nas imagens C, D e E da figura 17, verificou-se aumento do volume celular, rotura da membrana citoplasmática, sendo estas, características de células necróticas.

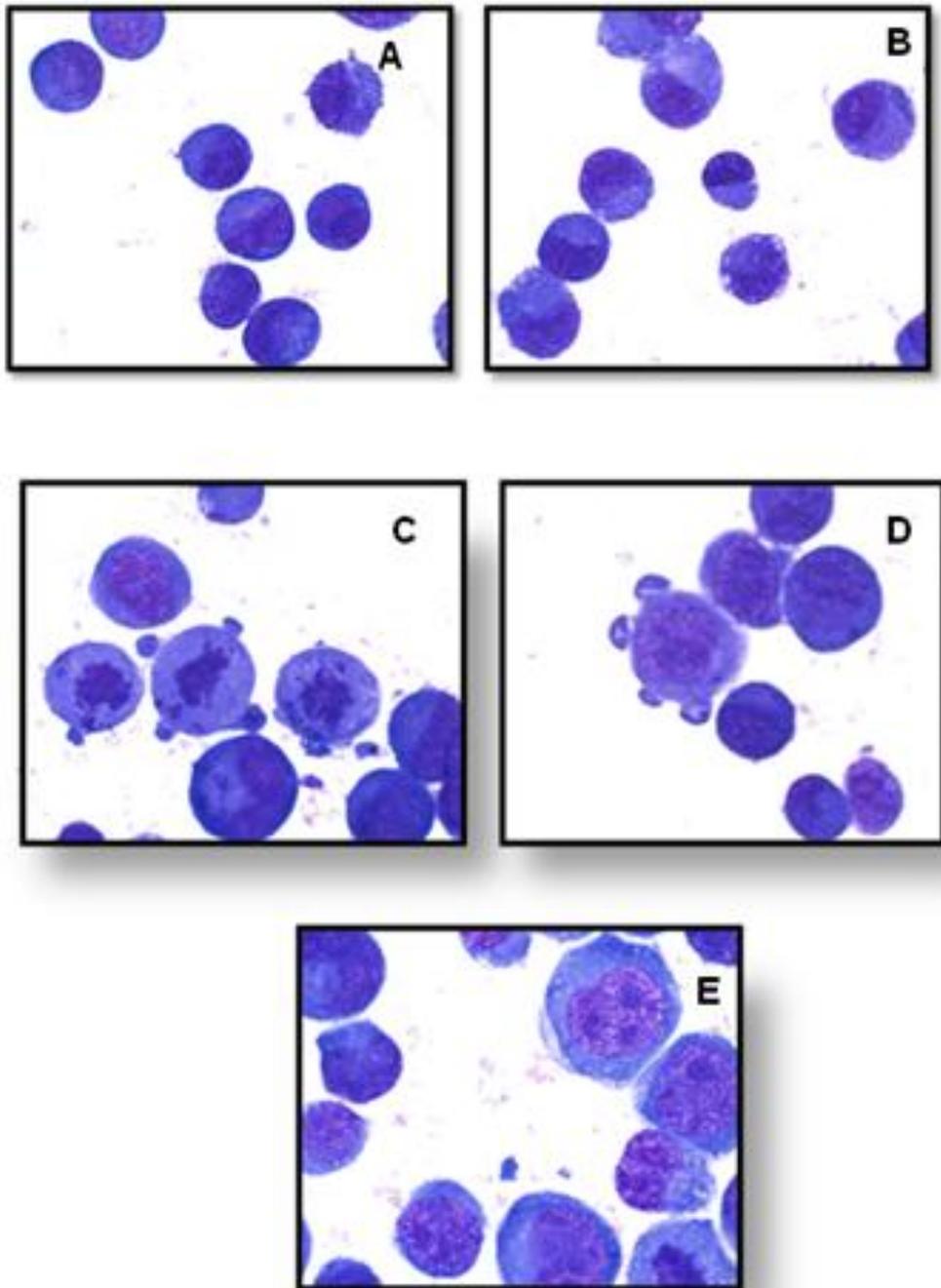


Figura 16 - Coloração May-Grunewald/Gimsa, na linha celular H1299, em diferentes condições, A) Controlo, B) 0,5 Gy, C) 15 Gy, D)30 Gye E)60 Gy, com uma ampliação de 1500 vezes.

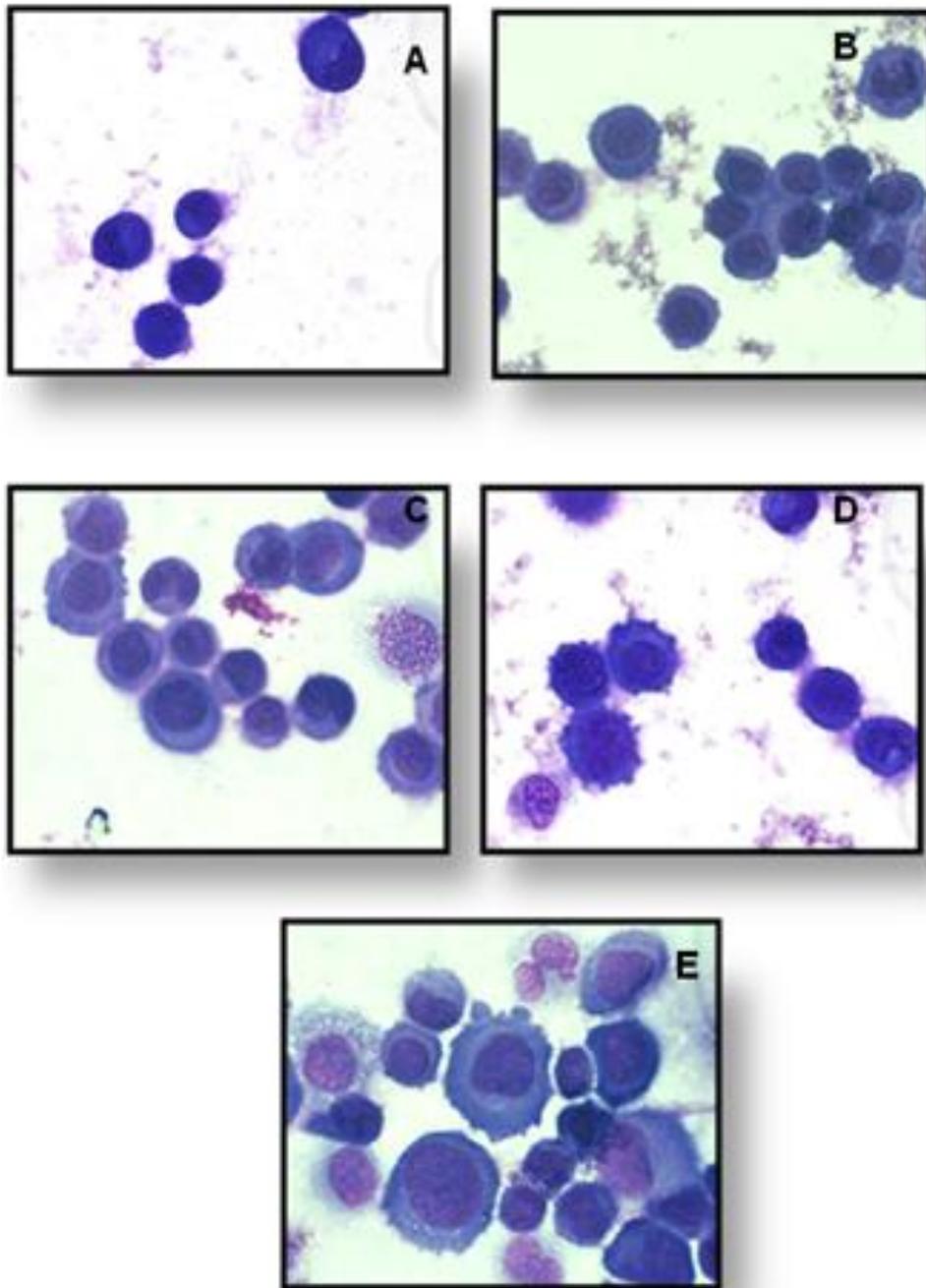


Figura 17 - Coloração May-Grunewald/Gimsa, na linha celular A549, em diferentes condições, A) Controlo, B) 0,5 Gy, C) 15 Gy, D)30 Gye E)60 Gy, com uma ampliação de 1500 vezes.

4.5. Ciclo Celular

Os resultados de ciclo celular, representados na figura 18, revelaram ocorrer alterações ao ciclo celular nas duas linhas celulares estudadas, 48h após a irradiação. Em ambas as linhas, na situação controlo, a distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo não são muito distintas. As células no controlo encontram-se maioritariamente, cerca de 80%, na fase G0/G1. Na fase de duplicação de DNA, a fase S, encontram-se 15 a 20% das células e, por último, na fase G2/M encontram-se cerca de 5%. Ainda, na fase pré-G0, o chamado pico pré-apoptótico, encontram-se cerca de 1% das células. Os testes estatísticos revelaram que não existem alterações significativas na situação controlo entre ambas as linhas.

Na linha celular H1299, houve alterações mais significativas ao nível do ciclo celular. Observou-se uma diminuição de células em fase G0/G1 para os 30Gy ($p=0,009$) e para os 60Gy ($p<0,001$), aumentando ao mesmo tempo a percentagem de células que se encontrava na fase G2/M para os 30Gy ($p=0,009$) e para os 60Gy ($p<0,001$), ambas as condições comparadas com o controlo. A linha celular A549 não mostrou alterações tão óbvias como a linha celular H1299, no entanto, verificou-se uma diminuição significativa da percentagem de células em fase G0/G1 com os 0,5Gy ($p=0,002$), não se observando a partir desta dose alterações significativas nesta fase. Verificou-se ainda que, com o aumento de dose havia uma maior percentagem de células na fase pré-G0, estatisticamente significativo aos 60Gy ($p=0,002$), e aumento significativo também entre o controlo e os 60Gy da percentagem de células na fase G2/M ($p=0,044$).

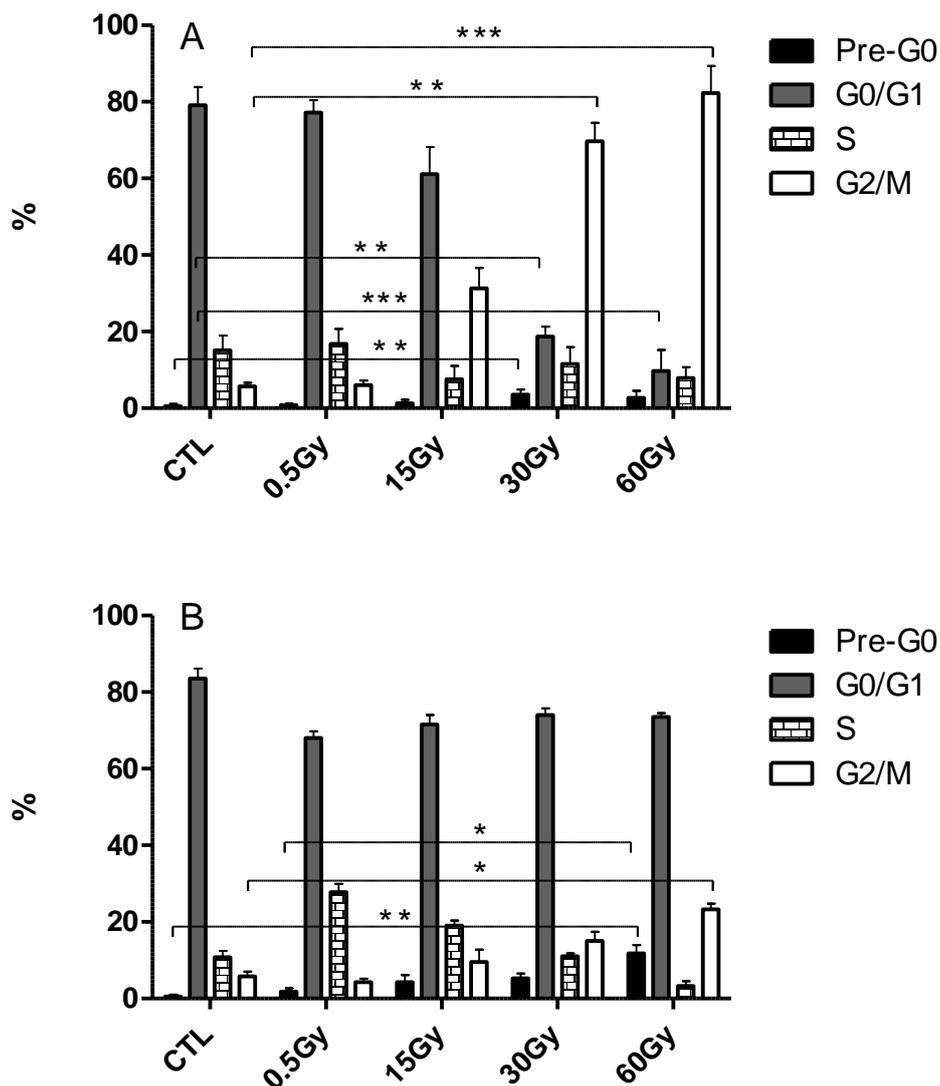


Figura 18 - Distribuição da percentagem de células em cada fase do ciclo celular, 48h após irradiação, nas linhas H1299 (A) e A549 (B) Os dados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes.

4.6. Glutathione e Espécies Reativas de Oxigênio

Avaliaram-se as alterações nos níveis de ROS intracelulares e de GSH (figura 19). Relativamente aos níveis de anião superóxido e de peróxidos intracelulares, na linha celular H1299, observou-se um aumento deste radical com o aumento da dose, verificando-se alterações estatisticamente significativas a partir dos 15Gy em relação ao controlo ($p < 0,001$).

Na linha celular A549 o anião superóxido aumenta com o aumento da dose de radiação até aos 30Gy, dose em que estes níveis atingem o seu valor máximo com significância estatística ($p < 0,001$). Aos 60Gy os níveis deste radical tendem a diminuir apresentando, no entanto, diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo ($p = 0,037$). A existência de peróxidos intracelulares observou-se ser dependente da dose verificando-se um aumento significativo para a dose mais baixa testada ($p = 0,01$), sendo que este aumento é progressivo com doses mais elevadas de radiação, apresentando sempre resultados estatisticamente significativos em relação ao controlo, para 15Gy ($p = 0,01$), para 30Gy ($p < 0,001$) e para 60Gy ($p = 0,023$).

Os níveis de GSH intracelulares não sofreram qualquer alteração com o aumento da dose de radiação relativamente ao controlo em ambas as linhas celulares.

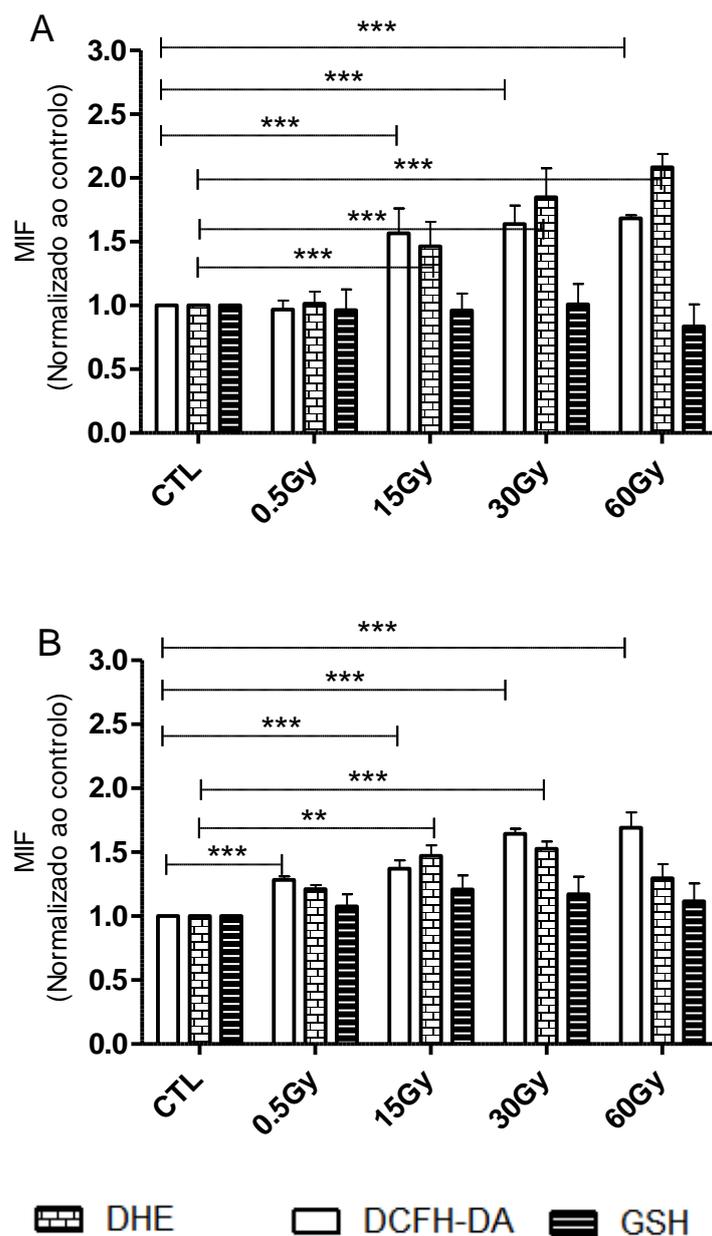


Figura 15 - Níveis de espécies reativas de oxigênio e glutatona, 48h após irradiação, na condição controle e irradiadas com 0,5, 15, 30 e 60Gy, nas linhas celulares A) H1299 e B) A549. Todos os resultados foram normalizados relativamente ao controle. Os dados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes.

4.7. Expressão de BAX/BCL-2

As proteínas BAX e BCL-2 estão envolvidas na ativação da apoptose, e foram descritas como sendo pro-apoptótica ou antiapoptótica, respetivamente. Desta forma

realizámos este ensaio para perceber qual o balanço destas duas proteínas tanto na situação controlo, assim como nas condições irradiadas (figura 20 e 21).

Relativamente aos níveis basais de BAX e de BCL-2, verificámos que os níveis de BAX são ligeiramente mais elevados na linha celular H1299, sem significado estatístico. Já na expressão de BCL-2 observam-se maiores diferenças entre as duas linhas celulares, sendo que a linha celular A549 apresenta, tendencialmente, uma maior expressão basal dessa proteína, no entanto estes resultados não possuem significância estatística.

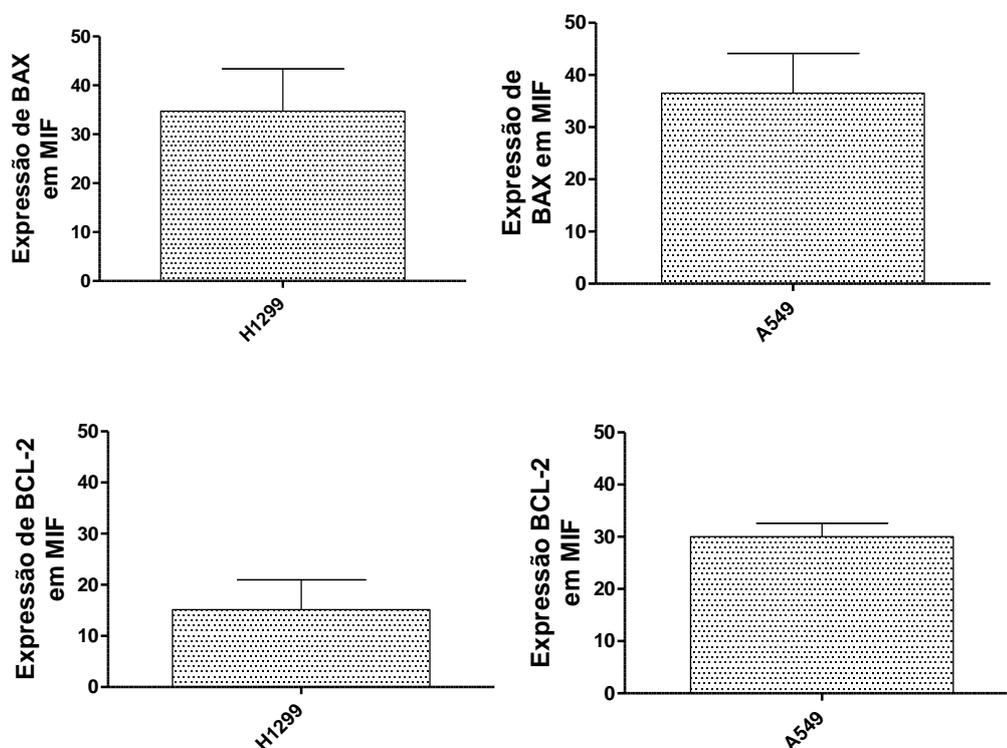


Figura 20 - Expressão basal de Bax e Bcl-2, em MIF, nas linhas celulares H1299 e A549. Os dados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes.

A razão BAX/BCL-2 em ambas as linhas celulares mostrou ter um comportamento similar como representado na figura 21. Na linha celular H1299 apresentou o valor mais elevado desta razão nas doses de 15 e 30Gy, com diferenças

estatisticamente significativas relativamente ao controlo apenas para as doses de 30Gy ($p=0,03$). Com a dose de 60Gy verificou-se que existe uma diminuição desta razão, deixando de apresentar diferenças significativas relativamente ao controlo, mas revelando uma tendência para o aumento. Na linha celular A549 verifica-se o mesmo padrão, primeiro o aumento da razão até aos 30Gy onde se verificou um máximo, no entanto sem diferenças significativas, apenas apresentando significado estatístico para a dose de 60Gy ($p=0,02$).

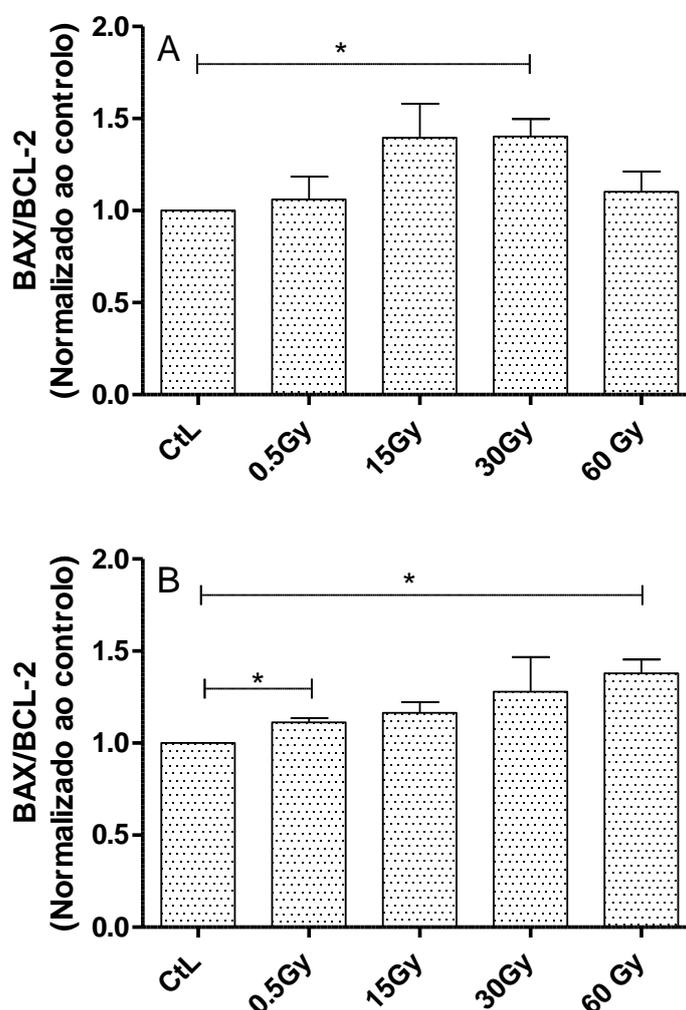


Figura 21 – Expressão de Bax e Bcl-2, 48h após irradiação, na condição controlo e irradiadas com 0,5, 15, 30 e 60Gy, nas linhas celulares A) H1299 e B) A549. Todos os resultados foram normalizados relativamente ao controlo. Os dados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes.

4.8. Potencial de Membrana Mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial (PMM) avaliado com a sonda JC1 após irradiação, no nosso estudo demonstrou ter um comportamento diferente nas duas linhas celulares (figura 22).

Na linha celular H1299 observou-se uma tendência para o aumento do potencial de membrana mitocondrial na dose mais baixa testada, 0,5Gy, sem significado estatístico. Com a dose de 15Gy houve uma diminuição do PMM mitocondrial estatisticamente significativa relativamente ao controlo ($p < 0,001$) e também à dose de 0,5Gy ($p = 0,007$). Com doses mais elevadas, de 30 e de 60Gy, a tendência foi para um menor PMM que no controlo, no entanto, apenas com significado estatístico nos 30Gy ($p < 0,001$).

Relativamente à linha celular A549 o padrão revelou-se completamente diferente, sendo que existe uma relação de proporcionalidade inversa, ou seja, com o aumento da dose existe uma diminuição do PMM. A partir da dose mais baixa testada, 0,5Gy, existem já diferenças estatisticamente significativas comparando com as células controlo ($p < 0,001$), sendo que com maiores doses e comparando com o controlo continua a manter-se esta significância.

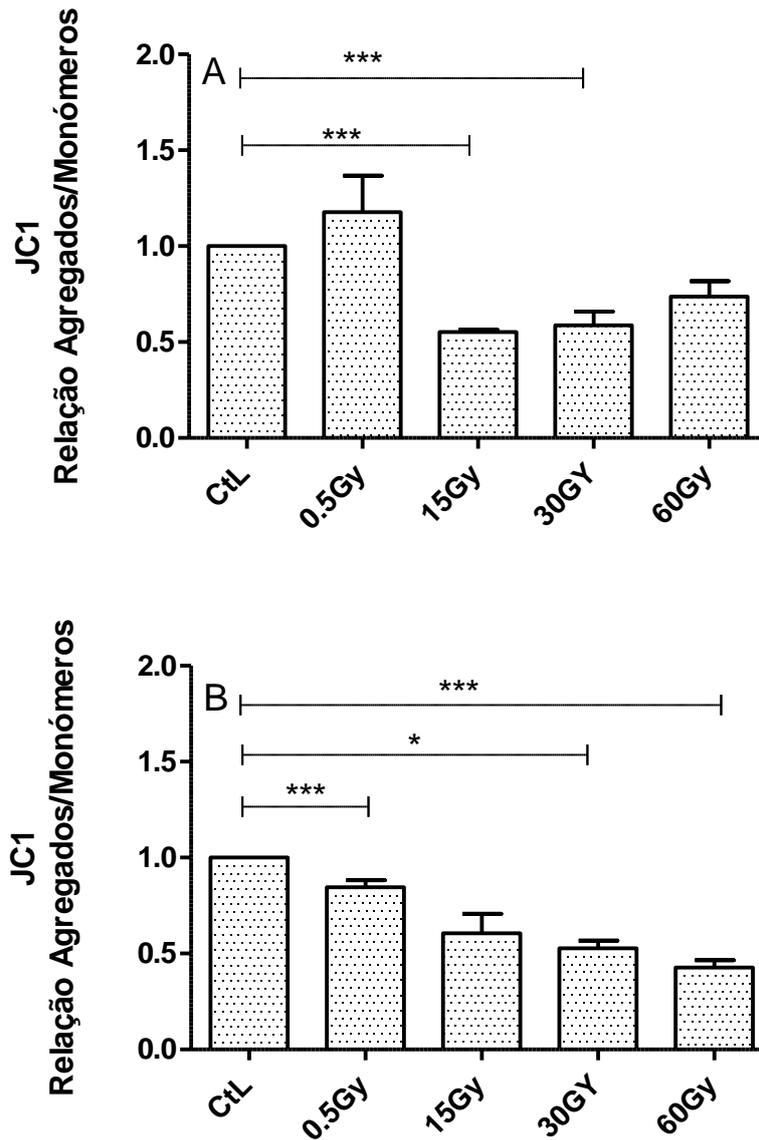


Figura 22 - Potencial de Membrana Mitocondrial dado pela razão entre monómeros e agregados da sonda JC1, após 48h da irradiação, nas linhas celulares H1299 (A) e A549 (B). Os resultados foram normalizados ao controle. Os dados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes.

4.9. Citotoxicidade Celular

A radiação ionizante poderá originar diversas lesões celulares. Durante a irradiação poderá ocorrer a quebra das cadeias de DNA, podendo estas ser, *double*

strand breaks (DSB) ou *single strand breaks* (SSB). Nos resultados obtidos nas imagens e gráficos seguintes, pretendeu-se avaliar a extensão dessas lesões.

Através das imagens nas figuras seguintes, 23 e 24, observou-se que ocorre um aumento das lesões de DNA, com o aumento da dose de radiação. Este facto é demonstrado pelo aumento de núcleos com DNA fragmentado, que leva ao aumento do comprimento das caudas dos cometas após a eletroforese.

Verificaram-se diferenças relativamente às duas linhas celulares, sendo que, na linha celular H1299, com aumento da dose de radiação, ao fim de 48h, esta apresentou lesões no DNA das células, aumentando estas com a dose de radiação. Relativamente ao controlo, a dose de 0,5Gy já apresentava lesões no DNA com significado estatístico ($p=0,023$). Para doses superiores, de 15, 30 e 60Gy a diferença apresentada é maior ($p<0,001$). Na linha celular A549 observou-se um aumento progressivo das lesões no DNA, com aumento da dose de RI (figura 25). Com a dose de 0,5 Gy não se observaram alterações no parâmetro medido, para doses mais elevadas como 15, 30 e 60Gy já se verificou um aumento das lesões de DNA, com significado estatístico, respetivamente $p<0,001$; $p=0,003$ e $p<0,001$.

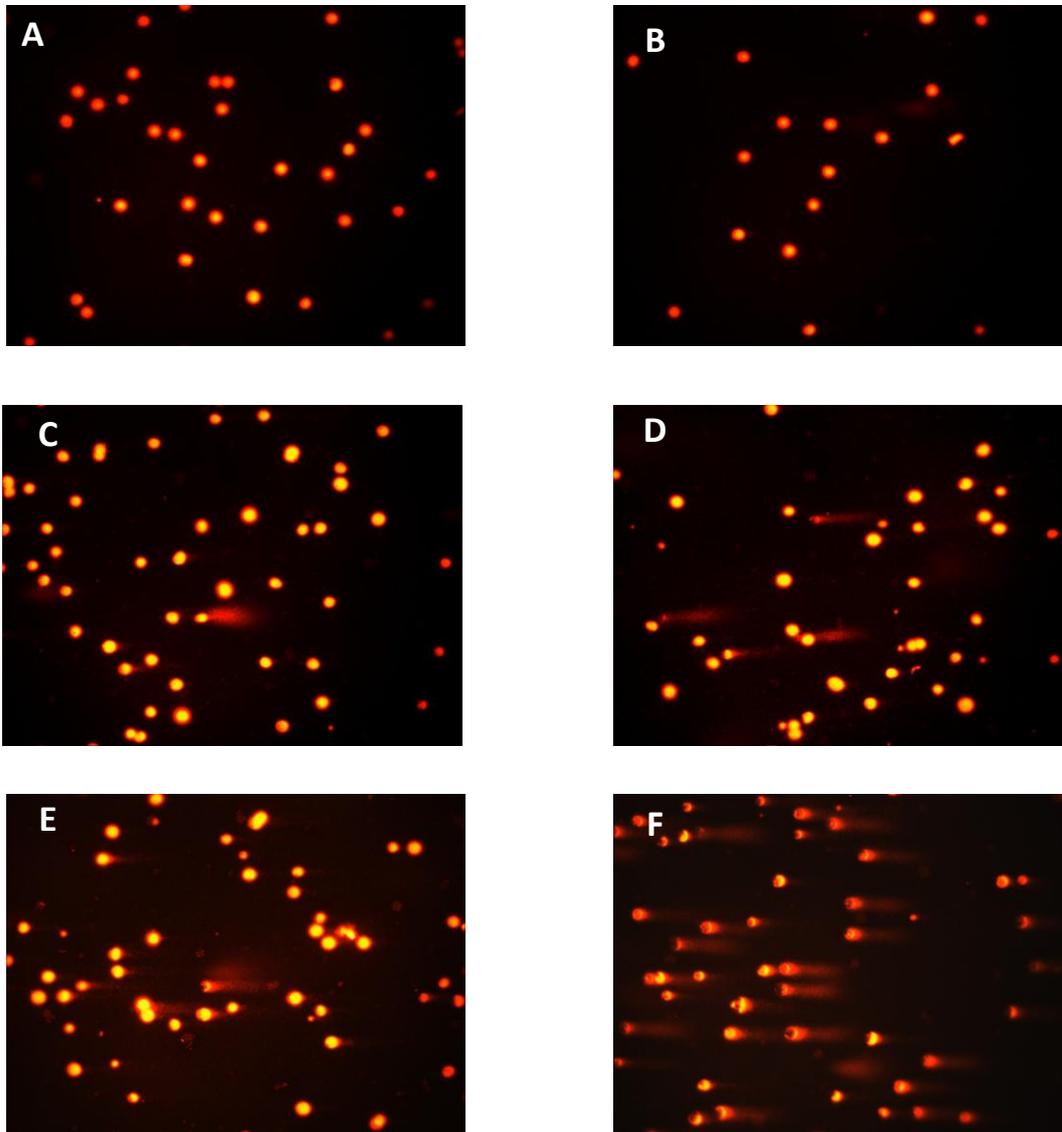


Figura 236 - Fotografias resultantes da eletroforese de DNA, na linha celular H1299, 48h após irradiação, nas condições, A) Controlo, B) 0,5 Gy, C) 15Gy, D) 30 Gy, E) 60 Gy e F) Controlo Positivo.

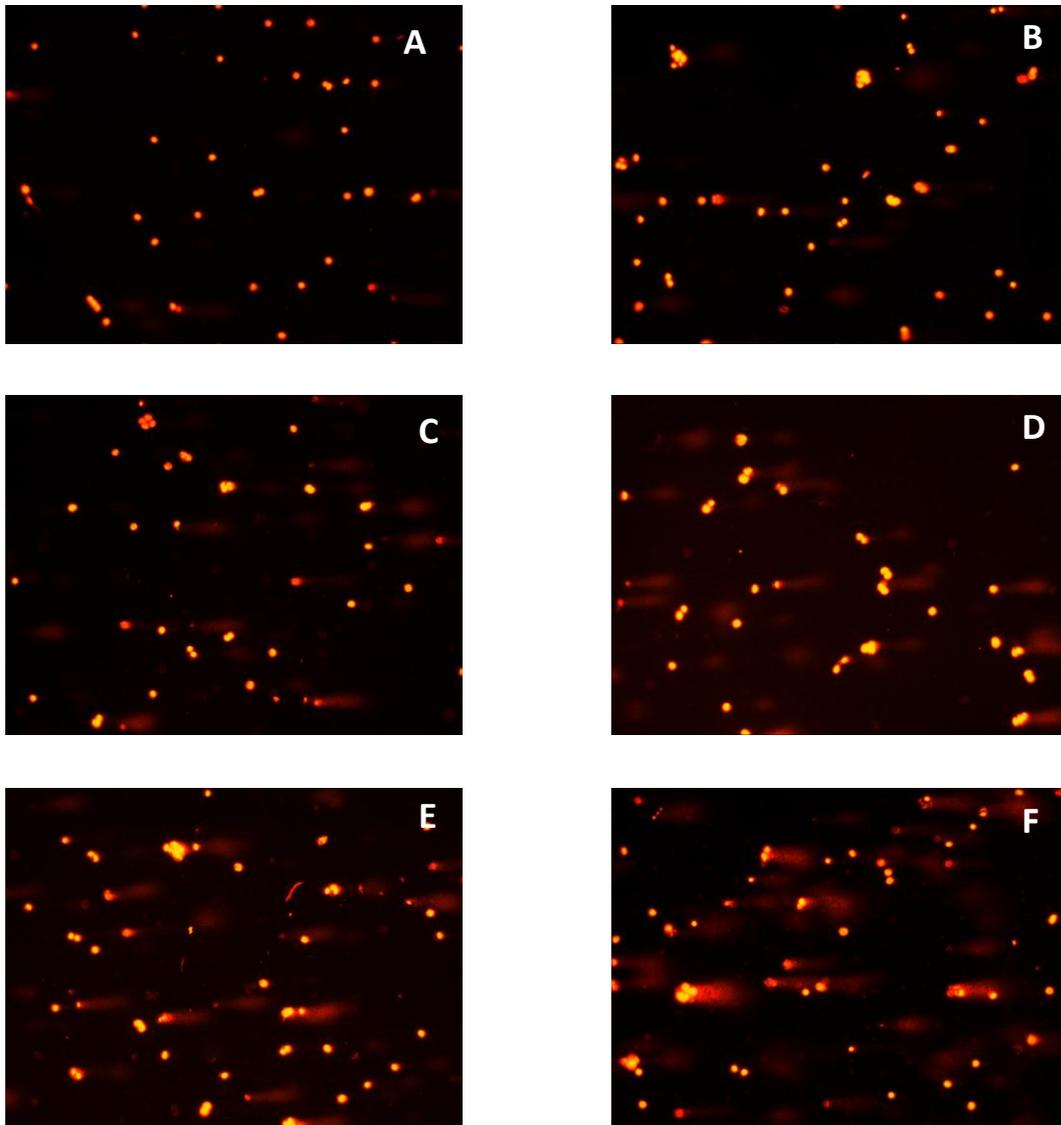


Figura 24 - Fotografias resultantes da eletroforese de DNA, na linha celular A549, 48h após irradiação, nas condições, A) Controlo, B) 0,5 Gy, C) 15Gy, D) 30 Gy, E) 60 Gy e F) Controlo Positivo.

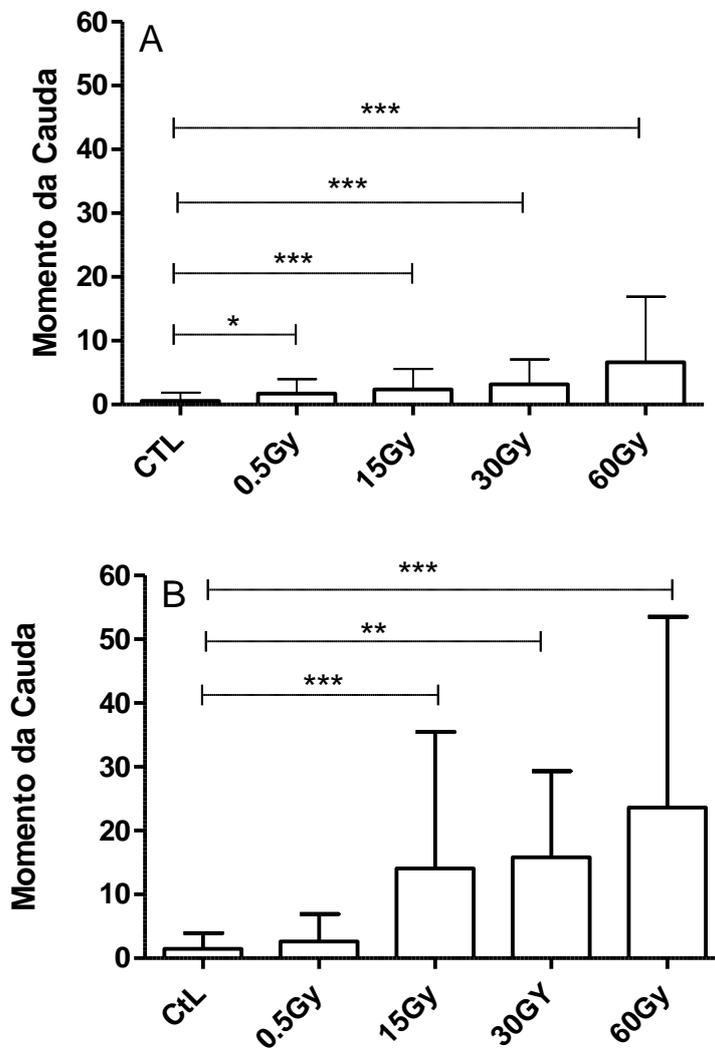


Figura 25 – Resultados de citotoxicidade celular obtidos no ensaio cometa, nas linhas celulares H1299 e A549, 48h após irradiação, nas condições, Controlo, 0,5 Gy, 15Gy, 30 Gy, 60 Gy. Os dados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes.

5.Discussão

A radioterapia é uma abordagem terapêutica utilizada para tratar e/ou controlar o crescimento de tumores localizados. O uso de radiação ionizante gera muitas vezes uma resposta que não é suficiente para garantir a irradicação completa do tumor, levando a que ocorra a recidiva. Vários investigadores têm estudado diversas doses alternativas, de forma a contribuírem para melhores resultados da sobrevivência nos doentes (Bower & Waxman, 2006; Brady, 2011).

Doentes com cancro do pulmão normalmente apresentam um prognóstico muito pobre, apresentando uma taxa de sobrevivência ao fim de cinco anos de apenas 16,8% (National Cancer Institute, 2014). Estes dados tornam necessário otimizar as abordagens já existentes para o tratamento deste tipo de patologia, assim como, desenvolver outras e, ainda, sempre que possível, personalizar o tratamento dependendo do tipo celular e do tipo de doente envolvido (National Cancer Institute, 2014).

Estudos de novas abordagens terapêuticas com o recurso a radiação ionizante têm sido realizados na tentativa do controlo local do tumor assim como a sua disseminação loco-regional e mesmo à distância. Estas novas abordagens que parecem muito promissoras envolvem o uso de doses de radiação mais elevadas que as convencionais, tendo-se obtido já bons resultados em doentes com cancro do pulmão. O desenvolvimento da tecnologia que permite a focalização da RI, praticamente em exclusivo no tumor ou com margens muito pequenas, permite um aumento da dose fornecida, apresentando efeitos secundários menores. A redução dos efeitos secundários prende-se muito com o fato de que é necessário preservar os tecidos saudáveis circundantes, depositando a dose nos locais a tratar (Brady, 2011; Bernien *et al.*, 2004).

Para a realização deste trabalho experimental foram utilizadas duas linhas celulares distintas de CPNPC, a linha celular H1299 e a linha celular A549. A linha celular H1299 é uma linha de adenocarcinoma que apresenta uma deleção parcial do

gene *TP53* e, como consequência, não expressa a proteína supressora tumoral P53. As células provenientes desta linha apresentam ainda a capacidade de expressar neuromedina B, uma proteína que se encontra envolvida no crescimento celular (ATCC, 2013). No que diz respeito à linha celular A549, esta é igualmente uma linha de adenocarcinoma que, ao contrário da linha anterior, expressa a proteína P53, mas está descrita como tendo uma mutação no oncogene *K-RAS* (ATCC, 2013).

No que diz respeito ao trabalho experimental verificou-se, em ambas as linhas celulares, segundo os resultados obtidos, que a sobrevivência celular após irradiação é dependente da dose e do tempo. Observou-se também que na linha celular H1299 a viabilidade das células é reduzida com o aumento do tempo e da dose de radiação, no entanto, com um menor efeito na linha celular A549 que apresenta viabilidade celular mais reduzida para o mesmo tempo e dose comparativamente com a linha celular H1299.

A linha celular que no nosso estudo indicou ser mais radiorresistente foi a linha celular H1299. As células desta linha não expressam a P53 e, por isso, certas vias de morte celular e de paragem do ciclo celular poderão não estar a ser inibidas como resultado da agressão pela radiação uma vez que, tal como previamente descrito, a P53 tem três principais funções que são o bloqueio do ciclo celular, a reparação do DNA e a indução de morte celular (Bitomsky & Hofmann, 2009). Os resultados mostrados no ensaio clonogénico, realizado para demonstrar os efeitos da radiação ionizante a longo prazo, mostram que a RI, na linha celular H1299 apresenta um efeito anti-proliferativo dependente da dose, muito semelhante ao verificado na linha A549. Verificaram-se diferenças significativas entre as duas linhas celulares, para doses entre os 2 e os 15 Gy, havendo uma maior sobrevivência das células da linha H1299.

Existem diferentes modelos para descrever a resposta celular à radiação. O modelo mais utilizado para ajustar os dados experimentais é o modelo linear-quadrático, em que o factor de sobrevivência é relacionado com a dose de radiação segundo uma exponencial com dois parâmetros:

$$SF = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

Outros modelos que permitem o ajuste de dados experimentais a uma curva de dose-resposta são, por exemplo, os modelos de alvo (um só alvo, um só toque; vários alvos, um só toque) ou o modelo linear-quadrático-cúbico.

Os dados experimentais obtidos não são ajustáveis de forma adequada aos modelos descritos, razão pela qual não foi determinada uma equação de curva de dose-resposta com esses dados. Esse ajuste poderia permitir a determinação de diferentes parâmetros, tais como a dose que reduz o SF a 50% (DL50), um indicador da sensibilidade da linha celular à radiação. No entanto, por comparação entre as linhas celulares para cada dose, foi possível verificar que a linha celular H1299 é mais resistente que a linha celular A549.

O tipo de morte celular apresentado pelas duas linhas celulares foi avaliado recorrendo à citometria de fluxo e confirmado por técnica histológica pela coloração de May Grunwald Giemsa realizada 48h após a irradiação. Os ensaios de citometria de fluxo revelaram uma diminuição da viabilidade celular, estando de acordo com os resultados obtidos através do ensaio de alamar *blue*. A linha celular H1299 mais uma vez demonstrou ser mais resistente que a linha celular A549, já que se verificou uma maior percentagem de viabilidade celular na primeira linha celular em todas as condições em estudo. Estes resultados vão de encontro aos obtidos com o ensaio clonogénico.

Foi descrito já por diversos autores que a radiação ionizante conduz a um diferente número de respostas celulares e ativação de diferentes vias de transdução de sinal (Mothersill & Seymour, 1997; Belyakov *et al.*, 2001; Watson *et al.*, 2000. É sabido ainda que existem diversas vias que poderão estar envolvidas na ativação da apoptose, variável de acordo com o tipo de linha celular, do estímulo que desencadeará a apoptose ou até da forma como o estímulo é transmitido (Bitomsky & Hofmann, 2009; Fei & El-Deiry, 2003).

A P53 é uma proteína que influencia o mecanismo de apoptose, já que uma das vias na qual a P53 está fortemente envolvida é na indução da transcrição da proteína BAX, que por sua vez ativa mecanismos de apoptose. No entanto, a ativação da apoptose poderá também ocorrer por vias independentes da P53. Um dos exemplos já documentados da indução de apoptose independentemente da P53 ocorre quando células do epitélio gastrointestinal são submetidas a radiação ionizante, que ativam a apoptose na ausência de P53. Foi também documentado que, em princípio, a apoptose independente de P53 demora mais tempo a ocorrer do que aquela que é auxiliada por esta proteína (Bitomsky & Hofmann, 2009; Fei & El-Deiry, 2003; Sak, 2003; Rupnirain, 2004).

A linha celular H1299 apresentou uma maior percentagem de morte por necrose comparativamente com a linha celular A549. Nesta última, o tipo de morte preferencial que ocorreu foi a apoptose inicial, no entanto para doses acima de 15Gy verificou-se também um aumento de necrose em relação ao controlo.

Apesar da linha celular H1299 não expressar P53, verifica-se que o número de células em apoptose inicial é aproximadamente igual em todas as condições, o que sugere que a apoptose inicial estará a ocorrer numa via dependente da P53.

No que diz respeito aos resultados obtidos por histologia com a coloração de May Grunewald Giemsa, observou-se um padrão de aumento da morte celular com aumento da dose de radiação, como verificado em ensaios anteriores, observando-se a existência de *blebbing* membranar, fragmentação nuclear e condensação da célula, sendo estas, características de células em apoptose. Observaram-se ainda as principais características de necrose com as doses mais elevadas, tais como, o aumento do volume celular, a ruptura da membrana citoplasmática e a fragmentação do DNA nuclear, o que vai de encontro ao já observado por outros autores (Joiner & Kogel, 2009).

As proteínas BAX e BCL-2 foram estudadas para verificar a existência de uma possível relação com a morte celular observada, uma vez que a apoptose induzida pela via intrínseca é normalmente acompanhada por um aumento da razão BAX/BCL-2. Na presença do aumento desta razão, as células estão mais propensas a entrar em apoptose inicial, tal como descrito por Sak e Rupnirain (Sak, 2003; Rupnirain, 2004).

Estudaram-se, inicialmente, os níveis basais de BAX e de BCL-2 em ambas as linhas celulares, expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF), de modo a perceber se existia diferença nos valores basais entre as duas linhas celulares. No estudo experimental observou-se que a expressão de BAX nas duas linhas celulares revelou ser bastante semelhante, ao contrário da expressão de BCL-2 que na linha celular A549 é tendencialmente superior, mas sem significância estatística.

Estudos prévios demonstraram que as células que apresentavam uma sobreexpressão de BAX e de BCL-2 não mostravam sinais de ativação de caspases e sobreviviam mesmo na presença de elevados níveis de Cit-c. As células da linha celular H1299 parecem ser mais radioresistentes, apesar de apresentarem níveis de BCL-2 mais baixos, o que aparentemente discorda do estudo efetuado por Rosse e os seus

colaboradores, no entanto estes resultados poderão ser explicados novamente pela não existência da proteína P53 (Rosse *et al.*, 2011).

Relativamente às células da linha celular H1299 que receberam diferentes doses de radiação, estas apresentaram um aumento da razão BAX/BCL-2 até aos 30 Gy, verificando-se uma diminuição com a dose de 60Gy. Na linha celular A549, verificou-se igualmente um padrão ligeiramente diferente ao anterior, com um aumento da razão gradual até aos 60Gy.

Durante a irradiação são produzidas diversas moléculas reativas através da radiólise da água, normalmente devido aos efeitos indiretos da radiação ionizante. As ROS produzidas poderão ainda originar outras moléculas através de diversas reações, podendo atravessar a membrana nuclear e induzir lesão no DNA, aumentando a peroxidação lipídica, oxidação proteica e ainda provocar alterações na homeostase do cálcio e de grupos sulfidrilo (Valko *et al.*, 2006). Vários autores demonstraram que uma elevada produção de ROS interfere com a transcrição de alguns genes e algumas vias de transdução de sinais (Thannickal *et al.*, 2000). Assim, dependendo da concentração de ROS, estas podem induzir a proliferação celular ou provocar morte e a inibição da mesma (Valko *et al.*, 2006).

Neste trabalho experimental verificou-se que na linha celular H1299 e para todas as doses testadas, ocorreu um aumento da produção de ROS, às 48h, com o aumento da dose de radiação ionizante. Na linha celular A549, verificou-se um comportamento ligeiramente diferente da linha anterior, havendo um aumento do progressivo da produção de ROS até aos 30 Gy, mas com a dose mais elevada testada (0,5Gy) ocorreu uma ligeira diminuição da produção do radical superóxido. O efeito observado na linha celular A549 poderá dever-se a uma sobrepressão da enzima

responsável pela eliminação deste radical, resultando assim desta reação o peróxido de hidrogénio.

O maior aumento do stresse oxidativo na linha celular H1299 poderá ainda ser devido à fase em que se encontra o bloqueio do ciclo celular. Este comportamento já descrito por Yamamori *et al.* O qual demonstrou a existência de níveis superiores de stresse oxidativo nas linhas celulares que após irradiação se encontram bloqueadas na fase G2/M quando comparadas com a fase G0/G1 e fase S (Yamamori *et al.*, 2012). Os níveis basais de GSH, molécula antioxidante por nós estudada, não revelou ser significativamente diferente entre as duas linhas. Para além disso, foram avaliados os níveis de GSH, de modo a ter uma noção se estes aumentavam simultaneamente com o aumento dos níveis de ROS. Esta relação não se verificou para nenhuma das linhas celulares estudadas, podendo estes resultados significar que estas foram consumidas e se encontram esgotadas.

Após irradiação, as células lesadas poderão sofrer atrasos ou mesmo bloqueio na progressão do ciclo celular. Este bloqueio poderá ocorrer nas diferentes fases do ciclo, seja na fase G1, fase S ou fase G2/M (Wang *et al.*, 2000; Yamamori, 2012; Novák *et al.*, 2012).

Alguns dos *checkpoints* do ciclo celular requerem a proteína P53 para a sua ativação, mas como a linha celular H1299 está descrita como sendo *null* para a P53, não a expressando, pode ser esta a explicação porque lhe será impossível ativar certas vias de sinalização e *checkpoints* (Zhou *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001).

Os resultados sugerem que na linha celular H1299 ocorrem grandes alterações a nível do ciclo celular, estando as células na situação controlo na fase G0/G1 e passando progressivamente, com o aumento da dose de radiação, a estar bloqueadas na

fase G2/M, sendo que com a dose mais elevada em estudo, perto de 90% das células se encontravam nesta fase do ciclo celular 48h após a irradiação.

Na linha celular A549, as células encontram-se maioritariamente na fase G0/G1, independentemente da dose, sendo que a percentagem varia entre 65 e 80%. Existe também um ligeiro aumento no pico pré-G0, que poderá estar relacionado com um aumento da apoptose. Com a dose mais baixa testada (0,5Gy) verificou-se ainda um ligeiro bloqueio na fase S. As células na fase G2/M sofreram igualmente uma ligeira alteração, verificando que na situação controlo 5% das células estão nesta fase enquanto que com a dose mais elevada testada (60Gy) este valor acresce para 20%.

O potencial de membrana mitocondrial foi também avaliado, porque este se poderá relacionar com os níveis de ROS produzidas, com a morte celular e com o bloqueio do ciclo celular. A mitocôndria encontra-se envolvida na ativação de diversos processos, podendo estes ser ativados por muitos mecanismos (Yanamori *et al.*, 2013).

Estudos anteriores, realizados por Yanamori e colaboradores provaram que após irradiação ocorria um aumento do conteúdo mitocondrial na célula, estando este associado à fase do ciclo celular em que as células se encontravam. Na fase G2/M observou-se-se que existia um maior conteúdo mitocondrial que nas fases G1 ou S (Yanamori *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos na linha celular H1299 relativamente ao potencial de membrana mitocondrial revelaram existir um aumento para a dose de 0,5 Gy, seguido de uma diminuição com valor estatístico ($p < 0,001$) em relação ao controlo para os 15 Gy, com um posterior aumento nas células irradiadas com 30 e com 60 Gy relativamente aos 15 Gy. O aumento verificado nos 30 e 60 Gy em relação aos 15 Gy poderá ser explicado pelo aumento do conteúdo mitocondrial que se dá na fase G2/M, e que se observa nos resultados obtidos no ciclo celular. Assim, com um maior conteúdo

mitocondrial ocorrerá uma maior formação de agregados da sonda JC1, aumentando a relação agregados/monómeros, o que é proporcional ao potencial de membrana mitocondria.

Durante a irradiação o DNA poderá ser lesado devido aos efeitos diretos da radiação, originando DSB ou SSB. A extensão da lesão induzida no DNA foi avaliada recorrendo ao ensaio cometa e os resultados obtidos foram os relacionados com os resultados da viabilidade celular, tanto obtidos pelo ensaio indireto do alamar *blue* como os resultados do ensaio clonogénico, verificando-se que existe uma maior resistência à radiação no caso da linha celular H1299. Nas imagens obtidas no ensaio cometa verificamos que na linha H1299, apesar de ocorrerem algumas lesões no DNA, existem ainda muitas células que após 48h parecem ainda ter o DNA integro, não se verificando qualquer tipo de alteração (Bitonsky & Hofmann, 2009).

A linha celular A549, pelo contrário com este tempo de incubação, revela lesões com uma extensão mais elevada, sendo que praticamente todos os núcleos celulares revelam uma cauda, evidenciando as lesões no DNA. Estes resultados vão de encontro com os resultados obtidos anteriormente, relacionando-se com a viabilidade celular e o fator de sobrevivência obtido no ensaio clonogénico.

6. Conclusão e Perspectivas Futuras

Com este trabalho pretendeu-se estudar quais os efeitos da RI em duas linhas distintas de CPNPC, nomeadamente nas linha celulares H1299 e A549.

Observou-se ao longo dos ensaios realizados, que a RI tem um efeito antiproliferativo e citotóxico para as células em estudo, sendo dependente da dose e do tempo, tal como esperado, foi nas doses mais elevadas que estes efeitos foram mais observados, nomeadamente na linha celular A549.

Relativamente às duas linhas celulares os resultados sugerem que a linha celular H1299, possa ser mais radioresistente que a linha celular A549. Esta linha celular apresentou ainda uma maior viabilidade quando sujeita às mesmas doses que a linha celular A549, e o tipo de morte, que ocorreu após 48h, de irradiação foi principalmente devido a necrose e apoptose. Já na linha celular A549 observamos uma menor viabilidade celular e o principal tipo de morte observado foi a apoptose. O ciclo celular foi bloqueado em momentos diferentes, às 48h, sendo que a linha celular H1299 bloqueou o ciclo na fase G2/M e a linha celular A549 continuou a ter um padrão parecido ao controlo com maior parte das células na fase G0/G1 do ciclo celular e um ligeiro aumento da percentagem de células na fase G2/M, podendo ser explicado pela expressão de P53, uma vez que este bloqueio, na fase G0/G1 está descrita como sendo dependente da atividade desta proteína.

Os nossos resultados sugerem ainda que na linha celular H1299 em que o bloqueio do ciclo celular ocorre maioritariamente na fase G2/M, em que alguns autores descrevem ocorrer um aumento da densidade mitocondrial e dos níveis de stresse oxidativo, esta linha apresenta ainda níveis basais mais elevados de BCL-2 o que poderá justificar uma eventual maior resistência à terapia, visto que nesta condição as células poderão conseguir sobreviver com maiores concentrações de Cit-c no seu citoplasma.

Na linha celular A549, verificámos menos alterações nos níveis de stresse oxidativo e na razão BAX/BCL-2, no entanto o efeito anti proliferativo foi superior, bem como as lesões induzidas no DNA, muito provavelmente por esta linha celular expressar P53. Uma vez que alguns autores sugerem ainda uma eventual participação desta proteína na geração de ROS.

Desta forma, é possível concluir que as linhas celulares apresentam mecanismos moleculares diferentes em resposta à exposição de RI e que ocorre o envolvimento de diversas moléculas, sendo estas responsáveis pela ativação de diferentes vias e pela radio resistência celular, podendo estas vir, num futuro próximo, ser alguns dos alvos no tratamento desta neoplasia.

No seguimento destes estudos parece-nos pertinente realizar um estudo dos níveis de outras espécies antioxidantes, de modo a verificar se a radiorresistência apresentada pela linha celular H1299 poderá advir ou não desse fator.

Estudos que por transfeção se consiga inibir a expressão de P53 na linha celular A549 ou expressá-la na linha celular H1299 poderão fornecer a informação relevante para clarificar como esta proteína poderá estar a influenciar a resistência à RI.

De igual modo, será importante combinar este tipo de terapia com outras, terapias, convencionais ou não, e verificar qual possui uma maior eficiência no controlo do crescimento tumoral

Bibliografia

1. Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C. and, & Pijnenborg, R. (2007). The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human reproduction (Oxford, England)*, 22(5), 1304-9.
2. American Cancer Society (2012) Lung Cancer (Small Cell)
3. American Cancer Society (2012) Radiation Therapy Principles.
4. American Cancer Society (2013) Understanding Radiation Therapy: A Guide for Patients and Families.
5. American Society for Therapeutic Radiology and Oncology. Answers to Your Radiation. Therapy Questions. Accessed at www.rtanswers.org on December 6, 2012.
6. Araújo, A., Barata, F., Barroso, S., Cortes, P., Damasceno, M., Parreira, A., Espírito Santo, J., Teixeira, E., Pereira, R. (2009) Custo do tratamento do cancro em Portugal. *Acta Med Port*, 22: 525-536.
7. ATCC. LGC: Advanced Catalogue Search, A549. Retrieved April 13, 2012, c from <http://www.lgcstandardsatcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CCL-185&Template=cellBiologyATCC>. LGC: Advanced Catalogue Search, A549. Retrieved April 13, 2012, c from <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CCL-185&Template=cellBiology>
8. ATCC.. LGC: Advanced Catalogue Search, H1299. Retrieved April 13, 2012, a from <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-5803&Template=cellBiology>
9. Azevedo, C. (1994) In *Biologia Celular e Molecular*. LIDEL, 4ªEdição (pp. 291-301)
10. Azzam, E. I., Toledo, S., Little, J. B. (2003) Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. *Oncogene*, 22: 7050-7057.
11. Barrera, G. (2011) Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncology*, 10: 5402-5423.
12. Belyakov, O. V., Malcolmson, A. M., Folkard, M. & Prise, K. M. (2001) Direct evidence for a bystander effect of ionizing radiation in primary human fibroblasts. *British Journal of Cancer*, 84: 674-679.
13. Bernier, J., Hall, E. J., & Giaccia, A. (2004). Radiation oncology: a century of achievements. *Nature reviews. Cancer*, 4(9), 737-47. doi:10.1038/nrc1451
14. Biosciences, BD (2000) 11032–01 *Introduction to Flow Cytometry : 11*

15. Bitomsky, N., & Hofmann, T. G. (2009). Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling - roles of p53, p73 and HIPK2. *The FEBS journal*, 276(21), 6074-83. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07331.x
16. Bitomsky, N., Hofmann, T. G. (2009) Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling - roles of p53, p73 and HIPK2. *FEBS J.* 276(21):6074-83
17. Boatright, K. M., & Salvesen, G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6), 725-731. doi:10.1016/j.ceb.2003.10.009
18. Bower & Waxman (2006) *Compêndio de Oncologia*, Instituto Piaget, 71.
19. Brady, L. W. (2011). *Advances in Radiation Oncology in Lung Cancer*. (J. Branislav, Ed.) Radiation Oncology (Second Edi.). Springer.
20. Brown, J. M., & Wouters, B. G. (1999). Apoptosis, P53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer research*, 59(7), 1391-9.
21. Bryan, Andrea K, Alexi Goranov, Angelika Amon, and Scott R Manalis (2010) Measurement of mass, density, and volume during the cell cycle of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(3): 999-1004.
22. Bucci, B., Misiti, S., Cannizzaro, A., Marchese, R., Raza, G. H., Miceli, R., Stigliano, A., Amendola, D., Monti, O., Biancolella, M., Amati, F., Novelli, G., Vecchione, A., Brunetti, E., De Paula, U. (2006) Fractionated ionizing radiation exposure induces apoptosis through caspase-3 activation and reactive oxygen species generation. *Anticancer Research*, 26: 4549-4558.
23. Cairns, R. Harris, I. S. & Mak, T. W. (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Câncer*, 11, 85-95.
24. Carvalho, H. de A. (2002). Radioterapia no câncér de pulmão. *J Pneumol*, 28(6), 345-350.
25. Ceresoli, G. L. (2012). FDG PET/CT metabolic tumour volume in small-cell lung cancer: better staging and prognostic stratification for an improved therapeutic strategy. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 39(6), 921-4. doi:10.1007/s00259-012-2094-z
26. Crinò, L., Weder, W., van Meerbeeck, J., & Felip, E. (2010). Early stage and locally advanced (non-metastatic) non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 21 Suppl 5(Supplement 5), v103-15. doi:10.1093/annonc/mdq207

27. Darzynkiewicz, Z, S Bruno, G Del Bino, W Gorczyca, M a Hotz, P Lassota, and F Traganos (1992) Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, 13(8): 795–808.
28. Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., & Melamed, M. R. (1980). New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry. *Cytometry*, 1(2), 98–108.
29. Decaudin, D., Geley, S., Hirsch, T., Castedo, M., Marchetti, P., Macho, A., Kofler, R., Kroemer, G. (1997) Bcl-2 and Bcl-X antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Research*, 57: 62-67.
30. Elmore, Susan (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicology Pathology*, 35(4): 495–516.
31. Fei, P., & El-Deiry, W. S. (2003). P53 and radiation responses. *Oncogene*, 22(37), 5774-83.
32. Fei, P., El-Deiry, W. S. (2003) P53 and radiation responses. *Oncogen*. 22(37):5774-83.
33. Ferreiro, C. (2007). Lung Cancer. (Edward Alcamo, Ed.)Lung Cancer. Chelsea House.
34. Ferrer, I. (1999) Role of caspases in ionizing radiatio-induced apoptosis in the developing cerebellum. *Inc. J Neurobiol*, 41: 49-558.
35. Foshier, Steve (2002) Essentials of Radiation Biology and Protection. Delmar.
36. Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1(5), 2315-9.
37. Gaudenzi, S., Pozzi, D., Toro P., Silvestri, I., Morrone S. & Castellano, A. (2004) Cell apoptosis specific marker found by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Spectroscopy*, 18, 415 – 422.
38. 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 : an international journal published in association with BIBRA*, 27(5), 1542–9.
39. Hei, T. M., Hong, M., Lieberman, H. B., Brenner, D. J., Amundson, S. A., Geard, C. R. (2008) Mechanism of radiation-induced bystander effects: a unifying model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60: 943-950.
40. Hocsak, E., Racz, B., Szabo, a, Mester, L., Rapolti, E., Pozsgai, E., Javor, S. (2010). TIP47 protects mitochondrial membrane integrity and inhibits oxidative-stress-induced cell death. *FEBS letters*, 584(13), 2953–2960.

41. Ikegaki, N., Katsumata, M., Minna, J. & Tsujimoto, Y. (1994) Expression of bcl-2 in small cell lung carcinoma cells. *Cancer Research*, 54: 6-8.
42. Jemal, A., Bray, F., Ferlay, J., & Ward, E. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer Journal Clinic*, 61:69–90
43. Johnson, D G, and C L Walker (1999) Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual review of pharmacology and toxicology* 39: 295–312.
44. Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A., Natale, C., Santacrose, R., Di Corcia, M. G., Lucchese, A., Dini, L., Pani, P., Santacrose, S., Simone, S., Bucci, R., Farber, E. (2002) Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol*,21: 165-170.
45. Kirkinezos, I. G. & Moraes, C. T. (2001) Reactive oxyge species and mitochondrial diseases. *Cell & developmental biology*, 294: 116-119.
46. Klionsky, D. J. (2007) Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 931-937.
47. Laranjo, M., 2010. Acção Intracelular da Terapia Fotodinâmica. Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra.
48. Liga Portuguesa Contra o Cancro (2013) O Linfoma Não Hodgkin (LNH). <http://www.ligacontracancro.pt/gca/index.php?id=204>
49. López-Guerrero, J. a, Bolufer-Gilabert, P., Marugán de la Concha, I., Barragán-González, E., & Vera-Sempere, F. J. (1998). Relationship of P53 molecular abnormalities with flow cytometry and growth factor receptor content in lung cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 269(1), 63–76.
50. Lorimore, S. A. *et al.* (2001) Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo : a mechanism for radiation-induced bystander effects?. *Oncogene*, 20: 7085-7095.
51. Lyng, F. M., Maguire, P., McClean, B., Seymour, C. & Mothersill, C. (2006) The involvement of calcium and MAP kinase signaling pathways in the production of radiation-induced bystander effects. *Radiaion. Research*, 165: 400–409.
52. Mcilwrath, A., Vasey, P. A., Ross, G. M. & Brown, R. (1994) Cell Cycle Arrests and Radiosensitivity of Human Tumor Cell Lines : Dependence on Wild-Type P53 for Radiosensitivity, *Radiaion. Research*, 16, 3718–3722.
53. Mey, Ulrich, Felicitas Hitz, Andreas Lohri, Stefanie Pederiva, Christian Taverna, Alexander Tzankov, Oliver Meier, Karen Yeow, and Christoph Renner (2012) Diagnosis and treatment of diffuse large B-cell lymphoma. *Swiss medical weekly* 142(January): 1–15.

54. Morgan, W. & Sowa, M. (2005) Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *PNAS*, 102, 14127-14128.
55. Mothersill, C. & Seymour, C. (1997). Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *International Journal Radiation Biology*, 71, 421–427.
56. Motyl, T., Grzelkowska, K., Zimowska, W., Skierski, J., Waręski, P., Płoszaj, T., & Trzeciak, L. (1998). Expression of bcl-2 and bax in TGF- β 1-induced apoptosis of L1210 leukemic cells. *European Journal of Cell Biology*, 75(4), 367–374. Ormerod, M. G. (2002). Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 265(1-2), 73–80.
57. National Cancer Institute (2007) Non-Hodgkin Lymphoma.
58. Novák, B., Sible, J. & Tyson, J. (2002) Checkpoints in the cell cycle. *Encyclopedia of life sciences*.
59. Pawlik, Timothy M, & Khandan Keyomarsi (2004) Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 59(4): 928–42.
60. Pinar, B., Henríquez-Hernández, L. A., Lara, P. C., Bordon, E., Rodriguez-Gallego, C., Lloret, M., Nuñez, M. I. (2010). Radiation induced apoptosis and initial DNA damage are inversely related in locally advanced breast cancer patients. *Radiation oncology (London, England)*, 5, 85.
61. Rajendran, S., Harrison, S. H., Thomas, R. A. & Tucker, J. D. (2010) The role of mitochondria in the radiation-induced bystander effect in human lymphoblastoid cells. *Radiation Research*, 175(2):159-71.
62. Rew, D. a, Karkera, R., Mullee, M. a, Julious, S. a, & Wilson, G. D. (1996). The flow cytometric analysis of total P53 protein content and proliferation indices in colorectal cancer, in relation to clinical outcome. *European journal of surgical oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 22(5), 508–15.
63. Rossi, A. , Palazzolo, G., Maione, P., Sacco, P. C., Ferrara, M. & Falanga, M. (2008) New targeted therapies and small-cell lung cancer. *Clinical lung cancer*, 271-9.
64. Rupnarain, C., Dlamini, Z., Naicker, S., & Bhoola, K. (2004). Colon cancer: genomics and apoptotic events. *Biological chemistry*, 385(6), 449-64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15255176>
65. Sak, A., Stueben, G., Groneberg, M., Böcker, W. and Stuschke, M. (2005) Targeting of Rad51-dependent homologous recombination: implications for the

radiation sensitivity of human lung cancer cell lines. *British Journal of Cancer*. 92, 1089–1097.

66. Sak, A., Wurm, R., Elo, B., Grehl, S., Pöttgen, C., Stüben, G., Sinn, B., et al. (2003). Increased radiation-induced apoptosis and altered cell cycle progression of human lung cancer cell lines by antisense oligodeoxynucleotides targeting p53 and p21(WAF1/CIP1). *Cancer gene therapy*, 10(12), 926-34. doi:10.1038/sj.cgt.7700649

67. Schwartz, Gary K, & Manish a Shah (2005) Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23(36): 9408–21.

68. Silva, R. (2012) Efeitos da radiação em Cancro do Pulmão. Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra.

69. Simms, E., Gazdar, A. F., Abrams, P. G. & Minna, J. (1980) Growth of human small cell (oat cell) carcinoma of the lung in serum-free growth factor-supplemented medium. *Cancer Research*, 40: 4356-4363.

70. Simms, E., Gazdar, A., Abrams, P. G. & Minna, J. D. (1980) Growth of human small cell (oat cell) carcinoma of the lung in serum-free growth factor-supplemented medium. *Cancer Research*, 40: 4356-4363.

71. Smits, E., Burvenich, C., & Heyneman, R. (1997). Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytotic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood. *Veterinary immunology and immunopathology*, 56(3-4), 259–69.

72. Thannickal, V. J., Fanburg BL. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*: 279(6):L1005-28. _

73. Toyokuni, S. *et al.* (1995) Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Letters*, 358: 1-3.

74. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006) Free radicals metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1-40.

75. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods*, 184(1), 39–51.

76. Wang, J. T. Y., & Whiteley, A. (1996). An improved method of cell cycle synchronisation for the heterotrophic dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* Biecheler analyzed by flow cytometry, *197*, 91–99.

77. Wang, P., Zhou, S., Xu, L., Lu, Y., Yuan, X., Zhang, H., Li, R. (2013). Hydrogen peroxide-mediated oxidative stress and collagen synthesis in cardiac fibroblasts: blockade by tanshinone IIA. *Journal of ethnopharmacology*, 145(1), 152–61.
78. Watson, G. E., Lorimore, S. A., McDonald, M. A. & Wright, E. G. (2000) Chromosomal instability in unirradiated cells induced *in vivo* by a bystander effect of ionizing radiation. *Cancer Research*, 60: 5608- 5611.
79. Watters, D. (1999) Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis. *Immunology and Cell Biology*, 77: 263-271.
80. Williamson, K. E., Kelly, J. D., Hamilton, P. W., McManus, D., & Johnston, S. R. (1998). Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with *in vitro* apoptosis and clinical resistance. *British Journal of Cancer*, 78(7), 553–554.
81. World Health Organization (2011) Ionizing radiation, health effects and protective measures.
82. Xu, B., Kim, S.-tae, Kastan, M. B., & Xu, B. O. (2001). Involvement of Brcal in S-Phase and G₂-Phase Checkpoints after Ionizing Irradiation Involvement of Brcal in S-Phase and G₂-Phase Checkpoints after Ionizing Irradiation. *Society*, 21(10), 3445-3450.
83. 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*: 15;53(2):260-70.
84. Yang, H., Assaad, N. & Held, K. D. (2005) Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-rayirradiated normal human fibroblasts. *Oncogene*, 24: 2096–2103.
85. Yin, E., Nelson, D. O., Coleman, M. A., Peterson, L. E., & Wyrobek, A. J. (2003). Gene expression changes in mouse brain after exposure to low-dose ionizing radiation. *International journal of radiation biology*, 79(10), 759-75. Informa UK Ltd UK. doi:10.1080/09553000310001610961
86. Zerp, S. F., Stoter, R., Kuipers, G., Yang, D., Van Blitterswijk, W. J., Bartelink, H., Rooswinkel, R., Lafleur, V. & Verheij, M. (2009). AT-101, a small molecule inhibitor of anti-apoptotic Bcl-2 family members, activates the SAPK/JNK pathway and enhances radiation-induced apoptosis. *Radiation oncology (London, England)*, 4, 47.

87. Zetter, B. R. (1998) Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med*, 49: 407-424.
88. Zhong, Z., Wu, D., Huang, J., Liang, H., Pan, Z., Zhang, W., & Lu, H. (2011). Progallin A isolated from the acetic ether part of the leaves of *Phyllanthus emblica* L. induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma BEL-7404 cells by up-regulation of Bax expression and down-regulation of Bcl-2 expression. *Journal of ethnopharmacology*, 133(2), 765–72.
89. Zhou, B.-bing S., & Elledge, S. J. (2000). checkpoints in perspective. *Nature*, 408(November), 433-439.
90. Ziegler, A., Luedke, G. H., Fabbro, D., Altmann, K. H., Stahel, R. A., Zangemeister-Wittke, U. (1997) Induction of apoptosis in small-cell lung cancer cells by an antisense oligodeoxynucleotide targeting the bcl-2 coding sequence. *Journal of the National Cancer Institute*, 89 (14): 1027-1036.

Anexos

Classificação TNM

O sistema TNM usado para descrever a extensão anatómica de uma neoplasia baseia-se em três fatores:

T - a extensão do tumor primário

N - a ausência ou presença e a extensão de metástase em nódulos linfáticos regionais

M - a ausência ou presença de metástase à distância

Tabela 3 - Classificação TNM. Adaptado de: TNM Classification of Malignant Tumours - 6th ed. Edited by L.H. Sobin and Ch. Wittekind. John Wiley & Sons, INC., Publication – 2002 ISBN 0-471-22288-7 (alk. Paper)

T	T_x	O tumor primário não pode ser avaliado
	T₀	Não há evidência de tumor primário
	T_{is}	Carcinoma <i>in situ</i>
	T₁, T₂, T₃, T₄	Tamanho crescente e/ou extensão local do tumor primário

N	Nx	Os nódulos linfáticos não pode m ser avaliados
	N0	Ausência de metástases em nódulos linfáticos regionais
	N1, N2, N3	Comprometimento crescente dos nódulos linfáticos regionais
M	Mx	A presença de metástases à distância não pode ser avaliada
	M0	Ausência de metástase à distância
	M1	Metástase à distância

