

Ricardo Pereira Santo

## Resposta Celular à Radioterapia

Estudo in vitro em linhas celulares do carcinoma da próstata humana

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Ricardo Pereira Santo

# Resposta Celular à Radiação Ionizante

Estudos *in vitro* em linhas celulares do carcinoma da próstata humana

Setembro 2017





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.

Capa:

Células tumorais de carcinoma da próstata, LNCaP, derivada de metástases linfáticas, após irradiação com 1,5 Gy de radiação X.

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

Benjamin Disraeli



# Agradecimentos

Todo este trabalho não foi apenas meu, não posso deixar de prestar o meu mais sincero agradecimento às pessoas que, de uma maneira ou outra, contribuíram para que conseguisse realizar este objetivo.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e diretora do Instituto de Biofísica, por me permitir a realização deste trabalho. Agradeço todo o seu apoio, na partilha de conhecimentos e experiência científica, e sobretudo pela ajuda na revisão do manuscrito.

Ao Professor Doutor Fernando Mendes, Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, um obrigado por me ter orientado ao longo deste trabalho. Por todos os conhecimentos e práticas laboratoriais transmitidos, pela paciência e esforço que depositou em mim, e pela amizade que fica para a vida.

Ao Professor Doutor Rui de Albuquerque Carvalho, por se disponibilizar para ser meu orientador interno, pela paciência que teve comigo e por ser o elo de ligação entre este trabalho e o Departamento de Ciências da Vida.

Às Professoras Doutoradas Ana Margarida Abrantes e Salomé Pires, Professoras Auxiliares da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pela imensa paciência que tiveram comigo ao longo deste trabalho, pela partilha de conhecimento, por todos os ensinamentos que me vão ser necessários ao longo da minha vida profissional.

À Dr.<sup>a</sup> Margarida Borrego, Diretora do Serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, por se ter disponibilizado os recursos essenciais para a realização deste trabalho. Queria agradecer a todos os técnicos, engenheiros, enfermeiros, por serem muito prestáveis sempre que precisei de ajuda.

À Doutora Mafalda Laranjo, pela prontidão em ajudar-me sempre que precisei de algo, pela simpatia, pela partilha de conhecimentos, um muito obrigado.

À Doutora Ana Cristina Gonçalves por me ter ajudado em tudo o que precisei, pela transmissão de conhecimento, sem nunca me negar ajuda e sempre com um sorriso na cara.

Aos Mestres Ricardo Teixo, Inês Marques, Rita Neves, Gonçalo Brites, Nuno Almeida, pela transmissão de conhecimentos, pela simpatia, pela ajuda prestada sem nunca hesitar, e pela grande paciência que tiveram comigo.

À Adriana, Beatriz, Leisa e Patrícia, por me terem ajudado em tudo o que precisei,

sempre com um sorriso na cara e com boa disposição, tornando os meus dias mais divertidos e alegres.

À Licínia, Mafalda e Neuza pela grande vontade em serem prestáveis, pela paciência e pela amizade.

À Ana Lúcia, Kleine e Nicole, por tudo o que fizeram por mim, sempre me ajudaram em tudo o que precisei, pelas conversas, pelos ensinamentos, e pelos dias em que ficávamos até tarde a trabalhar, tenho a certeza que esta amizade vai ser para a vida.

Ao Paulo Teixeira, pela simpatia, pelo companheirismo, pelas conversas que tínhamos na “privada”, pelos ensinamentos e pela ajuda prestada sempre que precisei e sempre com uma grande alegria.

À Sra. D. Cláudia Caridade, secretária do Instituto de Biofísica, pela sua disponibilidade, simpatia e apoio demonstrado.

Ao Telmo, Gonçalo, Rita e Adriana, pela grande amizade, preocupação, por estarem sempre do meu lado, e porque sem vocês era tudo mais difícil.

À minha família, pais, avós, tios e primos pelo apoio, pela educação que me transmitiram que me fez a pessoa que sou hoje, pelo grande esforço que fizeram para que o meu sonho se tornasse realidade. Um obrigado do fundo do coração!

Por último, à minha maior inspiração para continuar a acreditar em mim, à minha namorada Bruna que durante estes anos estiveste sempre a meu lado, a dar-me força, e a puxar-me para cima nos dias menos bons, abriste-me os olhos para muita coisa, e sempre com aquele teu jeito de ser. A tua força é brutal e foi essencial neste projeto, mesmo assim estas palavras não chegam para te agradecer tudo o que fizeste por mim. O meu eterno obrigado!

## Resumo

Os tumores malignos são mais do que massas isoladas de células tumorais em proliferação. De facto, podemos considerá-los como tecidos complexos compostos por conjuntos distintos de células. O cancro da próstata é uma das neoplasias malignas mais diagnosticadas entre os homens no mundo.

O cancro da próstata é geralmente um tumor que apresenta baixas taxas de proliferação e, geralmente apresenta um baixo valor  $\alpha/\beta$ , de cerca de 1-3 Gy. Quando a opção terapêutica é a radioterapia, a modalidade que se utiliza no cancro da próstata é, por norma, a radioterapia hipofracionada. Uma vez que sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ação anticancerígena da radioterapia ainda muito há por explorar, este trabalho tem como objetivo caracterizar, do ponto de vista celular e molecular, os efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante em linhas celulares de carcinoma da próstata.

Para determinar a resposta celular, duas linhas celulares humanas de cancro da próstata (PC3 e LNCaP) foram expostas a radiação ionizante, na forma de raios-X, com doses de radiação a variarem entre o 0,5 Gy e os 12 Gy. Primeiramente, avaliou-se a sobrevivência celular das duas linhas PC3 e LNCaP, seguidamente, avaliou-se a viabilidade e a proliferação celular para ambas as linhas de cancro da próstata, posteriormente, determinou-se o principal tipo de morte associado à radiação ionizante das células das duas linhas PC3 e LNCaP, de seguida, avaliaram-se os níveis de stresse oxidativo (peróxidos, anião superóxido) e das defesas anti-oxidantes (GSH), 48 horas após irradiação e por fim, avaliou-se o ciclo celular para as duas linhas celulares de cancro da próstata.

A linha LNCaP apresentou uma maior radiosensibilidade aos raios-X do que a linha PC3. A radiação ionizante mostrou efeito antiproliferativo e efeito citotóxico para ambas as linhas celulares de cancro da próstata. A linha PC3 mostrou que o tipo de morte principal foi morte por apoptose, enquanto na linha LNCaP a morte ocorreu por necrose, após irradiação com radiação ionizante. Para ambas as linhas houve um aumento do stresse oxidativo, com o aumento dos peróxidos e do anião superóxido e diminuição da expressão da GSH. Para ambas as linhas celulares o bloqueio do ciclo celular ocorreu na fase  $G_2/M$ , após exposição à radiação ionizante.

Esperamos que os resultados obtidos neste trabalho contribuam para uma melhor eficácia da radioterapia pois levantam pistas importantes para as diferentes respostas clínicas.

# Abstract

Malignant tumors are more than isolated masses of proliferating tumor cells. In fact, we can consider them as complex tissues composed of distinct sets of cells. Prostate cancer is one of the most commonly diagnosed malignancies among men in the world.

Prostate cancer is generally a tumor that has low proliferation rates and generally has a low  $\alpha / \beta$  value of about 1-3 Gy. When the therapeutic option is radiotherapy, the modality used in prostate cancer is usually hypofractionated radiotherapy. Since the cellular and molecular mechanisms involved in the anticancer action of radiotherapy are still to be explored, this work aims to characterize, from the cellular and molecular point of view, the direct and indirect effects of ionizing radiation on carcinoma cell lines prostate. To determine the cellular response, two human prostate cancer cell lines (PC3 and LNCaP) were exposed to ionizing radiation in the form of X-rays at radiation doses ranging from 0,5 Gy to 12 Gy. Firstly, the cell survival of the two PC3 and LNCaP lines was evaluated. Cell viability and proliferation were then assessed for both prostate cancer lines. Next, the main type of death associated with the ionizing radiation of the cells of the two PC3 and LNCaP lines was determined. Subsequently, the levels of oxidative stress (peroxides, superoxide anion) and anti-oxidant defenses (GSH) were evaluated 48 hours after irradiation. Finally, the cell cycle was assessed for the two prostate cancer cell lines.

The LNCaP line showed greater X-ray radiosensitivity than the PC3 line. Ionizing radiation showed antiproliferative effect and cytotoxic effect for both prostate cancer cell lines. The PC3 line showed that the type of main death was death by apoptosis, while in the LNCaP line death occurred by necrosis after irradiation with ionizing radiation. For both lines there was an increase in oxidative stress, with the increase of the peroxides and superoxide anion and decrease of GSH expression. For both lines the cell cycle was blocked G<sub>2</sub>/M phase, after exposure to the ionizing radiation.

We hope that the results obtained in this work contribute to a better efficacy of radiotherapy because they raise important clues for the different clinical responses

# Índice

Introdução .....	3
1.2.1 A Próstata .....	4
1.2.2 Epidemiologia .....	6
1.2.3 Diagnóstico .....	8
1.2.4 Estadiamento .....	11
1.2.5 Terapêutica .....	13
1.2.5.1 Vigilância Ativa .....	13
1.2.5.2 Prostatectomia Radical .....	14
1.2.5.3 Hormonoterapia .....	14
1.2.5.4 Quimioterapia .....	15
1.2.5.5 Radioterapia .....	15
1.3 Radioterapia .....	17
1.3.1 Tipos de Radioterapia .....	17
1.4 Efeitos Biológicos da Radiação Ionizante .....	19
1.4.1 Radiação Ionizante e Ciclo Celular .....	21
1.4.2 Radiação Ionizante e Morte Celular .....	24
1.4.3 Radiação Ionizante e Stresse Oxidativo .....	26
Objetivos .....	29
Materiais e Métodos .....	33
3.1 Cultura Celular .....	35
3.2 Radiação Ionizante .....	36
3.3 Ensaio Clonogénico .....	38
3.4 Viabilidade e Proliferação Celular .....	39
3.4.1 Ensaio do Azul Tripano .....	39
3.4.2 Cálculo do Índice Proliferativo .....	40
3.5 Morte celular .....	41
Coloração May-Grünwald Giemsa .....	41
3.6 Citometria de Fluxo .....	41
3.6.1 Ciclo Celular .....	42
3.6.2 Morte Celular .....	43
3.6.3 Stresse Oxidativo e Defesa Antioxidante .....	44
3.7 Análise Estatística .....	45

<b>Resultados.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Sobrevivência, Viabilidade e Proliferação Celulares .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2 Tipos de morte celular.....</b>	<b>61</b>
<b>4.3 Stresse Oxidativo .....</b>	<b>66</b>
<b>4.4 Ciclo Celular .....</b>	<b>74</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>79</b>
<b>Conclusão e Perspetivas Futuras.....</b>	<b>87</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>91</b>

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

·H	Radical de hidrogénio
·NO	<i>Nitric oxide</i>
·OH	Radical hidroxilo
<b>3D-CRT</b>	<i>Three-dimensional conformal radiation therapy</i>
<b>APAF-1</b>	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
<b>ATM</b>	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
<b>ATR</b>	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related</i>
<b>ATRIP</b>	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related-interacting protein</i>
<b>AV</b>	Anexina V
<b>BAX</b>	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
<b>BCL-2</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>BRCA1</b>	<i>Breast cancer 1</i>
<b>BRCA2</b>	<i>Breast cancer 2</i>
<b>BRCT</b>	<i>Breast cancer associated-c-terminal</i>
<b>CDC25</b>	Fosfatase CDC25
<b>CDK</b>	<i>Cyclin-dependent kinases</i>
<b>CDKN1 (P21)</b>	<i>Cyclin-dependent kinase Inhibitor 1 (P21)</i>
<b>CDKN2 (P16)</b>	<i>Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2 (P16)</i>
<b>CHK</b>	<i>Cell cycle checkpoint kinase</i>
<b>CKI</b>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
<b>CSCs</b>	<i>Cancer stem cells</i>
<b>CT</b>	<i>Computed tomography</i>
<b>CYP17</b>	<i>Steroid 17-alpha-hydroxylase</i>
<b>DCF</b>	Diclorofluoresceína
<b>DCFH<sub>2</sub>-DA</b>	<i>2',7'-dichlorofluorescein-diacetate</i>
<b>DHE</b>	Dihidroetídio
<b>DISC</b>	<i>Death-inducing signaling complex</i>
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose letal média
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>

<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<b>EOH</b>	<i>2-hydroethidium</i>
<b>FADD/MORT1</b>	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
<b>FS</b>	Fator de sobrevivência
<b>GR</b>	Grau de recomendação
<b>GSH</b>	Enzima glutationa reduzida
<b>GY</b>	<i>Gray</i>
<b>H<sub>2</sub></b>	Hidrogénio molecular
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogénio
<b>HO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	Radical hidroperoxil
<b>HOXB13</b>	<i>Homeobox protein Hox-B13</i>
<b>IConf 95%</b>	Intervalo de confiança a 95%
<b>IMRT</b>	<i>Intensity-modulated radiation therapy</i>
<b>IP</b>	Iodeto de propídeo
<b>MRI</b>	<i>Magnetic resonance imaging</i>
<b>MRN</b>	<i>MRE11-RAD50-NBS1</i>
<b>MU</b>	<i>Monitor unit</i>
<b>NE</b>	Nível de evidência
<b>NOS</b>	<i>Nitric oxide synthase</i>
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	lão superóxido
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Anião peroxinitrito
<b>P53</b>	Proteína 53
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PE</b>	<i>Plate efficiency</i>
<b>PET-CT</b>	<i>Positron emission tomography-computed tomography</i>
<b>PSA</b>	<i>Prostate-specific antigen</i>
<b>RNS</b>	<i>Reactive nitrogen species</i>
<b>RO</b>	Alcoxil
<b>ROO<sup>-</sup></b>	Peroxilo
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>
<b>RPA</b>	<i>Replication protein A</i>
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase

<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i>
<b>TRADD</b>	<i>Tumor necrosis factor type 1-associated DEATH domain protein</i>
<b>TRUS</b>	<i>Transrectal ultrasonography</i>
<b>WEE1</b>	Cinase WEE1



## **Introdução**



A compreensão das doenças neoplásicas é facilitada pelo conjunto de características ou marcas associadas ao cancro. Hanahan e Weinberg definiram essas marcas de cancro como capacidades distintas e complementares que permitem o crescimento tumoral e a disseminação metastática (Hanahan e Weinberg, 2011). Estes autores especificaram estas marcas como: a autossuficiência nos sinais de crescimento, insensibilidade a inibidores de crescimento, escape ao sistema imunitário, imortalização celular, promoção da inflamação pelo tumor, invasão e metastização, indução da angiogénese, instabilidade genómica e mutações, resistência á morte celular e desregulação energética mitocondrial, como se pode observar na Figura 1.



Figura 1: Ilustração que mostra as características que definem o cancro. Adaptado de [(Hanahan e Weinberg, 2011)].

Os autores afirmam que as células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico, através da aquisição de um conjunto destas características, e que o processo de múltiplas etapas na patogénese do tumor humano poderia ser racionalizado pela necessidade das células adquirirem os traços que as tornam malignas. Os tumores malignos são mais do que massas isoladas de células tumorais em proliferação. De facto, podemos considerá-los como tecidos complexos compostos por conjuntos distintos de células. Deste modo, a biologia dos tumores não pode ser entendida simplesmente pela enumeração das características das células

tumorais, pelo que as contribuições do “microambiente tumoral” devem igualmente ser consideradas para a tumorigénese (Hanahan e Weinberg, 2011).

O cancro é uma das principais causas de morbilidade em todo o mundo, e estima-se que tenham ocorrido 14,1 milhões de novos casos de cancro em 2012. Aproximadamente 44% dos casos de cancro e 53% das mortes a ele associadas ocorrem em países com um baixo ou mediano Índice de Desenvolvimento Humano (Ferlay *et al.*, 2015).

### 1.2.1 A Próstata

O sistema geniturinário masculino é constituído por um conjunto de órgãos, alguns dos quais com papel importante na reprodução humana. No género masculino, este sistema apresenta importantes glândulas acessórias pois fornecem fluidos que lubrificam o sistema ductal e nutrem os espermatozóides (Hellstrom, 1997).

A próstata humana é uma das glândulas sexuais acessórias masculinas, sendo as outras as vesículas seminais e a glândula de Cowper (Prins, 2010). A próstata tem o tamanho de uma noz, situa-se na base da bexiga em frente do reto e é atravessada pela uretra, como podemos ver na Figura 2 (Aaron, Franco e Hayward, 2016). No homem adulto, a próstata forma um complexo glandular túbulo-alveolar. Numa perspetiva axial, esta glândula parece ter uma forma arredondada, elíptica ou triangular e por volta dos 20 anos pesa aproximadamente 20 gramas (Kumar e Majumder, 1995).

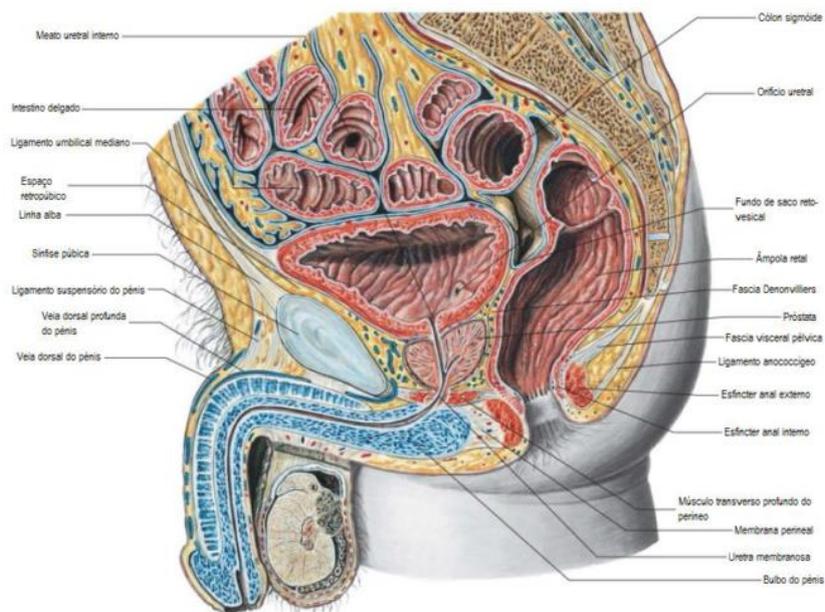


Figura 2: Próstata adulta e estruturas envolventes. Adaptado de[(Franco, 2015)].

A próstata apresenta várias funções dependentes das suas vertentes, exócrina e endócrina. Como glândula exócrina, contribui para a formação do líquido seminal com pequenas moléculas, incluindo enzimas que facilitam a fertilidade. Enquanto glândula endócrina, ajuda na rápida conversão da testosterona em dihidrotestosterona, um androgénio mais potente; as elevadas concentrações de zinco no líquido seminal humano parece originar-se principalmente da secreção da glândula prostática e parece atuar como agente antibacteriano (Kumar e Majumder, 1995).

Atualmente, a nomenclatura frequentemente utilizada para descrever a próstata humana é a de McNeal (McNeal, 1981). A próstata é um órgão anatomicamente heterogéneo, composto por quatro regiões, como mostra na Figura 3. A zona periférica corresponde a 70% do volume da zona glandular da próstata, rodeia a uretra distal, e representa a zona de origem da maior parte dos carcinomas. A zona central é uma região pequena que apresenta uma composição glandular diferente e é relativamente imune ao cancro. Esta zona representa 25% da zona glandular da próstata e rodeia os ductos ejaculatórios. A zona de transição corresponde a 5% da zona glandular da próstata, rodeia a uretra proximal e é a zona onde se desenvolve a hiperplasia benigna da próstata. Por último, a zona fibromuscular representa a parte não glandular da próstata, e forma toda a superfície anterior da próstata. É formada essencialmente por tecido muscular e fibroso (McNeal, 1981).

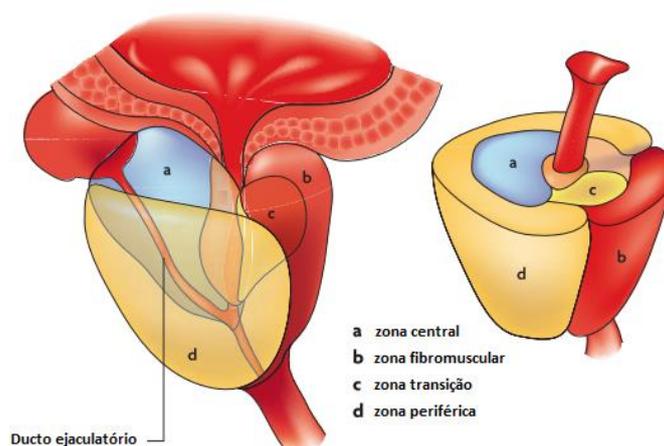


Figura 3: Estrutura de uma próstata adulta humana. Ilustração que mostra as três regiões glandulares e uma região não glandular da próstata descritas por McNeal. Adaptado de [(Marzo, De et al., 2007)].

A próstata normal, na sua forma jovem adulta, apresenta 5 tipos de células acinares, tais como as células microvilares, as células secretórias, as células de Holey, as células cratera e as células nuas. Além destes tipos de células também encontramos as células basais, as células

estaminais e as células neuroendócrinas na próstata (Kumar e Majumder, 1995).

## 1.2.2 Epidemiologia

O cancro da próstata é uma das neoplasias malignas mais diagnosticadas entre os homens no mundo, e é o segundo cancro mais frequente nos homens e o quarto mais comum tendo em conta todos os tipos de cancro (Figura 4).

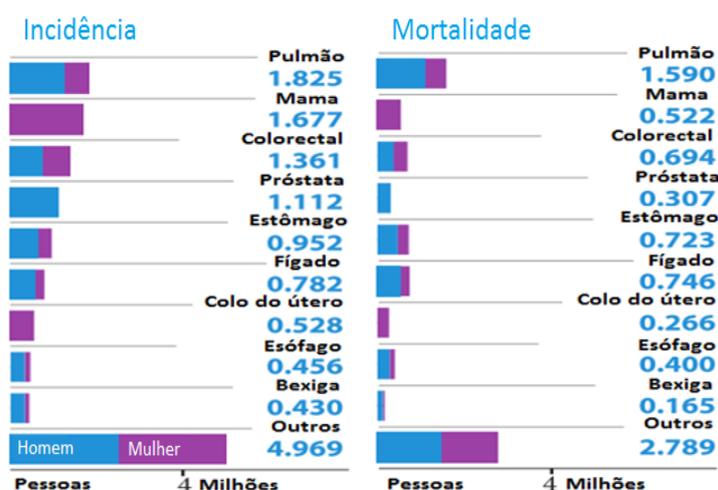


Figura 4: Estimativa mundial de novos casos de cancro e de mortes, por tipo de cancro e de género. [Adaptado de (Bray et al., 2013)].

Em 2012, 15% dos novos casos diagnosticados com cancro, em homens, foram de cancro da próstata. A incidência do cancro da próstata é maior na Austrália/Nova Zelândia e menor na Ásia Central e do Sul. A variação da incidência entre países poderá refletir diferentes fatores de risco assim como diferentes métodos de rastreio e de diagnóstico (Smittenaar *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016).

Em Portugal, de acordo com os dados mais recentes, o cancro da próstata foi o cancro mais frequente entre os homens em 2009, com 5433 novos casos, o que representa 22,4% de todos os cancros (Pina *et al.*, 2016).

Vários fatores podem afetar o risco de um homem desenvolver cancro da próstata, entre os quais, a idade, a etnia, os antecedentes familiares assim como as alterações genéticas (American Cancer Society, 2016). A idade é o fator de risco mais importante para o cancro da próstata, segundo Wu *et al* (Wu e Gu, 2016). A probabilidade de diagnóstico de cancro da próstata é de 1 em 325 homens, para homens com menos de 50 anos; para homens com idades

entre os 50 e os 59 anos a probabilidade aumenta, substancialmente, para 1 em 48 homens; nas idades entre os 60 e os 69 a probabilidade é de 1 em 17 homens e para homens com mais de 70 anos a probabilidade aumenta para 1 em 10 homens. (American Cancer Society, 2016; Wu e Gu, 2016).

Em relação à etnia, homens afro-americanos e homens das Caraíbas com ancestrais africanos têm mais probabilidade de ter cancro da próstata. Por outro lado, homens ázio-americanos e hispânicos apresentam menor probabilidade de o desenvolver. A justificação para estas diferenças entre as várias etnias ainda não é conhecida (American Cancer Society, 2016).

O risco de desenvolver cancro da próstata aumenta quando há história familiar. Este tipo de cancro é uma das neoplasias mais comuns e pode ter origem hereditária, apesar de que a suscetibilidade da doença e a progressão da doença apresentarem diferentes mecanismos que envolvem diferentes genes (Szulkin *et al.*, 2017; Witte, 2016). O estudo “*Nordic Twin*” estimou que para o cancro da próstata, a herança genética poderá contribuir em cerca de 58% para o seu surgimento, ou seja, os resultados mostraram que existe uma maior contribuição genética para o risco de desenvolver cancro da próstata, valor mais elevado que para todos os outros cancros (Hjelmborg *et al.*, 2014; Wu e Gu, 2016).

Algumas alterações nos genes parecem aumentar o risco de cancro da próstata, como por exemplo, as mutações nos genes *breast cancer 1 (BRCA1)* e *breast cancer 2 (BRCA2)*, bem como os homens com síndrome de *Lynch*, os quais apresentam maior risco de desenvolver cancro da próstata (American Cancer Society, 2016). Os genes *BRCA1* (localizado no cromossoma 17) e *BRCA2* (localizado no cromossoma 13), participam no controlo do crescimento celular. Mutações mais extensas nos genes *BRCA1 early onset* e *BRCA2 early onset* contribuem para um risco mais elevado de cancro da próstata, enquanto mutações menos extensas no gene *BRCA2* contribuem para um risco elevado de desenvolver cancro da mama (Lopes, 2014). De acordo com alguns autores, os homens portadores de mutações no gene *BRCA2* apresentam 5 vezes mais probabilidade de ter cancro da próstata do que a população geral (Mersch *et al.*, 2015). O gene *homeobox protein Hox-B13 (HOXB13)* é igualmente muito importante no desenvolvimento da próstata e mutações neste gene mostraram estar ligadas ao diagnóstico do cancro da próstata em idades mais jovens (American Cancer Society, 2016).

### 1.2.3 Diagnóstico

O rastreio do cancro da próstata tem como principal objetivo identificar homens com esta neoplasia, tanto numa fase precoce onde a cura é possível, assim como, em homens com risco elevado de morte devido a esta neoplasia. As recomendações para o rastreio e para a deteção precoce do cancro da próstata encontram-se sumariadas na Tabela 1 (Ramon e Denis, 2007).

Tabela 1: Orientações para rastreio e deteção precoce de cancro da próstata. [Adaptado de (Mottet *et al.*, 2016)]

Recomendação	NE	GR
Não submeter os homens a testes PSA sem aconselhá-los sobre os riscos e benefícios potenciais	3	B
Oferecer uma estratégia individualizada adaptada ao risco para a deteção precoce de um homem bem informado com esperança de vida de pelo menos 10-15 anos	3	B
Oferecer testes de PSA a homens com elevado risco de ter cancro da próstata: <ul style="list-style-type: none"><li>• Homens com idade &gt;50 anos</li><li>• Homens com &gt;45 anos e história familiar de CP</li><li>• Homens afro-americanos com idade &gt;45 anos</li><li>• Homens com PSA&gt;1ng/ml e com idade ≥40 anos</li><li>• Homens com PSA&gt;2 ng/ml e com idade ≥60 anos</li></ul>	2b	A
Oferecer uma estratégia adaptada ao risco com intervalos de acompanhamento de 2 anos para aqueles que estão inicialmente em risco: <ul style="list-style-type: none"><li>• Homens com PSA&gt;1ng/ml e com idade ≥40 anos</li><li>• Homens com PSA&gt;2ng/ml e com idade ≥60 anos</li></ul>	3	C
Decidir sobre a idade em que o diagnóstico precoce de cancro da próstata deve ser interrompido com base na expectativa de vida; Homens com uma esperança de vida inferior a 15 anos provavelmente não beneficiarão	3	A

Legenda: **PSA** = antígeno específico da próstata; **NE** = nível de evidência (1- Informação recolhida a partir de vários ensaios clínicos aleatorizados ou meta-análises; 2- Informação recolhida a partir de um único ensaio clínico aleatorizado ou estudos alargados não aleatorizados; 3- Opinião consensual dos especialistas e/ou pequenos estudos, estudos retrospectivos e registos); **GR** = grau de recomendação (A- Existem evidências e/ou consenso geral de que determinado procedimento/tratamento é benéfico, útil e eficaz; B- Existem evidências contraditórias e/ou divergência de opiniões sobre a utilidade/eficácia de determinado tratamento ou procedimento; C- Existem evidências e/ou consenso geral de que determinado procedimento/tratamento não é benéfico/ eficaz e poderá ser em certas situações prejudicial); **CP** = cancro da próstata.

Apesar da evolução mais comum do cancro da próstata ser lenta, assim como a manifestação dos seus sintomas, pode ser diagnosticado através de exames médicos específicos (Salinas *et al.*, 2014). As recomendações do quotidiano para o rastreio do cancro da próstata envolvem a quantificação, no soro sanguíneo, do antígeno específico da próstata (PSA, do inglês *prostate-specific antigen*) associado ou não ao toque retal (Moyer, 2012; Salinas *et al.*, 2014).

O PSA é uma glicoproteína produzida pelas células epiteliais que revestem a próstata. Porém, esta proteína é produzida tanto por células normais como por células cancerosas, daí que seja normal que todos os homens apresentem valores de PSA no sangue (Balk, Ko e Bublely, 2003), se bem que com valores baixos. A quantificação do PSA consiste na recolha de sangue, com a finalidade de detetar a presença desta glicoproteína. Este teste é usado, maioritariamente, para fazer o rastreio em pessoas que não apresentem sintomas de cancro da próstata. Os resultados que demostrem valores elevados desta proteína, apenas indicam que existe uma maior probabilidade de se vir a desenvolver cancro da próstata (Mottet et al., 2016).

No que diz respeito ao toque retal, é uma técnica utilizada em conjunto com outros testes e não como uma avaliação individual do cancro da próstata. Baseia-se na introdução de um dedo, revestido com uma luva lubrificada, no reto para detetar a existência de alguma área irregular, de consistência dura que possa ser indício de cancro, como se pode observar na Figura 5 (Ramon e Denis, 2007).

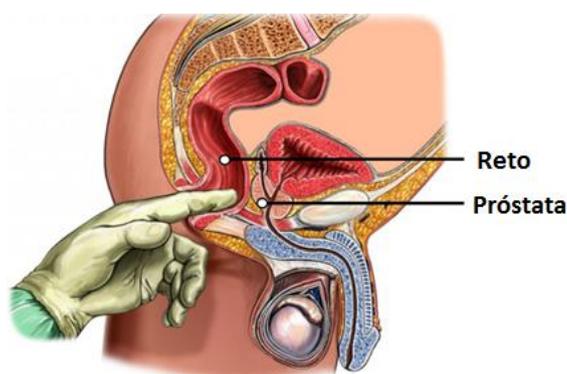


Figura 5: Toque retal – onde se pode sentir próstata através da parede do reto. Para detetar alguma anormalidade na próstata, o médico insere o dedo no reto. [Adaptado de (Lavery, Kirby e Chowdhury, 2016)].

Estudos mostraram que o teste do PSA consegue identificar com maior eficiência pessoas com risco de cancro do que o toque retal, contudo o teste do PSA é mais eficiente ainda em conjunto com o toque retal (American Cancer Society, 2016; Catalona *et al.*, 2017; Mottet *et al.*, 2016; Moyer, 2012; Ramon e Denis, 2007).

Caso os resultados do teste do PSA associado ao toque retal evidenciem probabilidade de existir cancro, o médico irá efetuar uma biópsia. A biópsia consiste na colheita de pequenas amostras do tecido da próstata que posteriormente são coradas e analisadas ao microscópio. O sistema de classificação de Gleason, ou escala de Gleason, até à data, é um dos preditores de prognóstico de cancro da próstata mais robustos e foi desenvolvido entre 1966 e 1974 por Donald Gleason (Lavery, Kirby e Chowdhury, 2016). A escala de Gleason é, habitualmente, usada

para se estimar o grau de agressividade do cancro da próstata e ajudar a avaliar o prognóstico, com recurso a amostras de uma biopsia da próstata. A escala classifica os padrões histológicos com números de 1 a 5, onde os números mais elevados indicam tumores mais agressivos, mais indiferenciados e de pior prognóstico, enquanto números mais baixos indicam tumores com baixa agressividade, mais diferenciados, como se pode observar no esquema da Figura 6 (Epstein *et al.*, 2016; Helpap *et al.*, 2015).

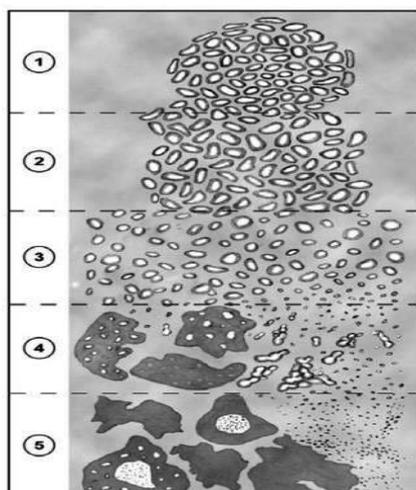


Figura 6: Escala de Gleason. Para obter uma pontuação de Gleason, os médicos atribuem valores numéricos a duas populações de células, as células cancerígenas e as células saudáveis. Os valores são combinadas para se obter a pontuação de Gleason. Os valores da escala de Gleason variam de 1 a 5. [Adaptado de (Lavery, Kirby e Chowdhury, 2016)].

Outras técnicas, tais como as técnicas de imagem, indicam-nos a localização do tumor e contribuem para a correta determinação da sua extensão e, conseqüentemente, do estadiamento. A técnica da ecografia transretal (TRUS, do inglês *transrectal ultrasonography*), frequentemente usada para a obtenção de imagens da próstata, permite não só determinar o tamanho da próstata, mas também a zona anatómica que está afetada pelo cancro. A imagem de ressonância magnética (MRI, do inglês *magnetic resonance imaging*) permite uma avaliação funcional e anatómica da próstata, pelo que muitas vezes pode ser utilizada para guiar as biópsias à próstata. A tomografia computadorizada (CT, do inglês *computed tomography*) permite verificar a existência de gânglios linfáticos vizinhos invadidos ou não, assim como a MRI (American Cancer Society, 2016; Turkbey, Pinto e Choyke, 2009).

## 1.2.4 Estadiamento

A extensão do tumor é um dos fatores mais importantes no que diz respeito à seleção do tratamento e à avaliação do prognóstico do doente com carcinoma da próstata. A extensão é baseada nos resultados da biópsia, na quantificação do PSA no sangue e nos resultados de outros exames realizados para apurar o quanto o tumor já se tenha propagado (American Cancer Society, 2016).

O sistema para estadiamento mais usado é o sistema TNM [tumor primário (T); gânglios linfáticos (N) e metástases à distância (M)]. A classificação T mostra como o cancro se propagou na próstata e em volta desta, a classificação N indica se o cancro se propagou para os gânglios linfáticos regionais e a classificação M mostra se o cancro se metastizou para outros locais do organismo (Edge e Compton, 2010; Marques, 2016).

A classificação TNM apresenta subdivisões, permitindo obter informações das zonas afetadas pelo cancro, bem como agrupar os doentes em grupos com prognóstico semelhante, como mostra na Tabela 2.

Tabela 2: Sistema de classificação de TNM para o cancro da próstata. [Adaptado de (Heidenreich *et al.*, 2011)]

<b>T Tumor primário</b>	
<b>TX</b>	Tumor primário não avaliável
<b>T0</b>	Sem evidência de tumor primário
<b>T1</b>	Tumor clinicamente impercetível, não palpável ou visível através de imagem T1a Tumor por achado histológico incidental em 5% ou menos do tecido ressecado T1b Tumor por achado histológico incidental em mais do que 5% do tecido ressecado T1c Tumor identificado por biópsia com agulha (ex: devido a nível elevado de antigénio específico da próstata)
<b>T2</b>	Tumor limitado à próstata <sup>1</sup> T2a Tumor afeta metade de um lóbulo ou menos T2b Tumor afeta mais de metade de um lóbulo, mas não ambos os lóbulos T2c Tumor afeta ambos os lóbulos
<b>T3</b>	Tumor invade para lá da cápsula prostática <sup>2</sup> T3a Extensão extracapsular (unilateral ou bilateral) T3b Tumor estende-se à(s) vesícula(s) seminal(is)
<b>T4</b>	Tumor fixa-se ou invade as estruturas adjacentes que não as vesículas seminais: colo vesical, esfíncter externo, reto, músculo levantador do ânus e/ou parede pélvica
<b>N Gânglios linfáticos regionais<sup>3</sup></b>	
<b>NX</b>	Gânglios linfáticos regionais não avaliáveis
<b>N0</b>	Sem metástases nos gânglios linfáticos regionais
<b>N1</b>	Metástases nos gânglios linfáticos regionais
<b>M Metástases à distância<sup>4</sup></b>	
<b>MX</b>	Metástases à distância não avaliáveis
<b>M0</b>	Sem metástases à distância
<b>M1</b>	Metástase à distância M1a Gânglio(s) linfático(s) não regional (is) M1b Osso(s) M1c Outra(s) localização(ões)

<sup>1</sup> Um tumor descoberto num ou em ambos os lóbulos através de biópsia com agulha, mas não palpável ou visível através de imagem, é classificado como T1c.

<sup>2</sup> A invasão do ápex prostático, ou cápsula prostática (mas não para além desta), não se classifica como T3, mas sim como T2.

<sup>3</sup> Os gânglios linfáticos regionais são os gânglios pélvicos e que são essencialmente os gânglios pélvicos abaixo da bifurcação das artérias ilíacas primitivas. A lateralidade não afeta a classificação N.

<sup>4</sup> Quando as metástases existem em mais do que uma localização, deve usar-se a classificação mais elevada

Tendo em conta esta classificação, a doença é classificada em três tipos distintos: doença localizada, quando a doença se encontra apenas na próstata; doença localmente avançada, quando a doença se estende para a região para-prostática; e carcinoma da próstata metastático, quando a doença se estendeu a outros locais do corpo. Neste último tipo, o local mais comum de extensão é o osso, que representa o local metastático inicial em mais de 80% dos doentes com esta neoplasia. Este sistema permite ao clínico seleccionar qual a abordagem terapêutica mais adequada a cada doente (Heidenreich *et al.*, 2008; Marques, 2016; Parker, 2011).

## 1.2.5 Terapêutica

Uma vez diagnosticado e realizado o estadiamento, o clínico seleciona as melhores opções terapêuticas a propor ao doente e define o plano de tratamento. Hoje em dia existem inúmeras opções terapêuticas e para uma criteriosa escolha, deve ser tida em consideração a correta extensão da doença, sendo necessário saber se está confinada ao órgão, se está em fase localmente avançada ou se está já em fase metastática. Só depois de convenientemente estadiado é que será escolhida a opção terapêutica que melhor se adequa (American Cancer Society, 2016; Lavery, Kirby e Chowdhury, 2016; Ramon e Denis, 2007).

### 1.2.5.1 Vigilância Ativa

A vigilância ativa é utilizada em doentes que apresentem cancro da próstata num estágio inicial, e é uma alternativa à intervenção imediata que pode reduzir os tratamentos desgastantes e potencialmente prejudiciais (Marques, 2016). Os pacientes, neste tipo de estratégia, apresentam baixo risco de mortalidade para esta neoplasia. Na Tabela 3, estão descritos os dados clínicos que são necessários para decidir os melhores candidatos para a vigilância ativa.

Tabela 3: Critérios de entrada para a vigilância ativa [Adaptado de (Dall'era *et al.*, 2008)].

<b>Soma de Gleason</b>	<b>6</b>
<b>PSA</b>	$\leq 10$ ng/mL
<b>Percentagem de núcleos positivos</b>	$\leq 33\%$
<b>Percentagem de envolvimento de um só núcleo</b>	$\leq 50\%$
<b>Cinética PSA</b>	Estável

Legenda: PSA: antigénio específico da próstata

A vigilância ativa é muitas vezes utilizada para monitorizar o doente com cancro da próstata. Normalmente, esta abordagem é composta pela realização do teste do PSA associado ao toque retal, a cada 6 meses, e por biopsias à próstata todos os anos. Caso surja alguma alteração, a abordagem muda, e passa a recorrer-se a opções terapêuticas (American Cancer Society, 2016; Dall'era *et al.*, 2008; Tosoian *et al.*, 2011).

### 1.2.5.2 Prostatectomia Radical

A prostatectomia radical é considerada a técnica padrão para o tratamento cirúrgico. Foi popularizada na urologia moderna por Walsh, em 1982, sendo usada em doentes com cancro localizado à próstata, e não em doentes com evidência clínica de envolvimento de gânglios linfáticos, com invasão de estruturas adjacentes ou com presença de metástases à distância (Walsh, 1987). Nesta intervenção, o cirurgião remove todo o tecido prostático e os gânglios linfáticos loco-regionais. Existem duas vias para realizar este tipo de cirurgia: a via retropúbica e a via perineal, como mostra na Figura 7 (American Cancer Society, 2016; Canalichio, Jaber e Wang, 2015; Marques, 2016; Seo *et al.*, 2016; Walsh, 1987).

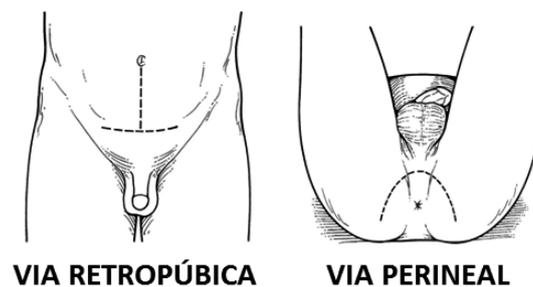


Figura 7: Vias para a realização da prostatectomia radical: a via retropúbica e a via perineal. [Adaptado de (American Cancer Society, 2016)].

### 1.2.5.3 Hormonoterapia

A próstata depende muito de hormonas masculinas, denominadas androgénios, para o seu crescimento e função. As células do cancro da próstata são, por princípio, sensíveis a estas hormonas na sua fase inicial, pois estão sujeitas aos mesmos mecanismos de regulação das células prostáticas não malignas. Devido a esta sensibilidade por parte das células prostáticas a hormonoterapia é uma importante opção terapêutica. Esta modalidade terapêutica tem como objetivo diminuir, ou mesmo eliminar, os níveis de androgénios, de forma a não estimular o crescimento das células cancerígenas. Como resultado desta terapêutica o tumor regride ou cresce mais lentamente. Esta terapêutica é usada quando a doença se propagou a outros tecidos e órgãos e pode ser utilizada em conjunto com a radioterapia, especialmente no cancro da próstata localizado. A hormonoterapia, só por si, não é capaz de curar o tumor, mas permite mantê-lo sob controlo e gerir quaisquer sintomas. Existem vários tipos de hormonoterapia que podem ser utilizados, tais como a orquiectomia bilateral (castração cirúrgica), a terapia com um

análogo da hormona libertadora de gonadotrofina (castração química) ou a utilização de inibidores da enzima esteroide 17-alfa-hidroxilase (CYP17, do inglês *steroid 17-alpha-hydroxylase*) (American Cancer Society, 2016; Hirata, Bruchovsky e Aihara, 2010; Parker, 2011).

#### **1.2.5.4 Quimioterapia**

A quimioterapia tem como objetivo tratar pessoas com doenças oncológicas através da utilização de substâncias químicas, os agentes quimioterapêuticos, com atividade citotóxica. Através da associação de várias substâncias químicas, pretende-se que cada célula de uma população tumoral seja exposta a um fármaco letal, numa concentração suficiente e durante um período de tempo adequado com o objetivo de a destruir (Rodrigues, 2007).

Os agentes quimioterapêuticos interferem com a síntese e/ou função dos ácidos nucleicos, com a síntese proteica e com a divisão celular (Cupertino, Ângela e Gatti, 2008). De facto, a quimioterapia tem resultados promissores no cancro da próstata metastático resistente a castração, com um papel significativo no tratamento paliativo dos sintomas (Matos *et al.*, 2012).

Os tipos de agentes quimioterapêuticos que se utilizam vão desde os agentes alquilantes, os antimetabolitos aos antibióticos antitumorais (Page e Takimoto, 2008). Apesar de muito utilizados, um dos maiores problemas associados à quimioterapia é a baixa especificidade destes agentes, que não atingem apenas as células malignas mas também as células normais (Cupertino, Ângela e Gatti, 2008).

Existem diferentes tipos de quimioterapia, e a sua escolha depende do alvo que se pretende atingir e da criteriosa classificação do cancro a tratar. Podemos classificar a quimioterapia em curativa, paliativa, neoadjuvante e adjuvante. A quimioterapia é curativa quando é usada para obter remissões completas da doença e é paliativa quando é usada com o objetivo de atrasar o crescimento de células tumorais. A quimioterapia neoadjuvante é utilizada em tumores de grandes dimensões antes de efetuar a cirurgia com o objetivo de diminuir a massa tumoral enquanto a quimioterapia adjuvante tem como objetivo evitar a progressão tumoral por via sistémica, e é efetuada depois do ato cirúrgico (Rodrigues, 2007).

#### **1.2.5.5 Radioterapia**

A radioterapia tem por base a utilização de radiação ionizante em doses adequadas. Os

regimes de irradiação que usam um feixe externo foram desenvolvidos ao longo de décadas, e um regime convencional usa o fracionamento das doses. Neste tipo de regime, a radioterapia fracionada usam-se, por fração, doses que variam de 1,8 a 2,2 Gray (Gy) administradas 5 vezes por semana até se perfazerem a dose total adequada, normalmente na ordem dos 70 Gy. A radioterapia fracionada proporciona a proteção dos tecidos normais e aumenta o seu efeito nos locais da doença (Höcht *et al.*, 2017; Mendes, 2016; Ray, Sibson e Kiltie, 2015).

O modelo linear quadrático é um modelo matemático que se aplica para descrever a sensibilidade dos tecidos ao fracionamento das doses e para calcular as doses iso-efetivas para diferentes doses por fração. Este modelo apresenta duas componentes: a componente  $\alpha$ , que corresponde à radiosensibilidade, e a componente  $\beta$  que traduz a capacidade de reparação celular. As duas componentes apresentam uma relação, que se traduz na dose de radiação, para a qual a morte varia com o quadrado da dose. Quanto menor for esta relação, significa que o tecido apresenta uma grande sensibilidade às mudanças na dose por fração. A baixa relação  $\alpha/\beta$  pode resultar das propriedades intrínsecas do tecido, como a grande capacidade de reparação de lesões no ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) induzidas pela radiação como também por uma lenta taxa de proliferação. Pela razão  $\alpha/\beta$  podemos caracterizar os tecidos de acordo com a forma como respondem à exposição a radiação ionizante (Mendes, 2016; Ray, Sibson e Kiltie, 2015).

O cancro da próstata é um tumor que, geralmente, apresenta taxas de proliferação baixas, pelo que se pode prever um baixo valor da relação  $\alpha/\beta$ , de cerca de 1 a 3 Gy. Como consequência desta proliferação lenta, a modalidade de radioterapia hiperfracionada é excluída do tratamento deste cancro (Ray, Sibson e Kiltie, 2015).

A modalidade de radioterapia que se utiliza para o tratamento do cancro da próstata é, por norma, a radioterapia hipofracionada. Nesta modalidade são usadas doses mais elevadas de radiação, com o objetivo de alcançar um melhor controlo do tumor, no entanto, apresenta sensivelmente os mesmos efeitos colaterais que a radioterapia fracionada convencional (Hegemann *et al.*, 2014; Ray, Sibson e Kiltie, 2015).

Os órgãos envolventes da próstata (reto e bexiga) apresentam valores da relação  $\alpha/\beta$  entre os 3 e os 5 Gy, pelo que são menos sensíveis quando comparadas com as células do cancro da próstata. Esta diferente radiosensibilidade é mais um ponto a favor do tratamento com doses mais elevadas de radiação, o que se enquadra na radioterapia hipofracionada (Hegemann *et al.*, 2014).

## 1.3 Radioterapia

Com o avançar do conhecimento sobre os efeitos da radiação ionizante, esta foi transformada numa ferramenta terapêutica, que conduziu ao aparecimento de uma nova especialidade médica, a Radioterapia. As primeiras fontes de radiação usadas na radioterapia foram os elementos radioativos naturais (emissores alfa), usados pela Marie Curie (Pasachoff, 1996). Anos antes de os raios-X serem utilizados como agentes de radioterapia, eram as “bombas de cobalto” que eram usadas. Hoje, a radiação é uma parte importante no tratamento do cancro, que é usada em mais de metade dos doentes com esse diagnóstico. A radioterapia evolui no sentido da otimização da entrega das doses, com melhor delimitação dos contornos e com a introdução da noção de volume funcional, para além da otimização da dosimetria (Mendes, 2016; Mydlo e Godec, 2015; Society, 2014).

### 1.3.1 Tipos de Radioterapia

A radioterapia é uma técnica terapêutica que usa radiação ionizante com o objetivo de destruir células cancerígenas ou impedir a sua proliferação. Um inconveniente desta técnica é que também pode induzir lesão nas células normais. Podem ser aplicadas duas modalidades de radioterapia: a irradiação por fonte externa (telerradioterapia) e a irradiação por fonte interna (braquiterapia e a radioterapia metabólica). A telerradioterapia é um dos métodos mais usados para tratar o cancro da próstata localizado (Yilmaz, Aksu e Dillioglugil, 2015). Nesta técnica recorre-se a uma fonte externa de radiação, geralmente os aceleradores lineares, de modo a, obter raios-X com energia capaz de ter efeito terapêutico, os eletrões são acelerados, até atingirem uma energia de alguns megaelectrão-volt (MeV), para colidir com um alvo de tungsténio (Aichinger H, Dierker J, Joite-Barfuß S, 2012)

Antes de se iniciar o tratamento, é efetuado um planeamento para determinar vários parâmetros como o local a irradiar, a dose de radiação, a conformação do feixe de radiação, assim como, número de sessões (Lumen *et al.*, 2013). A telerradioterapia é realizada, na maior parte das vezes, em regime ambulatorio, contudo exige múltiplas sessões. No caso da modalidade de radiocirurgia estereotáxica, também denominada por *Gamma Knife*, é aplicada uma dose única de radiação num local exato, em apenas uma sessão de tratamento (Gorgulho e Salles, 2016). A radioterapia, para além de se tratar de uma modalidade curativa, em especial, quando a doença se encontra em estádios iniciais é, maioritariamente, usada como recurso paliativo, pois ajuda a aliviar sintomas, como a dor associada à metastização óssea (Monteiro,

2006).

A radioterapia externa pode apresentar várias modalidades, tais como a radioterapia conformacional tridimensional (3D-CRT, do inglês *three-dimensional conformal radiation therapy*) e a radioterapia de intensidade modulada (IMRT, do inglês *intensity-modulated radiation therapy*), usadas para tratar tumores, como o cancro da próstata. A 3D-CRT inclui o uso de feixes de fótons conformacionados, feixes de fótons modulados por intensidade e feixes de prótons. A terapia com feixe de fótons conformacionados foi durante muito tempo a terapia padrão, embora a radiação de intensidade modelada, tecnicamente seja cada vez a mais utilizada. A radiação de prótons e de fótons usa um feixe com propriedades físicas que permitem o depósito de energia no tecido com a intenção de evitar os tecidos normais (Zietman *et al.*, 2005)

A IMRT é considerada uma tecnologia avançada de radioterapia de alta precisão que usa um acelerador linear controlado por um sistema informático para fornecer doses de radiação precisas num tumor maligno ou em áreas específicas dentro do tumor. Também, permite, que a dose de radiação se adapte à forma tridimensional do tumor, modulando a intensidade do feixe de radiação em múltiplos pequenos volumes. Além disso, permite que as altas doses de radiação sejam focadas em regiões dentro do tumor, minimizando a dose nas zonas circundantes (Bakiu *et al.*, 2013; Lavery, Kirby e Chowdhury, 2016; Monteiro, 2006; Shinji Kariya, 2013).

A CRT, assim como, a IMRT, permitem que as doses de radiação sejam fornecidas apenas nas zonas de tumor. Contudo com a CRT só se consegue atingir a zona do tumor com feixes de radiação com a mesma intensidade, sendo assim uniforme para as zonas limitadas do tumor (Bakiu *et al.*, 2013; Lavery, Kirby e Chowdhury, 2016; Monteiro, 2006; Shinji Kariya, 2013).

Na braquiterapia, outra modalidade da radioterapia, são utilizadas pequenas fontes de radiação com o tamanho de grãos de arroz, denominadas “sementes”, e que são inseridas diretamente no corpo do local a irradiar. Estas “sementes” são fontes radioativas, que podem ser permanente ou temporariamente colocadas na área alvo. Os implantes permanentes, normalmente de iodo-125 ou de paládio-103, têm baixos débitos de doses. O uso de implantes temporários é uma técnica menos usual, que permite a utilização de altos débitos de dose. Nesta modalidade, as fontes são de irídio-192 ou de cézio-137. A braquiterapia é considerada uma técnica segura e eficiente, utilizando alguns critérios de elegibilidade, tais como próstatas de pequeno volume, doença localizada, grau de Gleason inferior a 7 e baixas concentrações séricas de PSA (<10 ng/ml) (Monteiro, 2006; Moon, Efstathiou e Chen, 2017; Mydlo e Godec, 2015; Shinji Kariya, 2013).

A radioterapia metabólica é outra modalidade de tratamento em que os radiofármacos são introduzidos nos tecidos alvo, como no tumor. As doses de radiação destes radiofármacos são seletivamente libertadas no tumor, através de mecanismos sistêmicos não invasivos. Por exemplo, a administração terapêutica de radiação ionizante usando radioisótopos emissores beta, isolados ou em conjunto com radiotraçadores, são incorporados no metabolismo do órgão ou tumor alvo. São poucos os efeitos colaterais que estão associados a esta modalidade terapêutica. O sucesso desta modalidade terapêutica depende de uma grande e seletiva fixação e de uma longa retenção do radionuclídeo. Nesta modalidade os radiofármacos apresentam na sua constituição um átomo radioativo que pode ser emissor alfa, beta ou de elétrons Auger (Lima, 2005; Mendes, 2016).

## 1.4 Efeitos Biológicos da Radiação Ionizante

A interação dos diferentes tipos de radiação ionizante com a matéria viva conduz a alterações biológicas. Essas alterações devem-se à cedência de energia por parte da radiação para o meio, que leva a fenômenos físicos, químicos e biológicos. A radiobiologia estuda estas cadeias de fenômenos, a partir da interação física até às suas consequências finais. A irradiação de matéria viva com radiação ionizante tem consequências relevantes, pois a energia, ainda que em pequena quantidade, é libertada a nível molecular (Lima, 2005).

A interação da radiação ionizante com moléculas importantes nas funções celulares pode ser classificada conforme os seus efeitos, efeitos diretos e efeitos indiretos, estes são resultantes da manifestação de produtos intermediários. São considerados efeitos diretos quando a interação ocorreu diretamente com moléculas ou microestruturas de importância vital para as células. Porém, o maior constituinte do meio intracelular é a água que, por ação da radiação ionizante, forma através do processo de radiólise da água, espécies quimicamente reativas. Estas espécies são capazes de lesar moléculas essenciais para o bom funcionamento celular, o que constitui os efeitos indiretos da radiação como se demonstra na Figura 8 (Lima, 2005; Mendes, 2016).

### Efeito Direto



### Efeito Indireto

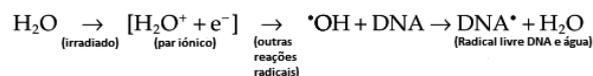


Figura 8: Reações que traduzem as ações diretas e indiretas da radiação ionizante em moléculas importantes (neste caso o DNA) nas funções celulares [Adaptado de (Beyzadeoglu, Ozyigit e Selek, 2012)].

A radiação ionizante ao interagir com a matéria viva produz ionizações e excitações de átomos e de moléculas com posterior produção de espécies reativas de oxigénio ou de nitrogénio. Estas espécies reativas podem apresentar eletrões desemparelhados, conferindo-lhes uma elevada reatividade química com moléculas celulares, pelo que têm um tempo de vida curto. Estas espécies reativas formam-se em elevado número e desempenham um papel importante nos efeitos indiretos da radiação em tecidos e organismos biológicos (Wondergem, 2010).

A resposta biológica à exposição radiológica é determinada por vários fatores, tais como, a dose de radiação, o tipo de radiação e a energia da radiação (Moreira, 2011). Uma célula exposta a radiação ionizante poderá sofrer lesões a nível dos organelos, da membrana celular ou de biomoléculas mais ou menos importantes para a funcionamento celular. Tais alterações podem causar lesões na eficiência dos sistemas de reparação, que podem ser reversíveis ou irreversíveis. Por isso, os efeitos biológicos provocados pela radiação tornam-se mais nefastos quando atingem o material genético ou moléculas essenciais para uma correta replicação e manutenção das características celulares. Quando os efeitos biológicos são reversíveis, traduzem a existência de mecanismos de reparação celular que recuperam a função lesada, contudo esta reparação poderá ou não ser total (Lima, 2005; Mendes, 2016).

Os efeitos biológicos da radiação apresentam características fundamentais, verificando-se que existe polimorfismo, pois são altamente dependentes do tipo de tecido ou de órgão irradiado (Lima, 2005). Podem ser provocados por outras causas além das radiações, ou seja, os efeitos não são específicos. Entre o momento da irradiação e o aparecimento de lesões existe sempre um tempo de latência, que é variável (Mendes, 2016).

A maioria das lesões provocadas pela radiação ionizante não é transmissível, contudo, lesões que afetem o património genético podem propagar as anomalias à descendência do ser irradiado. Existe uma dose limiar no que diz respeito à relação entre a dose de radiação e os efeitos biológicos. A maioria dos efeitos registados surgem quando a dose é superior à dose

limiar, porém a existência desta dose não quer dizer que não possa ocorrer qualquer ação nociva mesmo quando a dose é inferior à dose limiar (Lima, 2005; Mendes, 2016).

#### 1.4.1 Radiação Ionizante e Ciclo Celular

O ciclo celular ou a divisão celular é uma série de eventos que ocorrem numa célula, que dão origem à divisão e duplicação do seu DNA, resultando na formação de duas células filhas. No seu conjunto consiste em quatro processos coordenados: o crescimento celular, a replicação do DNA, a distribuição dos cromossomas duplicados para duas células-filhas e a divisão celular (Abouzeid e Torchilin, 2013).

O ciclo celular é dividido em quatro fases: a fase *gap* ( $G_1$ ), a fase de síntese (S), fase  $G_2$  e a fase da mitose (M). Na fase  $G_1$  a célula aumenta de tamanho e produz todas as proteínas necessárias para a fase S, portanto corresponde à fase com maior taxa metabólica. A seguinte fase, a fase S é onde ocorre a síntese do DNA. Na fase  $G_2$ , ocorre a produção de proteínas essenciais para a próxima fase, ou seja, prepara a célula para a mitose. Finalmente, na fase M a célula divide-se em duas células-filhas. A falta de nutrientes pode levar a que as células permaneçam na fase  $G_1$  ou a entrem em repouso, na fase chamada  $G_0$  (Abouzeid e Torchilin, 2013; Mendes, 2016).

O ciclo celular é altamente regulado, e para garantir essa regulação existem mecanismos que envolvem duas classes de moléculas reguladoras, as ciclinas e as cinases dependente de ciclina (CDK, do inglês *cyclin-dependent kinases*), que são ativadas em momentos específicos do ciclo celular (Beyzadeoglu, Ozyigit e Selek, 2012; Nigg, 1995).

As CDK são cinases proteicas constituídas por serina e treonina que fosforilam substratos-alvo para promover a síntese de DNA e a progressão mitótica (Barnum e O'Connell, 2014). De forma a preservar a integridade do seu genoma, as células eucariotas desenvolveram uma rede de mecanismos moleculares para detetar DNA não replicado ou estruturas aberrantes de DNA, para propagar o sinal de alerta e para responder através de ações coordenadas de reparação de DNA, chamados os pontos de controlo, ou *checkpoints*, do ciclo celular, como indica a Figura 9.

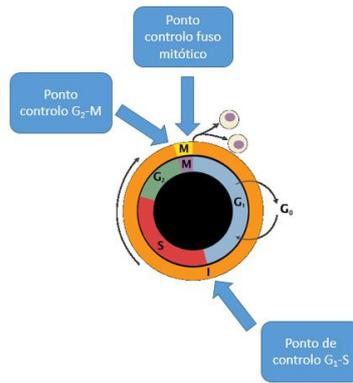


Figura 9: Pontos de controlo do ciclo celular, de forma a garantir que genomas completos sejam transmitidos às células-filhas [Adaptado de (Harashima, Dissmeyer e Schnittger, 2013)].

As fontes de lesões no DNA podem ser intrínsecas (intermediários do metabolismo ou erros na replicação do DNA), ou extrínsecas (luz solar ou radiação ionizante). Diferentes lesões no DNA ativam vias de controlo comuns, cujo objetivo é manter as CDKs no estado inativo até que a lesão seja reparada (Barnum e O’Connell, 2014). A lesão no DNA pode envolver quebra nas duas cadeias da dupla hélice do DNA ou quebra de uma única cadeia da dupla hélice de DNA (Bartek, Lukas e Lukas, 2004).

Os pontos de controlo são definidos como cascatas de sinalização molecular que promovem o atraso do ciclo celular ou o bloqueio em resposta à lesão no DNA, possibilitando mais tempo à célula para reparar a lesão. É ativada uma rede complexa de vias de sinalização, que regula os pontos de controlo, de forma a bloquear o ciclo celular, como podemos ver representada na Figura 10 (Bartek, Lukas e Lukas, 2004; Mendes, 2016).

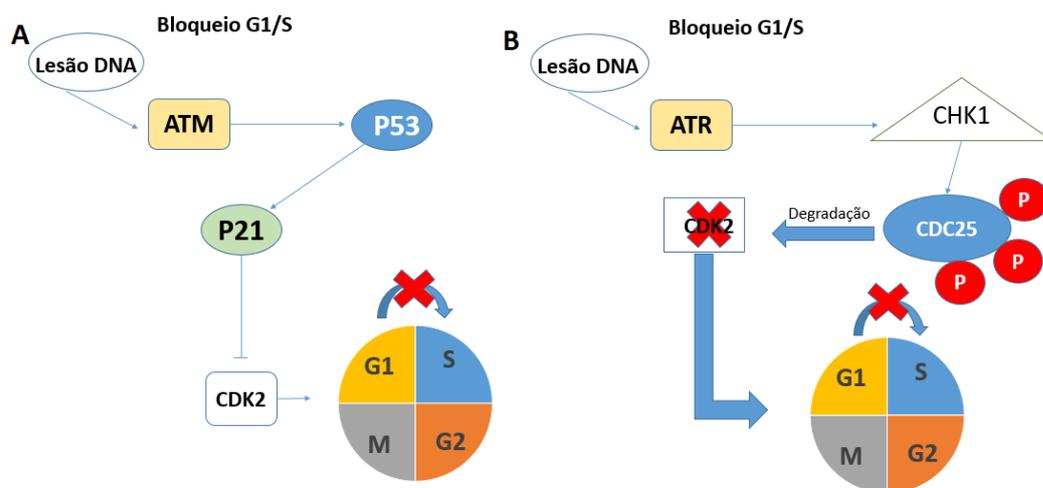


Figura 10: Duas vias do bloqueio do ciclo celular das fases G1/S. **A** - via onde a P53 tem um papel importante no bloqueio. **B** - via ATR-Chk1, que tem como finalidade o bloqueio do ciclo para proceder à reparação do DNA. Adaptado de [(Ward, 2002)].

Podemos separar os pontos de controlo das lesões de DNA, os que são controlados pelo fator de transcrição e supressor tumoral, proteína 53 (P53), e aqueles que são controlados pelas cinases efetoras (CHK, do inglês *cell cycle checkpoint kinase*). A CHK1 é ativada por todas as formas de lesão de DNA, pelo que é mais eficiente nas fases S e G<sub>2</sub> do que na fase G<sub>1</sub>. A diversidade das lesões ativas apresentam um intermediário comum que é uma simples cadeia de DNA revestida por uma proteína de replicação A (RPA, do inglês *replication protein A*), atraindo os complexos de proteínas do ponto de controlo, tais como a ataxia telangiectasia relacionada com RAD3 (ATR, do inglês *ataxia telangiectasia and Rad3-related*). Por sua vez, é alvo da sua proteína de interação (ATRIP, do inglês *ataxia telangiectasia and Rad3-related-interacting protein*), e de sensores de lesão no DNA, assim como o complexo RAD9-HUS1-RAD1. Seguida da fosforilação por ATR, as proteínas mediadoras do domínio *breast cancer associated-c-terminal* (BRCT) são recrutadas para estes locais. Estas proteínas têm a função do recrutamento da CHK1, que é ativada por fosforilação pela ATR, sendo depois libertada para manter CDK2 no seu estado fosforilado e inativo. A CHK1 fosforila tanto a cinase (WEE1) como a fosfatase (CDC25) que regulam a fosforilação da CDK2 (Noguchi e Gadaleta, 2014). Quando a lesão no DNA é provocada pela radiação ionizante, a CHK1 vai promover o aumento da fosforilação da CDC25, levando à sua degradação. Esta degradação da CDC25 vai inibir CDK2 e, conseqüentemente, à supressão da iniciação da replicação do DNA (Sørensen *et al.*, 2003).

Na fase G<sub>1</sub>, o fator de transcrição P53 é um componente crítico nos pontos de controlo de lesão de DNA. A P53 sofre inúmeras modificações pós translacionais, incluindo a fosforilação do N-terminal (serina-15) catalisada pela cinase ataxia *telangiectasia* mutada (ATM, do inglês *ataxia telangiectasia mutated*). Esta cinase tem como principal alvo a quebra da cadeia dupla do DNA por interação com proteínas, o complexo MRE11-RAD50-NBS1 (MRN). A P53 ativa, sendo estabilizada através da proteção da sua ubiquitina ligase E3, é capaz de ativar a expressão de um grande número de genes, incluindo o inibidor da cinase dependente de ciclina (CKI, do inglês *cyclin-dependent kinase inhibitor*), a P21. Assim, as CDKs da fase G<sub>1</sub> são inibidas e a lesão no DNA é reparada antes da replicação do DNA. A P53 também apresenta a capacidade de inibir a expressão de genes, o que é necessário para prolongar o bloqueio da fase G<sub>2</sub> face a lesões persistentes no DNA. Além disso, pode ainda decidir se a célula inicia o processo de morte programada ou induz senescência (Figura 11) (Barnum e O'Connell, 2014; Noguchi e Gadaleta, 2014).

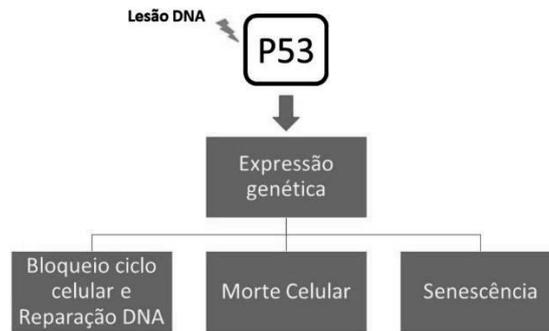


Figura 11: A P53 tem um papel fundamental na decisão do destino celular após exposição a radiação ionizante. Adaptado de ((Beyzadeoglu, Ozyigit e Selek, 2012)).

A radiação ionizante poderá conduzir a um bloqueio da transição da fase  $G_1$  para a fase S, e é igualmente capaz de atuar no ponto de controlo da fase S, inibindo assim a iniciação da replicação do DNA. A fase mais radiosensível do ciclo celular é a passagem do final da fase  $G_1$  para o início da fase S, sendo a fase mais radorresistente a fase S (Mendes, 2016).

#### 1.4.2 Radiação Ionizante e Morte Celular

A morte celular pode ser classificada de acordo com a aparência morfológica (apoptótica, necrótica, autofágica ou associada com a mitose), com critério enzimológico (com ou sem o envolvimento de nucleases ou classes distintas de proteases, como as caspases ou as transglutaminases) e com o aspeto funcional (programada ou acidental, fisiológica ou patológica) (Kroemer *et al.*, 2009).

Durante o início da apoptose ocorre a contração celular, em que a célula se torna globalmente mais pequena, o citoplasma mais denso, alteração dos organelos e desidratação celular. Outra característica que acontece é a condensação da cromatina que dá pelo nome de picnose, sendo este aspeto característico da apoptose. De seguida, ocorre a formação de “bolhas” ou *blebs* ao longo da membrana plasmática, levando à separação de fragmentos celulares chamados corpos apoptóticos, num processo denominado “*budding*”. Nesta fase a membrana ainda se encontra intacta, contudo ocorre fragmentação nuclear, processo denominado de cariólise. Este tipo de morte celular pode estar associado em diferentes momentos do desenvolvimento de um organismo como na reposição fisiológica de certos tecidos diferenciados, na atrofia dos órgãos na resposta inflamatória e na eliminação de células após lesão celular por agentes genotóxicos (Elmore, 2007; Mendes, 2016).

Os mecanismos da apoptose são altamente complexos, sofisticados e regulados,

envolvendo cascatas de eventos moleculares. Estudos indicam que existem duas principais vias apoptóticas: a via extrínseca ou morte mediada por recetores membranares, e a via intrínseca ou morte mediada pela mitocôndria, existindo evidências que indicam que estas duas vias podem estar ligadas no passo da ativação das caspases, proteases executoras de apoptose (Igney e Krammer, 2002; Mendes, 2016).

A via extrínseca da apoptose inclui vias de sinalização que envolvem interações de recetores transmembranares. Estão envolvidos recetores de morte que fazem parte da família do gene do recetor do fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*), que contêm um “domínio de morte”. Este domínio é muito importante na transmissão de sinais de morte da superfície da célula para o seu interior. Com este domínio conseguem interagir moléculas como proteínas com domínios de morte associados ao Fas (FADD/MORT1 do inglês, *fas-associated protein with death domain*), o fator de necrose tumoral tipo 1 associado a domínios de morte (TRADD do inglês, *tumor necrosis factor type 1-associated DEATH domain protein*). Neste ponto forma-se o complexo sinalização de indução de morte (DISC, do inglês, *death-inducing signaling complex*) o que resulta na ativação da procaspase-8, com formação da caspase-8. Através de uma reação em cascata a caspase-8 vai ativar a caspase-3, levando à morte celular por apoptose (Elmore, 2007; Han e Yu, 2009; Mendes, 2016).

Na via intrínseca da apoptose existe um conjunto diversificado de estímulos, não mediados por recetores que produzem sinais intracelulares que atuam diretamente sobre os alvos dentro da célula e são eventos iniciados pelas mitocôndrias. Quando surge um estímulo, por exemplo a radiação ionizante, ocorrem alterações no interior da membrana mitocondrial, que se traduzem por perda do potencial da membrana mitocondrial, com libertação do espaço intermembranar para o citosol, do citocromo c. Este, por sua vez, liga-se e ativa o fator ativador da protease apoptótica (APAF-1, do inglês *apoptotic protease activating factor 1*) assim como à procaspase-9, formando um apoptossoma. Este processo vai promover a clivagem da procaspase 9, com ativação da caspase-9. O controlo e a regulação destes eventos apoptóticos mitocondriais são feitos pela família das proteínas de linfoma de células B 2 (BCL-2, do inglês *B-cell lymphoma 2*). Esta família de proteínas controla a permeabilidade da membrana mitocondrial e podem determinar se a célula comete apoptose ou aborta o processo, através da regulação da libertação do citocromo c (Elmore, 2007).

A P53 é capaz de regular a expressão da família das proteínas BCL-2, com inibição da sua expressão e intensificação da expressão da proteína X associada à BCL2 (BAX do inglês, *Bcl-2-associated X protein*), uma proteína anti-apoptótica. Assim, qualquer lesão no DNA provocada pela radiação ionizante poderá ativar a P53, sendo que a apoptose deverá ser essencialmente

induzida por via intrínseca (Mendes, 2016). Belka e colaboradores demonstraram que a BLC-2 tem a capacidade de bloquear a libertação do citocromo c induzida pela radiação ionizante (Belka et al, 2001).

A necrose é caracterizada morfológicamente pelo ganho de volume celular, pelo intumescimento dos organelos, pela rutura da membrana e, conseqüentemente, a perda do conteúdo intracelular (Kroemer *et al.*, 2009). Várias evidências mostram que a execução da morte celular necrótica pode ocorrer por vias de transdução de sinal e de mecanismos de execução (Vanlangenakker *et al.*, 2008).

A libertação do conteúdo intracelular provoca uma resposta inflamatória, que pode resultar num processo favorável ou desfavorável. No processo favorável é desencadeada uma resposta imune anti tumoral, onde são chamadas a atuar células do sistema imunitário. No caso de ser desfavorável, as mesmas células do sistema imune vão provocar ainda mais inflamação, segregando fatores de crescimento e de enzimas que contribuem para o crescimento tumoral bem como para a metastização (Mendes, 2016).

Outro tipo de morte, que é o tipo de morte mais frequentemente induzido pelo sistema imune, é a catástrofe mitótica (Roninson, Broude e Chang, 2001). A catástrofe mitótica é uma conseqüência do atraso mitótico, em que as células com cromossomas condensados sofrem apoptose durante a fase M ou sofrem uma divisão aberrante que leva à formação de células grandes com múltiplos micronúcleos e cromatina descondensada (Castedo *et al.*, 2004; Dodson, Wheatley e Morrison, 2007).

Este tipo de morte ocorre durante ou logo depois de uma tentativa de divisão celular após a irradiação (Beyzadeoglu, Ozyigit e Selek, 2012). A catástrofe mitótica também pode resultar da reentrada aberrante de células tumorais após uma paragem prolongada no crescimento (Roninson, Broude e Chang, 2001). Este tipo de morte é particularmente prevalente quando os pontos de controlo de lesões de DNA, controlados pela P53, são comprometidos (Dodson, Wheatley e Morrison, 2007).

### 1.4.3 Radiação Ionizante e Stresse Oxidativo

As reações oxidação-redução (redox) são utilizadas pelas células em processos fundamentais de regulação redox, denominados por “sinalização redox” (Sies, 2015). O stresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a sua destoxificação através de sistemas biológicos (Azzam, Jay-Gerin e Pain, 2012).

As primeiras modificações que ocorrem durante ou pouco depois da exposição à radiação ionizante, pensa-se que são responsáveis pela maioria dos efeitos da radiação nas células. Contudo, mudanças oxidativas podem continuar durante dias ou meses após a exposição inicial, muito por causa da produção contínua de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e de espécies reativas de nitrogénio (RNS, do inglês *reactive nitrogen species*) (Azzam, Jay-Gerin e Pain, 2012).

O stresse oxidativo induzido pela radiação ionizante pode propagar-se das células-alvo para outras células através de mecanismos de comunicação intercelular. O stresse oxidativo pode ser induzido por fatores exógenos ou endógenos (Azzam, Jay-Gerin e Pain, 2012; Mendes, 2016).

A água é o maior constituinte das células e ao sofrer interação pela radiação ionizante poderá induzir a formação de radicais livres, através do processo de radiólise que, por sua vez, formam ROS. As ROS formadas na radiólise são: o radical hidroperoxil ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ), o ião superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), o radical de hidrogénio ( $\cdot\text{H}$ ), o peróxido ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ), o hidrogénio molecular ( $\text{H}_2$ ), o alcoxil ( $\text{RO}$ ) e o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A radiação ionizante também é capaz de estimular a atividade de sintetases de óxido nítrico (NOS, do inglês *nitric oxide synthase*), que são capazes de formar óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ , do inglês, *nitric oxide*). O  $\cdot\text{NO}$  ao reagir com  $\text{O}_2^{\cdot-}$  origina o anião peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{\cdot-}$ ), que é uma RNS (Rabender, Alam e Mikkelsen, 2014). Este anião é altamente reativo, tendo como alvos celulares lípidos, proteínas e bases do DNA. Espécies como o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e o  $\text{HO}_2^{\cdot}$  na presença de iões metálicos redox (principalmente ferro e cobre) levam à formação de radicais hidroxilo via reação de Fenton e *Haber-Weiss*. ROS e RNS podem lesar o DNA resultando em várias alterações, como quebra no DNA, lesão em bases, destruição de açúcares e disfunção da telomerase. Além de causarem lesões a nível do DNA, também são capazes de oxidar outros componentes celulares, como proteínas, lípidos e membranas celulares (Azzam, Jay-Gerin e Pain, 2012; Mendes, 2016).

A radiação ionizante também pode induzir disfunção mitocondrial. A mitocôndria ocupa uma fração substancial do volume celular, por isso é um alvo importante da radiação ionizante. É responsável pelo consumo de mais de 90% do oxigénio do corpo e é uma fonte de ROS. A disfunção mitocondrial pode contribuir para a perturbação de reações de oxidação-redução que, por sua vez, determinam o ambiente celular redox. Este organelo tem a capacidade de gerar energia para a célula através da cadeia transportadora de eletrões, na respiração celular, originando também subprodutos de ROS (Figura 12). Uma falha nesta cadeia resulta na formação de ião superóxido em excesso. Este processo associado ao facto de ocorrer uma sobreprodução de ROS via radiólise da água vai aumentar os níveis de ROS, levando a mutações

no DNA mitocondrial e à alteração da expressão de várias proteínas necessárias para as funções críticas quer na mitocôndria quer na célula (Azzam, Jay-Gerin e Pain, 2012).

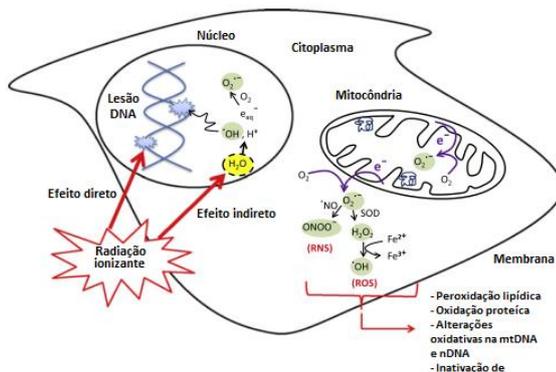


Figura 12: Representação esquemática dos efeitos indiretos e diretos da radiação ionizante em macromoléculas. Adaptado de [(Azzam, Jay-Gerin e Pain, 2012)].

O corpo humano apresenta-se equipado com uma variedade de defesas antioxidantes que contrabalançam o efeito dos oxidantes. As defesas antioxidantes podem ser divididas em duas categorias: as enzimáticas e as não enzimáticas. As defesas enzimáticas englobam a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase. Como defesas não enzimáticas temos, como exemplo, o ácido ascórbico, o  $\alpha$ -tocoferol e o  $\beta$ -caroteno (Birben *et al.*, 2012). Os antioxidantes têm como função contribuir para que não haja oxidação de biomoléculas, ou pelo menos retardá-la, com a finalidade de reduzir as lesões provocadas pelo stresse oxidativo (Mendes, 2016).

## **Objetivos**



O cancro da próstata é uma das neoplasias mais mortais a nível mundial, e uma das mais comuns entre os homens. É um tipo de cancro que apresenta uma evolução silenciosa (assintomática) podendo atingir estádios avançados antes de ser diagnosticado. As características do tumor devem ser valorizadas na escolha do tipo de tratamento, em que a abordagem radioterapêutica está incluída. A radioterapia tem como objetivo eliminar as células cancerígenas ou impedir que estas continuem a crescer e a dividirem-se, minimizando os efeitos provocados em células saudáveis. Sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ação anticancerígena da radioterapia ainda muito há por explorar.

Tendo em conta todas estas características, este trabalho tem como objetivo caracterizar, do ponto de vista celular e molecular, os efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante em duas linhas celulares de carcinoma da próstata.



## **Materiais e Métodos**



A resposta celular à radiação ionizante foi avaliada através de estudos *in vitro*, em células do cancro da próstata. Estes estudos permitiram calcular a dose letal média (DL<sub>50</sub>) e o modelo de agressão celular através do ensaio clonogénico. Estimou-se a viabilidade e a proliferação celular recorrendo a métodos como, a expressão da proteína nuclear Ki-67 (também conhecido como antigénio Ki-67 que está associado à proliferação celular) e o ensaio do azul tripano. O tipo de morte celular induzido foi caracterizado e avaliado com recurso à microscopia ótica e à citometria de fluxo. A avaliação do ciclo celular e dos níveis de stresse oxidativo foi feita recorrendo à citometria de fluxo.

### 3.1 Cultura Celular

Na realização deste trabalho foram utilizadas duas linhas celulares humanas de cancro da próstata, a linha PC3 e a linha LNCaP. A linha celular PC3 (ATCC®CRL-1435™) é caracterizada por não apresentar recetores de androgénios, enquanto a linha celular LNCaP (ATCC®CRL-1740™) expressa recetores hormonais, pelo que é hormono-dependente. Estas duas linhas apresentam outra diferença que está na sua origem. A linha celular PC3 provém de uma metástase óssea e a linha celular LNCaP de uma metástase linfática (Russell e Kingsley, 2003). As linhas celulares usadas foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC®, Rockville, MD, USA). Quando rececionadas, as células foram descongeladas e subcultivadas em culturas aderentes e mantidas numa atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e a 37°C numa incubadora Binder® (Binder, Tuttlingen, Alemanha). As células das duas linhas celulares foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640, Sigma Aldrich® R-4130, St. Louis, EUA) com 100 µM de piruvato de sódio (GIBCO 11360, Paisley, RU), 10% de soro bovino fetal (Sigma F-7524, St. Louis, EUA) e 1% de antibiótico (Sigma A5955, St. Louis, USA).

Para a realização dos estudos foi necessário preparar suspensões celulares. Com este propósito, primeiramente, removeu-se o meio de cultura, a que se seguiu a lavagem das células com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) constituída por 137 mM de cloreto de sódio (Sigma S7653, St. Louis, EUA), 2,7 mM de cloreto de potássio (Sigma P9333, St. Louis, EUA), 10 mM de fosfato monossódico (Sigma S5011, St. Louis, EUA) e 1,8 mM de fosfato monopotássico (Sigma P0662, St. Louis, EUA), a pH de 7,4. De seguida, removeu-se o PBS e incubaram-se as células com 2 mL de solução de tripsina em ácido

etilenodiamino tetra-acético (EDTA, do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*) a 0,25% (Sigma S5011, St. Louis, EUA) num intervalo de 3 a 5 minutos com a finalidade de destacar as células do frasco de cultura. O passo seguinte foi a inibição da ação da tripsina com a adição do dobro do volume de meio RPMI e procedeu-se ao cálculo da concentração celular. Para isso, a uma amostra da suspensão celular adicionou-se o mesmo volume de uma solução de azul tripano (GIBCO®, Paisley, RU) na diluição de 1:2 em água ultra-pura e contaram-se as células, através de uma câmara de *neubauer* e um microscópio ótico invertido Motic AE31 (Motic®, Wetzlar, Alemanha) com ampliação de 100x. Feita a contagem, retirou-se o volume necessário e centrifugou-se a suspensão celular a 201xG durante 5 minutos (Heraeus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18,7cm, Thermo Scientific, Waltham, MA USA), para remover as células mortas, e adicionou-se o meio RPMI necessário para a realização dos ensaios.

### 3.2 Radiação Ionizante

As culturas celulares foram irradiadas num acelerador linear de raios-X. O acelerador linear utilizado para a irradiação foi um acelerador Varian Clinac 600C (Varian, California, EUA), com raios-X de energia de 4 MeV. Foram preparadas suspensões das linhas celulares PC3 e LNCaP com uma concentração de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, no volume necessário para a realização de todas as experiências. As suspensões foram transferidas para microtubos do tipo *ependorf* com um volume de 1,5 mL, devidamente identificados para cada condição, tendo em atenção perfazer o volume máximo do tubo para não haver ar aquando da irradiação. As doses de radiação usadas foram de 0,5 Gy, de 1 Gy, de 1,5 Gy, de 2 Gy, de 4 Gy, de 6 Gy, de 8 Gy, de 10 Gy e de 12 Gy. Foram utilizadas células como controlo, as quais sofreram todos os procedimentos da experiência à exceção da irradiação (0 Gy). Para uma irradiação reprodutível, fiável e uma deposição homogénea da dose em todo o volume, foi utilizada uma caixa de irradiação em acrílico com paredes de 1 cm de espessura, com dimensões e referências para o posicionamento dos microtubos e em tudo compatíveis com as condições habituais de operação do acelerador linear e para as quais se encontra certificada.

A irradiação foi realizada com o apoio de um engenheiro físico-médico e de um técnico de radioterapia. Primeiramente colocou-se a caixa de irradiação vazia (Figura 13) sobre a mesa de tratamento e a distribuição dos tubos *ependorf*, já identificados com as diferentes doses de radiação. A dose recebida pelas células, dentro dos tubos, tem de ser homogénea e para tal os tubos foram submersos em água, como se mostra na Figura 13, à temperatura de 37°C, e a caixa de irradiação foi posicionada com o seu eixo longitudinal paralelo ao eixo central do feixe.

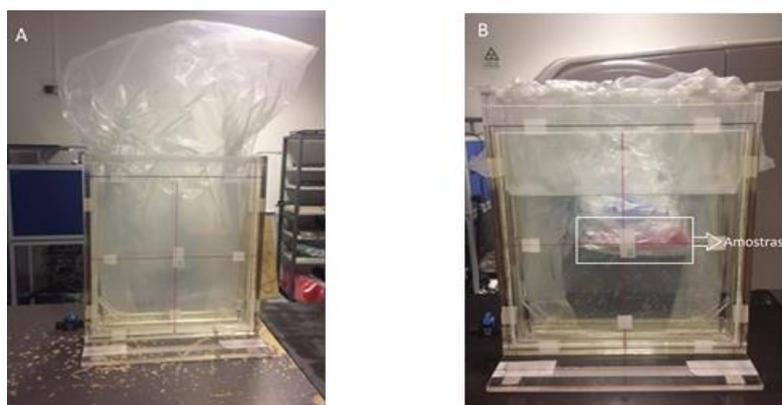


Figura 13: A imagem A demonstra a caixa de irradiação vazia e a imagem B apresenta as amostras na caixa de irradiação submersas em água.

A deposição da dose foi feita em duas fases, uma com a *gantry* posicionada a 90° e outra com a *gantry* posicionada a 270°, para que a dose total fosse de 0,5 Gy. Após a irradiação de 0,5 Gy, os microtubos correspondentes são retirados da caixa de irradiação e os restantes permaneceram para nova irradiação. Todo este processo foi repetido até se completarem todas as doses pretendidas, de acordo com a Tabela 4.

Completo o processo de irradiação, procedeu-se à realização dos ensaios laboratoriais apresentados de seguida.

Tabela 4: Doses administradas às amostras. Unidades de motor (MU, do inglês *monitor unit*; 1 MU=0,022 Gy)

Dose (Gy)	90°	270°
0,5	23 MU	23 MU
1	23 MU	23 MU
1,5	23 MU	23 MU
2	23 MU	23 MU
4	93 MU	92 MU
6	93 MU	92 MU
8	93 MU	92 MU
10	93 MU	92 MU
12	93 MU	92 MU

### 3.3 Ensaio Clonogénico

O ensaio clonogénico permite avaliar as diferenças na viabilidade reprodutiva entre as células controlo e as células que sofreram tratamento, tais como, a exposição a radiação ionizante. Entende-se por viabilidade reprodutiva a capacidade de uma única célula formar uma colónia de 50 ou mais células. É considerado o ensaio *gold standart* de avaliação dos efeitos da radiação pois permite avaliar a agressão celular induzida pela radiação (Franken *et al.*, 2006; Mendes, 2016; Rafehi *et al.*, 2011).

Depois de as suspensões das células serem irradiadas nos microtubos, foram homogeneizadas e distribuídas por placas de 6 poços (*Starstedt AG & Co*, Alemanha, Nümbrecht). Em cada poço foi adicionado um número estipulado de células das linhas PC3 e LNCaP tratadas com as várias doses de radiação (número de células semeadas) e completou-se com meio RPMI. Seguidamente, as placas foram incubadas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 5 dias. Passados os 5 dias procedeu-se à mudança de meio de cada poço representativo das diferentes doses de radiação. Passado 12 dias após a irradiação realizou-se a contagem do número de colónias formadas. Para tal, removeu-se o meio de cultura e fez-se uma lavagem com PBS. Seguidamente fixaram-se as células utilizando metanol (32213, *Sigma-Aldrich*®, St. Louis, EUA), durante 30 minutos. Na meia hora seguinte, descartou-se o metanol, e as placas ficaram a secar para a seguir se adicionar uma solução de violeta de cristal (C3886, *Sigma-Aldrich*®, China) na concentração de 0,5% em solução de metanol, deixaram-se as colónias a colorir durante 30 minutos. Finalmente, aspirou-se o corante em excesso e lavaram-se cuidadosamente as placas por imersão em água tépida.

Deixaram-se a secar as placas e, seguidamente, fez-se a contagem das colónias com mais de 50 células. A contagem das colónias permitiu calcular a eficiência da placa (PE, do inglês *plate efficiency*) e o fator de sobrevivência (FS), de acordo com as equações 4 e 5, respetivamente.

$$\text{Eficiência da placa} = \frac{\text{número de colónias contadas}}{\text{número de células semeadas}} \quad \text{Equação 4}$$

$$\text{Fator de Sobrevivência} = \frac{\text{PE das células irradiadas}}{\text{PE das células controlo}} \quad \text{Equação 5}$$

Calculados a PE e o FS para cada condição, foi possível estabelecer curvas dose-resposta, em

que se relacionou a dose de radiação com o FS para cada linha celular. Os resultados obtidos através dos ensaios clonogénico foram ajustados a um modelo linear-quadrático de acordo com a equação 6,

$$\text{Fator de Sobrevivência} = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad \text{Equação 6}$$

onde D corresponde à dose de radiação e  $\alpha$  e  $\beta$  correspondem, respetivamente, aos parâmetros linear e quadrático do ajuste.

Quando existem casos em que a resposta é afetada apenas pela componente  $\alpha$ , a componente  $\beta$  pode ser otimizada para valores  $\beta=0$ , sendo que o modelo de ajuste correspondeu a um modelo de um só alvo e um só toque, de acordo com a equação 7,

$$\text{Fator de Sobrevivência} = e^{-\frac{D}{D_0}} \quad \text{Equação 7}$$

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

### 3.4 Viabilidade e Proliferação Celular

#### 3.4.1 Ensaio do Azul Tripano

O teste de exclusão de corante é utilizado para determinar o número de células viáveis presentes numa suspensão de células. Este teste é baseado no princípio de que todas as células vivas possuem membranas celulares intactas que excluem determinados corantes, como o azul tripano. Assim sendo todas as células que estão vivas são impermeáveis ao corante, pelo que se mantêm brilhantes. Por outro lado, as células mortas não apresentam a sua membrana nas condições ideais, e tornam-se azuis (Strober, 2001).

Neste ensaio foram utilizados volumes iguais de cada suspensão celular e da solução de azul tripano (GIBCO®, Paisley, RU) numa concentração de 0,02%, sendo posteriormente homogeneizadas e colocadas numa câmara *neubauer* (BOECO and Co. Hamburgo, Alemanha). Para a realização da contagem foi necessário a utilização de um microscópio ótico invertido Motic AE31 com ampliação 100x (Motic®, Wetzlar, Alemanha). Esta contagem foi realizada

24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas após a irradiação de cada suspensão celular. A viabilidade e a proliferação celulares foram determinadas a partir das Equações 8 e 9, respetivamente. Com este ensaio foi possível estabelecer curvas dose-resposta.

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \frac{\text{células vivas}}{\text{células vivas} + \text{células mortas}}$$

Equação 8

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

Equação 9

### 3.4.2 Cálculo do Índice Proliferativo

O antigénio Ki-67 é uma proteína nuclear que é expressa em células de mamífero, sendo muito utilizada como marcador de proliferação para classificar tumores (Sobecki *et al.*, 2016). Durante o ciclo celular, a proteína Ki-67 está presente na fase G<sub>1</sub>, na fase S, na fase G<sub>2</sub> e na fase M, mas não se encontra presente na fase G<sub>0</sub>. Em contraste com muitas outras proteínas associadas ao ciclo celular, o antígeno Ki-67 está consistentemente ausente em células quiescentes e não é detetável durante processos de reparo de DNA. Por este motivo a pesquisa da Ki-67 recorrendo a imunohistoquímica, pode ser utilizada para ajudar na avaliação da atividade proliferativa das linhas celulares em estudo (Jalava *et al.*, 2006). Recorreu-se a um anticorpo anti Ki-67 de coelho, diluído numa solução de diluição de anticorpo (ThermoFisher, 003218), com um fator de diluição de 1:300. Esta técnica permite a visualização de antigénios quando aplicados os anticorpos primários e secundários de forma sequencial. Utilizando substratos cromogénicos, a reação antigénio-anticorpo pode ser analisada utilizando um microscópio ótico. A reação imunohistoquímica para pesquisa da Ki-67 foi conseguida de forma automatizada através de um sistema de coloração de ultra-deslizamento da Roche, usando um kit de deteção OptiView Universal DAB IHC (Roche Ventana, 760-700, Arizona, USA). Antes de colocar as lâminas neste sistema, estas foram fixadas em acetona (Pronalab) durante 10 minutos. Logo depois da coloração automática, as lâminas foram colocadas em contentores, de forma sequencial, contendo álcool a 96%, álcool a 99,9% e xilol de forma a desidratá-las. Por fim, as lâminas foram montadas utilizando um meio de montagem (Merck Millipore, 107961) e sobrepostas por lamelas. Por forma a contar as células foi utilizado um microscópio ótico (Motic, AE31 Invert Microscope) com um campo de visão com ampliação de 400x. O índice de proliferação foi determinado, contando 200 e 500 células de cancro, as células que

apresentavam o antigénio Ki-67 e as que não apresentavam, ajustando depois as 200 e as 500 células para os 100%.

### 3.5 Morte celular

#### Coloração May-Grünwald Giemsa

A coloração de May-Grünwald-Giemsa foi utilizada para avaliar a citomorfologia das células das linhas PC3 e LNCaP. Esta coloração é uma coloração metacromática que demonstra a arquitetura celular, de uma forma rápida e fácil. O corante May Grünwald-Giemsa é uma mistura de corantes com características neutras, que coram os componentes nucleares e citoplasmáticos das células (Mendes, 2016).

A coloração é iniciada com a colocação de uma gota da suspensão celular de cada linha celular em cima de uma lâmina, sendo depois deixada a secar durante 30 minutos. Para corar o núcleo, as lâminas são colocadas num suporte e adiciona-se a solução May-Grünwald de modo a cobrir a lâmina toda (Merck Millipore, 101424) durante 4 minutos. Após este tempo, é adicionada água ultra-pura, no mesmo volume utilizado no passo anterior. De seguida, as lâminas são escurridas e adiciona-se sobre as mesmas a solução de Giemsa a 30% (Merck Millipore, 109204) dissolvida em água ultra-pura, durante 17 minutos. As lâminas são lavadas em água tépida para retirar o excesso de corante e deixadas a secar ao ar. Por fim, as lâminas foram lavadas com xilol (VWR chemicals, 28973) e procedeu-se à montagem das lâminas utilizando um meio de montagem Quick-D (Klinipath, 7281) e uma lamela. Os resultados da morte celular foram observados utilizando um microscópio ótico (Motic, AE31 Invert Microscope).

### 3.6 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo. Permite uma análise de vários parâmetros em simultâneo. Esta técnica é realizada através de um aparelho de deteção ópto-eletrónico, o que torna possível determinar características físicas e/ou químicas de apenas uma única célula (Givan, 2001).

Após a irradiação das linhas celulares, foram colocadas  $10 \times 10^6$  células em cada frasco

de cultura (Starstedt AG & Co, Newton, USA), um frasco por linha celular, para as condições de 0 Gy, de 1,5 Gy, de 6 Gy e de 12 Gy. Passadas 48 horas da irradiação das células, foi recolhido o meio de cultura de cada frasco para um tubo de *falcon*, previamente identificado, e lavaram-se as células com PBS que também se recolheram para o tubo de *falcon*. Seguidamente, adicionou-se um volume necessário para destacar as células do fundo da placa de tripsina-EDTA, e colocaram-se as células a incubar a 37°C durante 5 minutos. Inibiu-se a ação da tripsina com meio de cultura e recolheu-se a suspensão de células novamente para o respetivo tubo de *falcon*. Posteriormente, as suspensões de células foram centrifugadas a 500xG durante 5 minutos, e suspendeu-se o sedimento em 1 mL de PBS, transferindo depois para tubos de citometria (BD Falcon™ 352054). Nova centrifugação a 500xG durante 5 minutos, onde foi descartado o sobrenadante. Os sedimentos para cada condição ficaram prontos para as marcações que vão ser posteriormente apresentadas (Mendes, 2016).

### 3.6.1 Ciclo Celular

Para avaliar o ciclo celular após as células terem sido irradiadas, foi usado a citometria de fluxo utilizando como marcador o iodeto de propídeo (IP). O IP é um composto fluorogénico que se liga estequiometricamente aos ácidos nucleicos (assim como ao RNA sendo necessário a sua remoção), de modo que a emissão de fluorescência é proporcional ao conteúdo de DNA de uma célula, como mostra na Figura 14 (Riccardi e Nicoletti, 2006). Através da quantificação do conteúdo de DNA é possível a distribuição de uma população de células ao longo das diferentes fases do ciclo celular, fase  $G_0/G_1$ , fase S e fase  $G_2/M$ . A avaliação realizou-se através de PI/RNase solution (PI/RNase, Immunostep, S.L., Salamanca, Espanha).

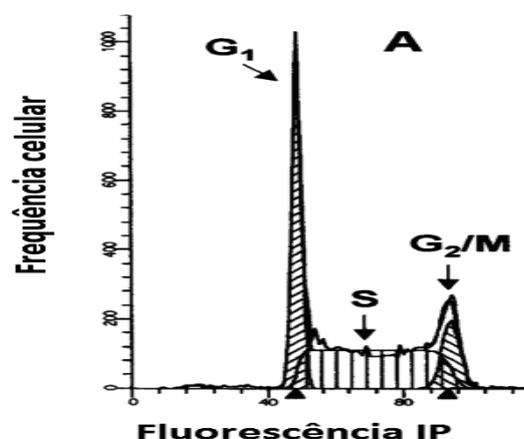


Figura 14: Histograma típico do conteúdo de DNA nas diferentes fases do ciclo celular. Adaptado de [(Pozarowski e Darzynkiewicz, 2004)].

O primeiro passo deste procedimento foi centrifugar as células a 500xG durante 5 minutos, descartando o sobrenadante. De seguida, adicionaram-se 200 µL de etanol a 70%, suspenderam-se as células e incubaram-se durante 30 minutos a 4°C, no escuro. Seguidamente lavaram-se as células com 2 mL de PBS e centrifugaram-se a 500xG durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 500 µL de uma solução de PI/RNase, seguido de incubação durante 15 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. A deteção foi feita utilizando o comprimento de onda de excitação de 351 nm e de emissão de 617 nm. Para este estudo foram obtidos 50.000 eventos através do programa CellQuest™ (Spetroncorp, Washington, USA). Para a análise e a quantificação da informação foi utilizado o programa específico MOD FIT (BD Biosciences, Franklin Lakes, EUA) (Mendes, 2016).

### 3.6.2 Morte Celular

Os marcadores utilizados para identificar o tipo de morte celular foram a anexina V (AV) e o IP (FITC Annexin V Apoptosis Detection kit I, BD Pharmingen, E.U.A.). Uma das características da apoptose é a perda da assimetria da membrana plasmática, em que um fosfolípido, a fosfatidilserina, é translocado do folheto interno para o folheto externo. A AV tem uma grande afinidade por este fosfolípido, por isso serve como uma sonda sensível para identificar células que se encontram na fase inicial da apoptose na citometria de fluxo (Hingorani *et al.*, 2011). Por outro lado, o IP é um fluoróforo que é capaz de se ligar ao DNA. Contudo, este fluoróforo apenas consegue penetrar em células que apresentem a membrana danificada, permite identificar aquelas que se encontram em apoptose tardia, assim como, as células em necrose (Hingorani *et al.*, 2011; Riccardi e Nicoletti, 2006). Em suma, com estes dois marcadores podemos obter 4 populações de células em diferentes estados, como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Grupos de populações celulares, com base nas marcações com AV e IP, na citometria de fluxo.

<b>Células</b>	<b>Anexina V</b>	<b>Iodeto de propídeo</b>
<i>Víáveis</i>	-	-
<i>Apoptose inicial</i>	+	-
<i>Apoptose tardia/necrose</i>	+	+
<i>Necrose</i>	-	+

Neste procedimento os sedimentos, obtidos anteriormente, foram ressuspensos em 100 µL de tampão de ligação, constituído por Hepes (Sigma H7523) na concentração de 0,01 M,

por cloreto de sódio (Sigma S7653) na concentração 0,14 M, por cloreto de cálcio (Sigma C4901) na concentração de 0,25 mM, onde, logo depois, se adicionaram 5 µL de anexina V marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) e 2 µL de IP e deixaram-se a incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Seguidamente, adicionaram-se 400 µL de tampão de ligação e procedeu-se à análise no citómetro FACSCalibur (BD Biociences, California, EUA), onde se utilizaram os comprimentos de onda de excitação de 494 nm e de emissão de 519 nm para a anexina-V-FITC, com os comprimentos de onda de excitação de 351 nm e de emissão de 617 nm para o IP (Mendes, 2016).

Os resultados foram apresentados sobre a forma de percentagem de células em cada grupo.

### 3.6.3 Stresse Oxidativo e Defesa Antioxidante

Para avaliar as espécies reativas de oxigénio e a defesa antioxidante (enzima glutatona reduzida (GSH)), foram utilizados os seguintes compostos: o dihidroetídio (DHE), a sonda 2',7'-*dichlorofluorescein-diacetate* (DCFH<sub>2</sub>-DA) e o alaranjado de mercúrio.

O DHE é uma sonda utilizada para detetar o ião superóxido. O DHE é oxidado pelo O<sub>2</sub><sup>-</sup> produzindo hidroetídio (EOH, do inglês *2-hydroethidium*) e intermediários. O EOH é estável dentro da célula, permitindo assim uma medição precisa da fluorescência do DHE. Podemos assim medir a fluorescência do EOH utilizando os comprimentos de onda de excitação de 480 nm e de emissão de 567 nm. Para tal, as suspensões celulares foram centrifugadas a 500xG durante 5 minutos, sendo os sedimentos ressuspensos em 1 mL de PBS. De seguida, incubaram-se com a sonda DHE (Sigma-Aldrich) na concentração de 5 µM em dimetilsulfóxido, a 37°C, no escuro durante 15 minutos. Para retirar o excesso de sonda e lavar a suspensão centrifugou-se a 500xG durante 5 minutos. Por fim, analisou-se a amostra utilizando um citómetro com um comprimento de onda de excitação de 496 nm e de emissão de 578 nm. Os resultados obtidos foram apresentados em média de intensidade de fluorescência normalizados relativamente ao controlo (Mendes, 2016).

A DCFH<sub>2</sub>-DA é uma das técnicas mais usadas para determinar diretamente o estado redox de uma célula. A DCFH<sub>2</sub>-DA é um precursor não fluorescente da diclorofluoresceína (DCF), que é capaz de entrar dentro de uma célula, pois a célula é permeável a esta sonda. Quando esta sonda se encontra dentro da célula, esterases intracelulares vão clivar duas ligações éster formando uma molécula polar e que não é capaz de atravessar a membrana celular, a H<sub>2</sub>DCF. Esta molécula acumula-se dentro da célula e a sua oxidação produz uma molécula altamente

fluorescente, a DCF. A acumulação da DCF nas células pode ser medida pelo aumento da fluorescência com o comprimento de onda de 530 nm quando a amostra é excitada com uma luz com comprimento de onda de 485 nm. Pela citometria de fluxo podemos medir a fluorescência com o comprimento de onda de 530 nm, pelo que se assume que é proporcional à concentração de peróxidos intracelulares (Walker e Armstrong, 2010).

Neste procedimento, as suspensões celulares foram centrifugadas a 500xG durante 5 minutos, após o que se descartou o sobrenadante e se ressuspendeu o sedimento em 1 mL de PBS. De seguida, adicionou-se 1 µL da sonda DCFH<sub>2</sub>-DA (Molecular Probes, Invitrogen) com a concentração de 5 mM diluída em dimetilformamida. A suspensão celular foi incubada durante 45 minutos no escuro a 37°C. Seguiu-se de uma lavagem com PBS e imediata centrifugação a 500xG durante 5 minutos. Ressuspendeu-se o sedimento em 400 µL de PBS, agitou-se em vórtex e analisou-se no citómetro utilizando os comprimentos de onda de excitação de 494 nm e de emissão de 519 nm. Os resultados obtidos foram apresentados em média de intensidade de fluorescência normalizados relativamente ao controlo (Mendes, 2016).

A GSH tem um papel fundamental na proteção das células contra eletrófilos e radicais livres (Bump e Brown, 1990). A GSH é considerada uma molécula protetora contra o stresse oxidativo e lesões no DNA provocadas pela radiação (Chatterjee, 2013). Para quantificar os níveis de GSH, utilizou-se um composto chamado alaranjado de mercúrio. Este composto é capaz de se ligar aos grupos sulfidril de proteínas, contudo a cinética de ligação é superior na GSH do que nestes grupos sulfidril (Sales, 2014). Neste procedimento, as suspensões celulares foram centrifugadas a 500xG durante 5 minutos, e suspendeu-se o sedimento em 1mL de PBS. Seguidamente, adicionou-se o alaranjado de mercúrio (Sigma, EUA), com uma concentração de 40 µM, seguida de incubação a 37°C no escuro durante 15 minutos. Posteriormente, procedeu-se a uma lavagem seguida de centrifugação a 500xG durante 5 minutos, e ressuspendeu-se o sedimento em 400 µL de PBS. Por fim, utilizando um citómetro fez-se a deteção com comprimento de onda de excitação de 496 nm e de emissão de 578 nm. Os resultados obtidos foram apresentados em média de intensidade de fluorescência normalizados relativamente ao controlo (Mendes, 2016).

### 3.7 Análise Estatística

Toda a análise estatística foi realizada recorrendo ao *software* IBM SPSS® v.22 para *Windows* e os gráficos contruídos pelo *GraphPad Prism* versão 6.01 para *Windows*. Na análise descritiva foram determinadas medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão

(desvio-padrão e amplitude interquartil) para as variáveis quantitativas.

De forma a avaliar a normalidade da distribuição das variáveis recorreu-se ao teste *Shapiro-Wilk*. Para variáveis com distribuição normal recorreu-se a testes paramétricos, caso contrário utilizou-se testes não paramétricos. A relação de variáveis quantitativas entre dois grupos foi realizada recorrendo ao teste *U-Mann-Whitney* (teste não paramétrico). No caso de ser entre mais de dois grupos foi utilizado o teste de *Kruskal- Wallis* (teste não paramétrico) ou com recurso ao teste ANOVA de um fator (teste paramétrico). Nas comparações múltiplas recorreu-se à correção de *Bonferroni*.

Nos ensaios clonogénico, a comparação foi feita com o respetivo controlo determinando o intervalo de confiança a 95% (IConf 95%) do valor da condição, considerou-se significativamente diferente do controlo caso o IConf 95% não incluísse o valor 1.

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

Foi considerado um nível de significância de 5%.

## **Resultados**



## 4.1 Sobrevivência, Viabilidade e Proliferação Celulares

A radiação ionizante induziu uma diminuição da viabilidade e da sobrevivência nas células das duas linhas celulares. Esta diminuição foi dependente da dose de radiação e do tempo decorrido após a exposição à radiação.

A sobrevivência celular das células das linhas celulares de cancro da próstata PC3 e LNCaP encontra-se representada na Figura 15, após exposição a radiação ionizante de doses entre os 0 Gy e os 12 Gy. A sobrevivência celular de cada linha celular foi obtida de acordo com o modelo linear quadrático. Foi ainda possível determinar a  $DL_{50}$ .

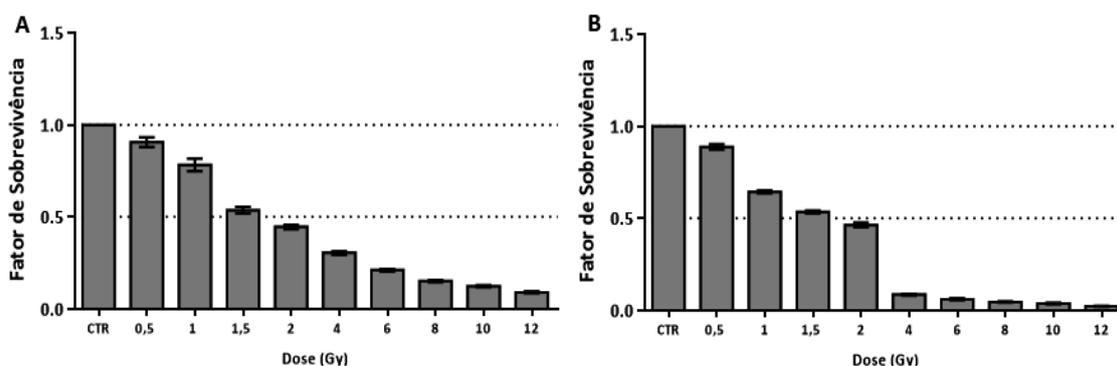


Figura 15: Sobrevivência celular da linha celular de cancro da próstata PC3 (A), da linha celular de cancro da próstata LNCaP (B), após irradiação com doses até 12 Gy. A sobrevivência celular foi obtida através do ensaio clonogénico. Os gráficos representam a média e ao erro padrão de pelo menos 5 ensaios independentes.

A linha celular de cancro da próstata PC3 é a mais radorresistente, apresentado uma  $DL_{50}$  de  $1,75 \pm 0,07$  Gy, enquanto a linha celular do cancro da próstata LNCaP é a mais radiosensível com uma  $DL_{50}$  de  $1,68 \pm 0,03$  Gy, como mostra na Tabela 6.

Tabela 6: Modelos de agressão celular e doses letais médias calculadas após exposição das linhas celulares à radiação com doses de 0,5 Gy a 12 Gy.

Linha Celular	P	V $\pm$ EP	R <sup>2</sup>	$\alpha/\beta$	$DL_{50} \pm EP$ (Gy)	MAC
PC3	$\alpha$	0,369 $\pm$ 0,01	0,98	24,01	1,75 $\pm$ 0,07	Linear Quadrático
	$\beta$	0,015 $\pm$ 0,00				
LNCaP	$\alpha$	0,334 $\pm$ 0,02	0,99	7,28	1,68 $\pm$ 0,03	Linear Quadrático
	$\beta$	0,046 $\pm$ 0,01				

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

A Figura 16 representa a viabilidade das células da linha celular de cancro da próstata PC3 e a Figura 17 representa a viabilidade das células da linha celular de cancro da próstata LNCaP após exposição a radiação ionizante.

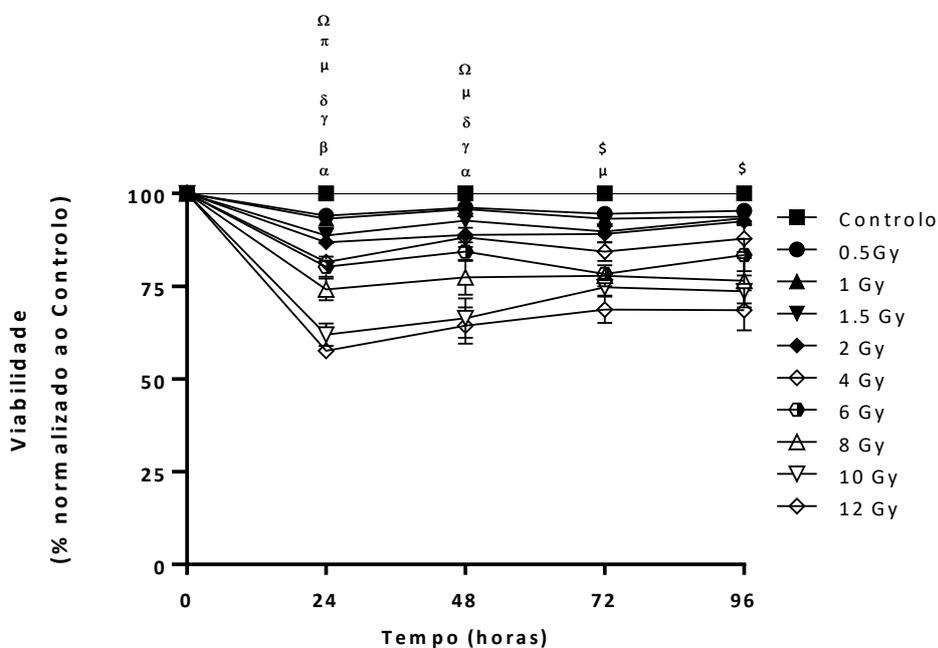


Figura 16: Curvas de dose resposta obtidas para as células da linha celular de cancro da próstata PC3 24h, 48h, 72h e 96h após exposição à radiação ionizante irradiada com radiação ionizante. As viabilidades foram obtidas através do ensaio de exclusão do azul tripano. Os resultados são apresentados na forma de percentagem, normalizados em relação ao controlo. Os pontos experimentais representam a média e o erro padrão de pelo menos 3 ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com  $\alpha$  para 0,5 Gy, em que significa  $p < 0,05$ , com  $\beta$  para 1 Gy, em que significa  $p < 0,05$ ,  $\gamma$  com para 1,5 Gy, em que significa  $p < 0,05$ , com  $\delta$  para 2 Gy, em que significa  $p < 0,05$ , com  $\mu$  para 4 Gy, em que significa  $p < 0,05$ , com  $\pi$  para 6 Gy, em que significa  $p < 0,05$ , com  $\Omega$  para 8 Gy, em que significa  $p < 0,05$  e com  $\$$  para 10 Gy, em que significa  $p < 0,05$ .

Para a linha celular de cancro da próstata PC3, como representado na Figura 16, vinte e quatro horas depois da irradiação, obtiveram-se as viabilidades celulares de 94,03±1,75 % com a dose de 0,5 Gy ( $p=0,036$ ), de 93,23±1,70% com a dose de 1 Gy ( $p=0,024$ ), de 88,66±5,00% com a dose de 1,5 Gy ( $p=0,024$ ), de 86,60±0,59% com a dose de 2 Gy ( $p=0,024$ ), de 81,46± 2,00% com a dose de 4 Gy ( $p=0,036$ ), de 80,26±2,70% com a dose de 6 Gy ( $p=0,024$ ) e de 74,13±2,93% com a dose de 8 Gy ( $p=0,036$ ), que foram significativamente inferiores à do controlo.

Quarenta e oito horas após a irradiação, obtiveram-se viabilidades celulares de 96,18±0,45% com a dose de 0,5 Gy ( $p=0,036$ ), de 92,67±1,47% com a dose de 1,5 Gy ( $p=0,036$ ), de 88,83±1,11% com a dose de 2 Gy ( $p=0,036$ ), de 88,19±2,59% com a dose de 4 Gy ( $p=0,036$ ) e

de  $77,42 \pm 4,66\%$  com a dose de 8 Gy ( $p=0,036$ ), que foram significativamente inferiores à do controlo.

Após setenta e duas horas da irradiação obtiveram-se as viabilidades celulares, de  $84,33 \pm 2,52\%$  com a dose de 4 Gy ( $p=0,024$ ) e de  $74,76 \pm 2,31\%$  com a dose de 10 Gy ( $p=0,036$ ), que foram significativamente inferiores à do controlo. Por fim, 96 horas após irradiação obteve-se uma viabilidade celular de  $73,60 \pm 4,32\%$  com a dose de 10 Gy ( $p=0,036$ ), significativamente inferior à do controlo.

Após vinte e quatro horas da irradiação, obteve-se a viabilidade celular de  $94,03 \pm 3,91\%$  para a dose de 0,5 Gy que foi significativamente superior às viabilidades celulares com a dose de 2 Gy ( $p=0,004$ ), com a dose de 4 Gy ( $p=0,008$ ), com a dose de 6 Gy ( $p=0,009$ ), com a dose de 8 Gy ( $p=0,008$ ), com a dose de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,016$ ). As viabilidades celulares com a dose de 2 Gy ( $p=0,002$ ), com a dose de 4 Gy ( $p=0,004$ ), com a dose de 6 Gy ( $p=0,004$ ), com a dose de 8 Gy ( $p=0,004$ ), com a dose de 10 Gy ( $p=0,01$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,01$ ), foram significativamente inferiores à obtida com a dose de 1 Gy. A viabilidade celular com a dose de 1,5 Gy foi significativamente superior às viabilidades com a dose de 8 Gy ( $p=0,004$ ), com a dose de 10 Gy ( $p=0,01$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,01$ ). As viabilidades celulares obtidas com a dose de 8 Gy ( $p=0,004$ ), com a dose de 10 Gy ( $p=0,01$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,01$ ), foram significativamente inferiores à viabilidade celular da dose de 2 Gy. A viabilidade celular obtida com a dose de 4 Gy foi significativamente superior às viabilidades com a dose de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,016$ ). As viabilidades celulares obtidas com a dose de 10 Gy ( $p=0,01$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,01$ ) foram significativamente inferiores à viabilidade obtida com a dose de 6 Gy. Por fim, a viabilidade celular obtida com a dose de 8 Gy foi significativamente superior do que as viabilidades obtidas com a dose de 10 Gy ( $p=0,032$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,016$ ).

Quarenta e oito horas após a irradiação, obteve-se uma viabilidade celular com a dose de 0,5 Gy significativamente superior às viabilidades com a dose de 2 Gy ( $p=0,008$ ), com a dose de 4 Gy ( $p=0,008$ ), com a dose de 6 Gy ( $p=0,016$ ), com a dose de 8 Gy ( $p=0,008$ ), com a dose de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,016$ ). A viabilidade celular obtida com a dose de 1 Gy foi superior às viabilidades com a dose de 2 Gy ( $p=0,016$ ), com a dose de 4 Gy ( $p=0,016$ ), com a dose de 6 Gy ( $p=0,029$ ), com a dose de 8 Gy ( $p=0,016$ ), com a dose de 10 Gy ( $p=0,029$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,029$ ). As viabilidades celulares obtidas com as doses de 6 Gy ( $p=0,016$ ), de 8 Gy ( $p=0,008$ ), de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e de 12 Gy ( $p=0,016$ ) foram significativamente inferiores à da dose de 1,5 Gy. As viabilidades celulares obtidas com a dose de 8 Gy ( $p=0,008$ ), com a dose de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,016$ ) foram significativamente inferiores à com

a dose de 2 Gy. A viabilidade celular obtida com a dose de 4 Gy foi significativamente superior às viabilidades com a dose de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,016$ ). As viabilidades obtidas com a dose de 10 Gy ( $p=0,01$ ) e com a dose 12 Gy ( $p=0,029$ ) foram significativamente inferiores à viabilidade obtida com a dose de 6 Gy.

Setenta e duas horas após a irradiação das células, a viabilidade celular obtida com a dose de 0,5 Gy foi significativamente superior à viabilidade celular com a dose de 4 Gy ( $p=0,032$ ), com a dose de 6 Gy ( $p=0,029$ ), com a dose de 8 Gy ( $p=0,029$ ), com a dose de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,029$ ). As viabilidades celulares obtidas com a dose de 4 Gy ( $p=0,032$ ), com a dose de 6 Gy ( $p=0,029$ ), com a dose de 8 Gy ( $p=0,029$ ), com a dose de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,029$ ) foram significativamente inferiores à viabilidade com a dose de 1 Gy. A viabilidade celular obtida com a dose de 1,5 Gy foi significativamente superior às viabilidades com a dose de 6 Gy ( $p=0,029$ ), com a dose de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,029$ ). As viabilidades celulares obtidas com a dose de 6 Gy ( $p=0,016$ ), com a dose de 10 Gy ( $p=0,008$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,016$ ) foram significativamente inferiores à viabilidade com a dose de 2 Gy, assim como a viabilidade de 12 Gy ( $p=0,032$ ) comparando com a dose de 4 Gy.

Por fim, após noventa e seis horas da irradiação a viabilidade celular obtida com a dose de 0,5 Gy foi significativamente superior às viabilidades com a dose de 8 Gy ( $p=0,029$ ), com a dose de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,029$ ). As viabilidades celulares obtidas com a dose de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,029$ ) foram significativamente inferiores à viabilidade com a dose de 1 Gy. A viabilidade obtida com a dose de 1,5 Gy foi significativamente superior às viabilidades com a dose de 8 Gy ( $p=0,029$ ), com a dose 10 Gy ( $p=0,016$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,029$ ), o mesmo foi observado com a viabilidade de 2 Gy comparando com as viabilidades obtidas com a dose de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,029$ ).

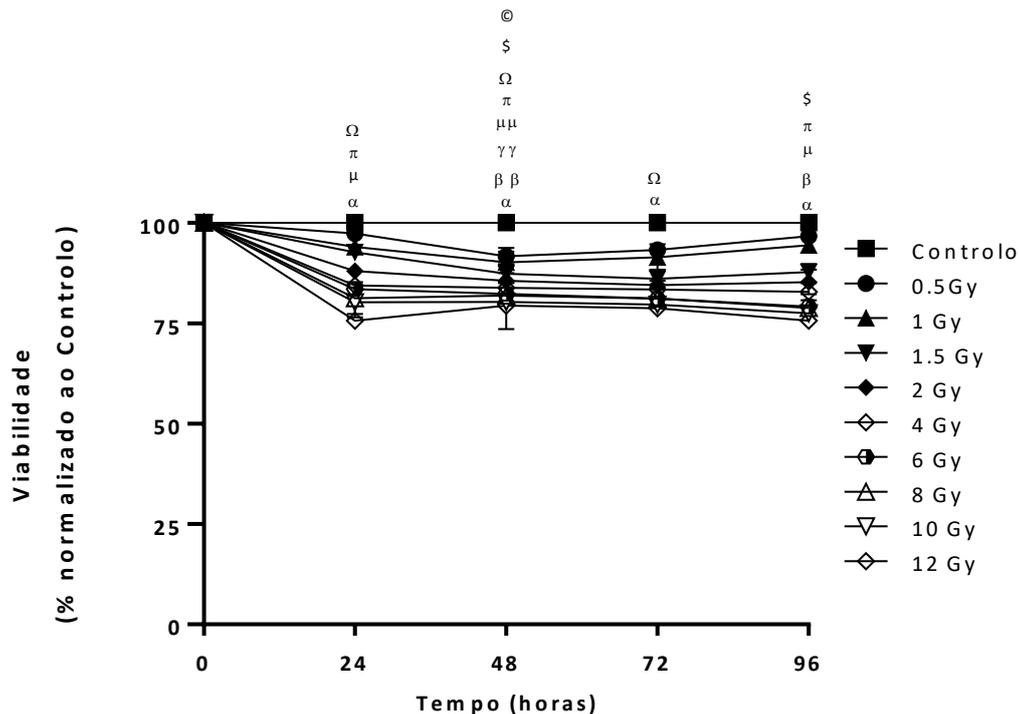


Figura 17: Curvas de dose resposta obtidas para as células da linha celular de cancro da próstata LNCaP 24h, 48h, 72h e 96h após exposição à radiação ionizante irradição com radiação ionizante. As viabilidades foram obtidas através do ensaio de exclusão do azul tripano. Os resultados são apresentados na forma de percentagem, normalizados em relação ao controlo. Os pontos experimentais representam a média e o erro padrão de pelo menos 3 ensaios independentes. Os pontos experimentais representam a média e o erro padrão de pelo menos 3 ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com  $\alpha$  para 0,5 Gy, em que significa  $p < 0,05$ , com  $\beta$  para 1 Gy, em que significa  $p < 0,05$  e  $\beta\beta$  significa  $p < 0,01$ ,  $\gamma$  com para 1,5 Gy, e em que significa  $p < 0,05$  e  $\gamma\gamma$  significa  $p < 0,01$ , com  $\delta$  para 2 Gy, em que significa  $p < 0,05$ , com  $\mu$  para 4 Gy, em que significa  $p < 0,05$  e  $\mu\mu$  significa  $p < 0,01$ , com  $\pi$  para 6 Gy, em que significa  $p < 0,05$ , com  $\Omega$  para 8 Gy, em que significa  $p < 0,05$ , com  $\$$  para 10 Gy, em que significa  $p < 0,05$  e  $\textcircled{C}$  para 12 Gy, em que significa  $p < 0,05$ .

Para a linha celular do cancro da próstata LNCaP, como representado na Figura 17, após vinte e quatro horas da irradiação obtiveram-se viabilidades celulares de  $97,34 \pm 0,75\%$  com a dose de 0,5 Gy ( $p=0,036$ ), de  $84,41 \pm 1,94\%$  com a dose de 4 Gy ( $p=0,036$ ), de  $83,53 \pm 1,51\%$  com a dose de 6 Gy ( $p=0,036$ ), de  $81,28 \pm 3,99\%$  com a dose de 8 Gy ( $p=0,036$ ) e de  $75,63 \pm 1,97\%$  com a dose de 12 Gy ( $p=0,036$ ), significativamente inferiores à do controlo.

Quarenta e oito horas após a irradiação, obtiveram-se viabilidades celulares de  $91,71 \pm 2,10\%$  com a dose de 0,5 Gy ( $p=0,016$ ), de  $90,18 \pm 2,64\%$  com a dose de 1 Gy ( $p=0,008$ ), de  $87,38 \pm 2,40\%$  com a dose de 1,5 Gy ( $p=0,008$ ), de  $83,83 \pm 1,92\%$  com a dose de 4 Gy ( $p=0,008$ ), de  $82,31 \pm 2,01\%$  com a dose de 6 Gy ( $p=0,016$ ), de  $81,93 \pm 1,55\%$  com a dose de 8 Gy ( $p=0,016$ ), de  $80,30 \pm 1,38\%$  com a dose de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e de  $79,37 \pm 5,84\%$  com a dose de 12 Gy ( $p=0,008$ ),

significativamente inferiores à obtida no controlo.

Após setenta e duas horas da irradiação das células, obtiveram-se viabilidades de  $93,24 \pm 1,63\%$  com a dose de 0,5 Gy ( $p=0,024$ ) e de  $81,16 \pm 1,45\%$  com a dose de 8 Gy ( $p=0,036$ ), significativamente inferiores à do controlo.

Por fim, após noventa e seis horas de irradiar a suspensão celular obtiveram-se viabilidades celulares de  $96,69 \pm 0,88\%$  com a dose de 0,5 Gy ( $p=0,036$ ), de  $94,43 \pm 1,38\%$  com a dose de 1 Gy ( $p=0,036$ ), de  $82,86 \pm 2,14\%$  com a dose de 4 Gy ( $p=0,036$ ), de  $79,16 \pm 1,36\%$  com a dose de 6 Gy ( $p=0,036$ ) e de  $77,47 \pm 2,00\%$  com a dose de 10 Gy ( $p=0,036$ ), significativamente inferiores à do controlo.

Após vinte e quatro horas da irradiação verificou-se que a viabilidade celular da dose de 0,5 Gy foi significativamente superior às viabilidades com a dose de 1 Gy ( $p=0,032$ ), de 2 Gy ( $p=0,016$ ), de 4 Gy ( $p=0,008$ ), de 6 Gy ( $p=0,008$ ), de 8 Gy ( $p=0,008$ ), de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e de 12 Gy ( $p=0,008$ ). As viabilidades celulares obtidas com a dose de 4 Gy ( $p=0,016$ ), de 6 Gy ( $p=0,016$ ), de 8 Gy ( $p=0,016$ ), de 10 Gy ( $p=0,029$ ) e de 12 Gy ( $p=0,016$ ) foram significativamente inferiores à da dose de 1 Gy. A viabilidade celular obtida com a dose de 1,5 Gy foi significativamente superior à dose de 4 Gy ( $p=0,032$ ), com a dose de 6 Gy ( $p=0,016$ ), com a dose de 8 Gy ( $p=0,032$ ), com a dose de 10 Gy ( $p=0,029$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,016$ ). A viabilidade celular da dose de 2 Gy foi significativamente superior à da dose de 10 Gy ( $p=0,029$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,016$ ). A viabilidade celular obtida com a dose de 12 Gy ( $p=0,016$ ) foi significativamente inferior à da dose de 4 Gy, assim como na viabilidade com a dose de 6 Gy foi significativamente superior à da dose de 12 Gy ( $p=0,016$ ).

Depois de quarenta e oito horas após a irradiação da suspensão celular de LNCaP verificou-se que a viabilidade celular da dose de 0,5 Gy foi significativamente superior às das doses de 4 Gy ( $p=0,032$ ), da dose de 6 Gy ( $p=0,029$ ), da dose de 8 Gy ( $p=0,029$ ) e da dose de 10 Gy ( $p=0,029$ ). A viabilidade obtida com a dose de 10 Gy ( $p=0,032$ ) foi significativamente inferior à da dose de 1 Gy. As viabilidades celulares obtidas com as doses de 2 Gy, de 4 Gy e de 6 Gy foram significativamente superiores às obtidas com a dose 12 Gy ( $p=0,016$ ,  $p=0,016$  e  $p=0,016$  respetivamente).

Setenta horas depois da irradiação, obtiveram-se viabilidades celulares com a dose de 2 Gy ( $p=0,029$ ), com a dose de 4 Gy ( $p=0,029$ ), com a dose 6 Gy ( $p=0,029$ ), com a dose de 8 Gy ( $p=0,016$ ), com a dose de 10 Gy ( $p=0,029$ ) e com a dose de 12 Gy ( $p=0,029$ ) que foram significativamente inferiores à viabilidade da dose de 0,5 Gy. A viabilidade celular da dose de 1,5 Gy foi significativamente superior à da dose de 12 Gy ( $p=0,029$ ). As viabilidades celulares das doses de 10 Gy ( $p=0,029$ ) e de 12 Gy ( $p=0,029$ ) foram significativamente inferiores à da dose

de 2 Gy.

Por fim noventa e seis horas após irradiação, as viabilidades celulares obtidas com as doses de 1,5 Gy ( $p=0,016$ ), de 2 Gy ( $p=0,016$ ), de 4 Gy ( $p=0,008$ ), de 6 Gy ( $p=0,008$ ), de 8 Gy ( $p=0,016$ ), de 10 Gy ( $p=0,008$ ) e de 12 Gy ( $p=0,016$ ) foram significativamente inferiores à viabilidade celular da dose de 0,5 Gy. A viabilidade celular da dose de 1 Gy foi significativamente superior às das doses de 1,5 Gy ( $p=0,032$ ), de 2 Gy ( $p=0,032$ ), de 4 Gy ( $p=0,008$ ), de 6 Gy ( $p=0,008$ ), de 8 Gy ( $p=0,016$ ), de 10 Gy ( $p=0,008$ ) e de 12 Gy ( $p=0,016$ ). A viabilidade celular da dose de 1,5 Gy foi significativamente superior à das doses de 6 Gy ( $p=0,032$ ), de 8 Gy ( $p=0,029$ ), de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e de 12 Gy ( $p=0,029$ ). Os resultados obtidos para a viabilidade das linhas celulares PC3 e LNCaP encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: Viabilidade das células das linhas celulares PC3 e LNCaP, 24h, 48h, 72h e 96h após exposição à irradiação.

Dose	Linha celular	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
		Média±EP	Média±EP	Média±EP	Média±EP
<b>0,5 Gy</b>	PC3	94,03±1,75	96,18±0,50	94,52±1,87	95,36±1,67
	LNCaP	97,34±0,75	91,71±2,10	93,24±1,63	96,69±0,88
<b>1 Gy</b>	PC3	93,23±1,70	95,76±0,39	93,16±1,91	93,78±2,27
	LNCaP	94,01±1,15	90,18±2,64	91,47±3,20	94,43±1,38
<b>1,5 Gy</b>	PC3	88,66±2,04	92,67±1,47	89,78±1,53	93,32±1,30
	LNCaP	92,70±1,88	87,38±2,40	86,12±2,23	87,80±1,99
<b>2 Gy</b>	PC3	86,86±0,59	88,83±1,11	89,08±2,23	92,54±1,49
	LNCaP	88,03±1,01	85,55±1,72	84,52±0,99	85,28±3,06
<b>4 Gy</b>	PC3	81,46±2,00	88,19±2,59	84,33±2,52	87,82±3,60
	LNCaP	84,41±1,94	83,83±1,92	83,38±2,21	82,86±2,14
<b>6 Gy</b>	PC3	80,26±2,70	84,33±2,50	78,36±1,92	83,41±4,36
	LNCaP	83,53±1,51	82,31±2,01	81,19±1,62	79,16±1,36
<b>8 Gy</b>	PC3	74,13±2,93	77,42±4,66	77,84±2,83	76,49±6,06
	LNCaP	81,28±3,99	81,93±1,55	81,16±1,45	78,83±1,46
<b>10 Gy</b>	PC3	61,94±3,01	66,39±5,32	74,76±2,31	73,60±4,32
	LNCaP	80,21±3,74	80,30±1,38*	79,67±0,62	77,47±2,00
<b>12 Gy</b>	PC3	57,56±1,75	64,37±4,89	68,68±3,57	68,52±5,38
	LNCaP	75,63±1,97*	79,37±5,84	78,72±0,43	75,63±1,90

Legenda: EP= Erro Padrão. Os resultados foram expressos na forma de percentagem em relação a culturas celulares controlo não tratadas (controlo igual a 100%). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos sete ensaios independentes. As diferenças significativas entre a linha celular LNCaP e a restante estão representadas com \* para  $p<0,05$ .

Na Figura 18 e na Figura 19, estão representados os gráficos relativos à proliferação celular das linhas celulares do cancro da próstata PC3 e LNCaP, respetivamente.

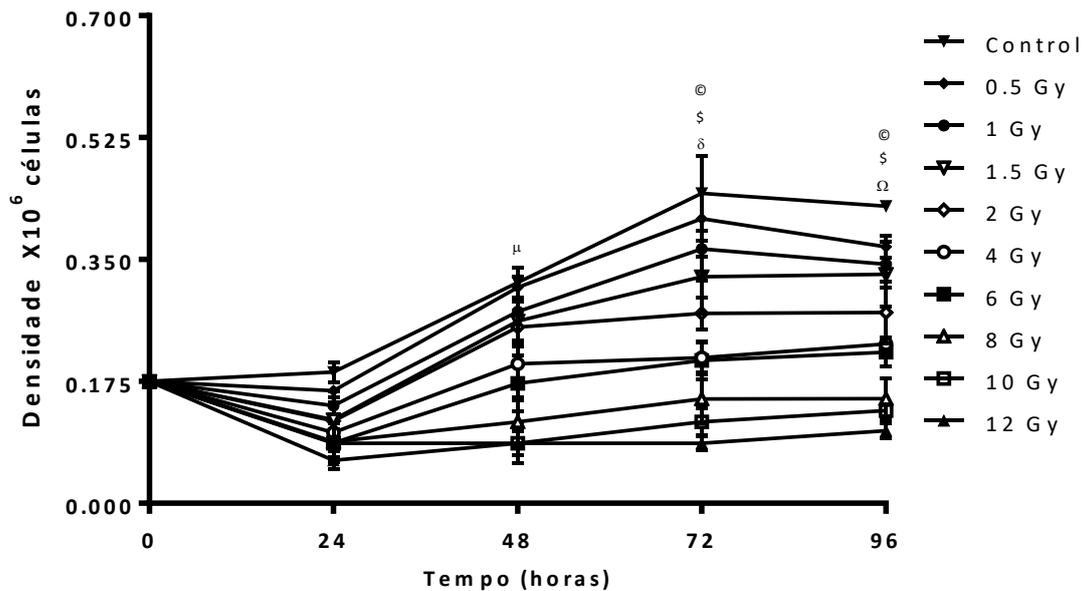


Figura 18: Densidades celulares ( $\times 10^6$  células) obtidas para as células da linha celular de cancro da próstata PC3, após irradiação com radiação ionizante entre as doses de 0 Gy e 12 Gy. O ensaio do Azul Tripano permitiu obter as densidades celulares. Os pontos experimentais representam a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com  $\delta$  para 2 Gy, em que significa  $p < 0,05$ , com  $\mu$  para 4 Gy, em que significa  $p < 0,05$ , com  $\Omega$  para 8 Gy, em que significa  $p < 0,05$ , com  $\$$  para 10 Gy, em que significa  $p < 0,05$  e  $\Theta$  para 12 Gy, em que significa  $p < 0,05$ .

Na Figura 18, estão representadas as densidades celulares obtidas para a linha celular de cancro da próstata PC3 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas após irradiação com radiação X. Quarenta e oito horas após irradiação obteve-se uma densidade celular, cujo valor foi de  $0,10 \pm 0,00 \times 10^6$  células, com a dose de 4 Gy ( $p=0,036$ ) significativamente inferior à do controlo. Depois de setenta e duas horas da irradiação obtiveram-se densidades celulares com um valor de  $0,27 \pm 0,02 \times 10^6$  células com a dose de 2 Gy ( $p=0,036$ ),  $0,12 \pm 0,02 \times 10^6$  células com a dose de 10 Gy ( $p=0,036$ ) e  $0,09 \pm 0,01 \times 10^6$  células com a dose de 12 Gy ( $p=0,036$ ) que foram significativamente inferiores à do controlo. Por fim noventa e seis horas após a irradiação verificou-se que a densidade celular do controlo foi significativamente superior às densidades celulares obtidas com as doses de 8 Gy ( $p=0,036$ ), com um valor de  $0,15 \pm 0,03 \times 10^6$  células, de 10 Gy ( $p=0,036$ ) com um valor de  $0,13 \pm 0,01 \times 10^6$  células e de 12 Gy ( $p=0,036$ ) com um valor de  $0,10 \pm 0,01 \times 10^6$  células.

Quarenta e oito horas após irradiação, a densidade celular obtida para a dose de 0,5 Gy,  $0,31 \pm 0,00 \times 10^6$  células, foi significativamente superior à densidade celular obtida com a dose de

6 Gy ( $p=0,036$ ). Também se verificou que a densidade celular obtida com as doses de 8 Gy ( $p=0,036$ ), de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e de 12 Gy ( $p=0,016$ ) foram significativamente inferiores à da dose de 2 Gy, com um valor de  $0,25\pm 0,02 \times 10^6$  células. Setenta e duas horas após irradiação das células, verificou-se que a densidade celular para a dose de 0,5 Gy, foi de  $0,41\pm 0,09 \times 10^6$  células, significativamente superior à obtida com as doses de 4 Gy ( $p=0,038$ ), de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e de 12 Gy ( $p=0,016$ ). As densidades celulares obtidas para doses de 4 Gy ( $p=0,024$ ), de 10 Gy ( $p=0,036$ ) e de 12 Gy ( $p=0,036$ ) foram significativamente inferiores à da dose de 1 Gy, com um valor de  $0,37\pm 0,01 \times 10^6$  células. A densidade celular obtida para a dose de 1,5 Gy,  $0,33\pm 0,05 \times 10^6$  células, foi significativamente superior às das doses de 4 Gy ( $p=0,048$ ), de 8 Gy ( $p=0,029$ ), de 10 Gy ( $p=0,036$ ) e de 12 Gy ( $p=0,036$ ). As densidades celulares obtidas com as doses de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e de 12 Gy ( $p=0,016$ ) foram significativamente inferiores à da dose de 2 Gy, com um valor de  $0,27\pm 0,02 \times 10^6$  células. A densidade celular para a dose de 4 Gy,  $0,21\pm 0,02 \times 10^6$  células, foi significativamente superior às das doses de 10 Gy ( $p=0,017$ ) e de 12 Gy ( $p=0,004$ ), acontecendo o mesmo para a dose 6 Gy, apresentando um valor de  $0,21\pm 0,03 \times 10^6$  células, significativamente superior à da dose de 12 Gy ( $p=0,016$ ). Finalmente noventa e seis horas após irradiação da linha celular, a densidade celular com a dose de 0,5 Gy,  $0,37\pm 0,02 \times 10^6$  células, foi significativamente superior às densidades celulares com as doses de 8 Gy ( $p=0,036$ ), de 10 Gy ( $p=0,036$ ) e de 12 Gy ( $p=0,036$ ). As densidades celulares obtidas para as doses de 4 Gy ( $p=0,016$ ), de 6 Gy ( $p=0,032$ ), de 8 Gy ( $p=0,008$ ), de 10 Gy ( $p=0,008$ ) e de 12 Gy ( $p=0,008$ ) foram significativamente inferiores à da dose 1 Gy, com um valor de  $0,34\pm 0,03 \times 10^6$  células. Para a dose de 1,5 Gy obteve-se uma densidade celular de  $0,33\pm 0,05 \times 10^6$  células, valor significativamente superior às das densidades celulares obtidas para as doses de 8 Gy ( $p=0,032$ ), de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e de 12 Gy ( $p=0,016$ ). O mesmo se observou com para a dose de 2 Gy,  $0,27 \pm 0,05 \times 10^6$  células, significativamente superior às das doses de 8 Gy ( $p=0,029$ ), de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e de 12 Gy ( $p=0,016$ ). Para as doses de 4 Gy ( $0,023\pm 0,01 \times 10^6$  células) e de 6 Gy ( $0,22\pm 0,02 \times 10^6$  células), as densidades celulares foram significativamente superiores às das doses de 10 Gy ( $p=0,016$  e  $p=0,016$ , respetivamente) e de 12 Gy ( $p=0,016$  e  $p=0,016$ , respetivamente).

Em relação à proliferação celular da linha celular de cancro da próstata LNCaP, representada na Figura 19, depois de quarenta e oito horas da irradiação, as densidades celulares com as doses de 1 Gy ( $p=0,016$ ), com um valor de  $0,17\pm 0,02 \times 10^6$  células, de 1,5 Gy ( $p=0,036$ ), com um valor de  $0,14\pm 0,01 \times 10^6$  células, de 2 Gy ( $p=0,008$ ), com um valor de  $0,13\pm 0,01 \times 10^6$  células, de 4 Gy ( $p=0,008$ ), com um valor de  $0,12\pm 0,02 \times 10^6$  células, de 6 Gy ( $p=0,016$ ), com um valor de  $0,11\pm 0,01 \times 10^6$  células, de 8 Gy ( $p=0,008$ ), com um valor de  $0,09\pm 0,02 \times 10^6$  células,

de 10 Gy ( $p=0,016$ ), com um valor de  $0,09\pm 0,02 \times 10^6$  células e de 12 Gy ( $p=0,008$ ), com um valor de  $0,08\pm 0,02 \times 10^6$  células foram significativamente inferiores à densidade celular do controlo. Após setenta e duas horas da exposição das suspensões celulares à radiação ionizante, as densidades celulares obtidas com as doses de 1,5 Gy ( $p=0,036$ ), com um valor de  $0,16\pm 0,01 \times 10^6$  células e de 2 Gy ( $p=0,036$ ), com um valor de  $0,16\pm 0,02 \times 10^6$  células foram significativamente inferiores à obtida no controlo.

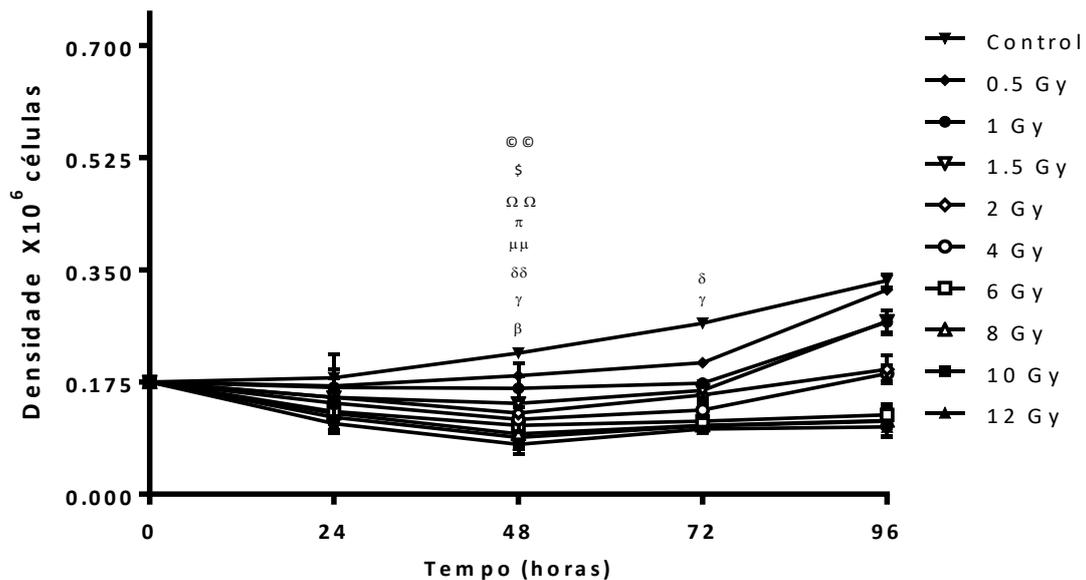


Figura 19: Densidades celulares ( $\times 10^6$  células) obtidas para as células da linha celular de cancro da próstata LNCaP, após irradiação com radiação ionizante entre as doses de 0 Gy e 12 Gy. O ensaio do Azul Tripiano permitiu obter as densidades celulares. Os pontos experimentais representam a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com  $\alpha$  para 0,5 Gy, em que significa  $p < 0,05$ , com  $\beta$  para 1 Gy, em que significa  $p < 0,05$ ,  $\gamma$  com para 1,5 Gy, e em que significa  $p < 0,05$ , com  $\delta$  para 2 Gy, em que significa  $p < 0,05$  e  $\delta\delta$  significa  $p < 0,01$ , com  $\mu$  para 4 Gy, em que significa  $p < 0,05$  e  $\mu\mu$  significa  $p < 0,01$ , com  $\pi$  para 6 Gy, em que significa  $p < 0,05$ , com  $\Omega$  para 8 Gy, em que significa  $p < 0,05$ , e  $\Omega\Omega$  significa  $p < 0,01$ , com  $\$$  para 10 Gy, em que significa  $p < 0,05$  e  $\textcircled{c}$  para 12 Gy, em que significa  $p < 0,05$  e  $\textcircled{c}\textcircled{c}$  significa  $p < 0,01$ .

Vinte e quatro horas após irradiação das células, a densidade celular obtida com a dose de 12 Gy ( $p=0,029$ ) foi significativamente inferior à densidade celular obtida com a dose de 0,5 Gy, apresentando um valor de  $0,17\pm 0,01 \times 10^6$  células. Após quarenta e oito horas da irradiação, as densidades celulares obtidas com as doses de 6 Gy ( $p=0,029$ ), de 8 Gy ( $p=0,016$ ), de 10 Gy ( $p=0,029$ ) e de 12 Gy ( $p=0,016$ ) foram significativamente inferiores à da dose de 0,5 Gy, cujo valor obtido foi  $0,19\pm 0,02 \times 10^6$  células. As densidades celulares obtidas com as doses de 1 Gy, com um valor de  $0,17 \pm 0,02 \times 10^6$  células, de 1,5 Gy, com um valor de  $0,14\pm 0,00 \times 10^6$  células

e de 2 Gy, com um valor de  $0,13 \pm 0,01 \times 10^6$  células foram significativamente superiores à densidade obtida com a dose de 12 Gy ( $p=0,016$ ;  $p=0,036$  e  $p=0,036$  respetivamente). Setenta e duas horas após irradiação, as densidades celulares obtidas com as doses de 6 Gy ( $p=0,032$ ), de 8 Gy ( $p=0,016$ ), de 10 Gy ( $p=0,016$ ) e de 12 Gy ( $p=0,036$ ) foram significativamente inferiores à densidade celular obtida com a dose de 1,5 Gy, com um valor de  $0,16 \pm 0,01 \times 10^6$  células. A densidade celular obtida com a dose de 2 Gy foi significativamente superior à densidade celular obtida com a dose de 10 Gy ( $p=0,032$ ). Finalmente, noventa e seis horas após exposição das suspensões celulares a radiação ionizante, as densidades celulares obtidas com as doses de 2 Gy ( $p=0,029$ ), de 4 Gy ( $p=0,029$ ), de 6 Gy ( $p=0,029$ ), de 8 Gy ( $p=0,029$ ) e de 10 Gy ( $p=0,029$ ) foram significativamente inferiores à densidade celular obtida com a dose de 0,5 Gy, com um valor de  $0,32 \pm 0,01 \times 10^6$  células. Os resultados obtidos da proliferação celular das linhas celulares PC3 e LNCaP encontram-se representados na

Tabela 8.

Tabela 8: Proliferação das células das linhas PC3 e LNCaP 24h, 48h, 72h e 96 h após exposição à irradiação.

Dose	Linha celular	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
		Média±EP	Média±EP	Média±EP	Média±EP
Ctr	PC3	0,19±0,02	0,32±0,02	0,45±0,05	0,43±0,01
	LNCaP	0,18±0,04	0,22±0,00	0,27±0,00	0,33±0,01
0,5 Gy	PC3	0,16±0,00	0,31±0,00	0,41±0,09	0,37±0,02
	LNCaP	0,17±0,01	0,19±0,02	0,21±0,01	0,32±0,01
1 Gy	PC3	0,14±0,01	0,28±0,05	0,37±0,01	0,34±0,03
	LNCaP	0,17±0,03	0,17±0,02	0,17±0,00	0,27±0,02
1,5 Gy	PC3	0,12±0,03	0,26±0,03	0,33±0,05	0,33±0,05
	LNCaP	0,15±0,03	0,14±0,00	0,16±0,01*	0,27±0,02
2 Gy	PC3	0,12±0,04	0,25±0,02	0,27±0,02	0,27±0,05
	LNCaP	0,15±0,01	0,13±0,01*	0,16±0,02*	0,20±0,02
4 Gy	PC3	0,10±0,00	0,20±0,05	0,21±0,02	0,23±0,01
	LNCaP	0,14±0,02	0,12±0,02	0,13±0,01*	0,19±0,01
6 Gy	PC3	0,09±0,03	0,17±0,04	0,21±0,03	0,22±0,02
	LNCaP	0,13±0,02	0,11±0,01	0,11±0,01	0,12±0,01*
8 Gy	PC3	0,09±0,01	0,12±0,04	0,15±0,04	0,15±0,03
	LNCaP	0,13±0,02	0,09±0,02	0,11±0,01	0,12±0,03
10 Gy	PC3	0,09±0,02	0,09±0,02	0,12±0,02	0,13±0,01
	LNCaP	0,12±0,02	0,09±0,02	0,11±0,01	0,11±0,01
12 Gy	PC3	0,06±0,01	0,09±0,03	0,09±0,01	0,10±0,01
	LNCaP	0,11±0,02	0,08±0,02	0,10±0,01	0,11±0,01

Legenda: Ctr=Controlo; EP= Erro Padrão. Os resultados foram expressos como densidade celular (número de células). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos sete ensaios independentes. As diferenças significativas entre a linha celular LNCaP e a restante estão representadas com \* para  $p < 0,05$ .

A proliferação celular foi determinada igualmente, recorrendo à pesquisa da proteína nuclear Ki-67 nas células das linhas celulares de cancro da próstata PC3 e LNCaP, após irradiação às 48 horas. Na figura 20 podemos observar os gráficos que representam a população de células nas fases  $G_1$ , S  $G_2$  e M, *versus* a população de células na fase  $G_0$ .

Os gráficos representam a linha celular do cancro da próstata PC3, após 48 horas da irradiação com as doses de 1,5 Gy, de 6 Gy e de 12 Gy, e ainda as células que não foram expostas à radiação ionizante (controlo).

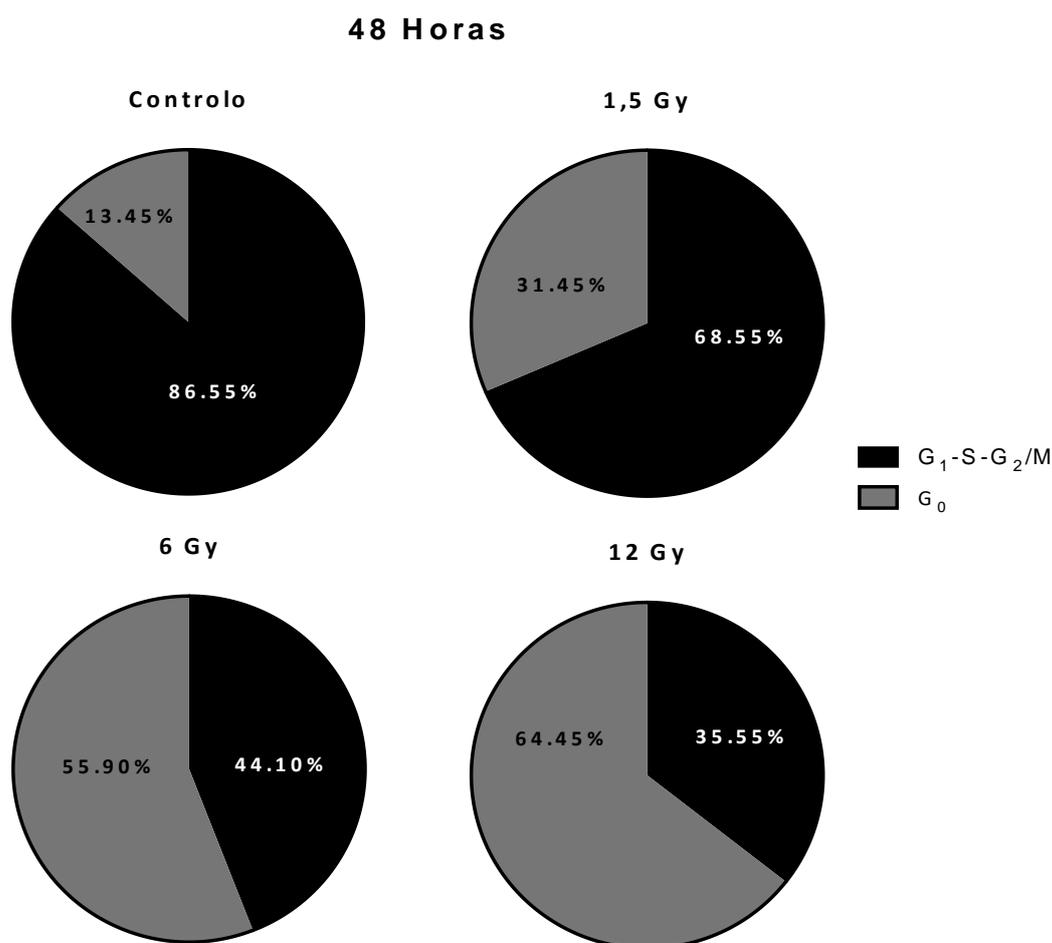


Figura 20: Representação de populações de células nas fases  $G_1$ , S e  $G_2$ /M, com população de células na fase  $G_0$ , após 48 horas da irradiação das células da linha celular de cancro da próstata PC3. Contagem de 200 células e 500 células, ajustando ambas para 100%. Os gráficos representam a média das duas contagens.

Através da análise da figura 20, observa-se que ocorre uma diminuição da proliferação celular com o aumento da dose de radiação. Podemos observar que com a dose de 6 Gy a maioria das populações de células encontram-se na fase  $G_0$ .

Para a linha celular de cancro da próstata LNCaP, representado na Figura 21, observou-

se uma resposta à exposição à radiação ionizante similar à linha PC3, ou seja, há uma diminuição da proliferação com o aumento da dose de radiação ionizante. A fase  $G_0$ , a partir da dose de 6 Gy é a mais frequentemente observada.

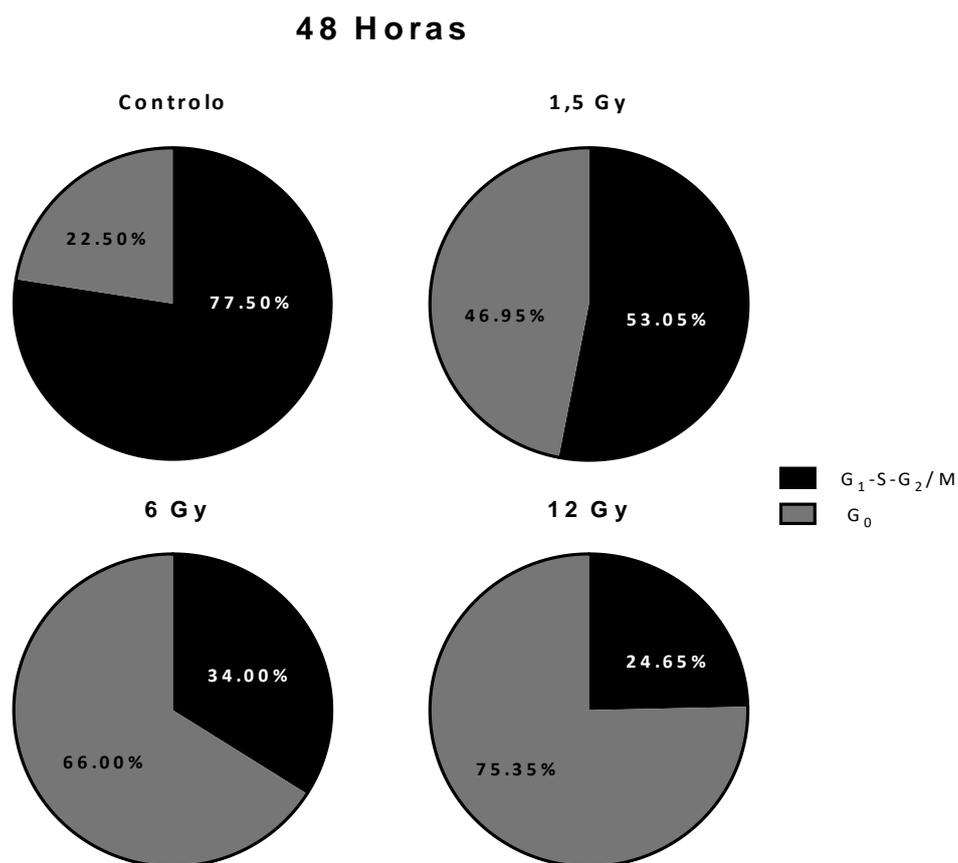


Figura 21: Representação de populações de células nas fases  $G_1,S$  e  $G_2/M$ , com população de células na fase  $G_0$ , após 48 horas da irradiação das células da linha celular de cancro da próstata LNCaP. Contagem de 200 células e 500 células, ajustando ambas para 100%. Os gráficos representam a média das duas contagens.

## 4.2 Tipos de morte celular

A radiação ionizante induziu uma diminuição da população de células viáveis e um aumento do número de células em morte celular (apoptose inicial, apoptose tardia/necrose ou necrose). As alterações observadas foram dependentes da dose de irradiação, bem como da

linha celular em estudo.

Em relação à linha celular do cancro da próstata PC3, representado na Figura 22, observou-se, que após 48 horas da irradiação ocorreu uma diminuição significativa da viabilidade das culturas celulares irradiadas com a dose de 1,5 Gy que apresentou um valor de  $67,0 \pm 1,32\%$  ( $p=0,029$ ), com a dose de 6 Gy onde se obteve um valor de  $62,5 \pm 1,31\%$  ( $p=0,029$ ) e com a dose de 12 Gy que apresentou um valor de  $56,7 \pm 1,41\%$  ( $p=0,029$ ), em relação às culturas celulares do controlo, onde se obteve um valor de  $85,8 \pm 1,70\%$ . O tipo de morte celular principal observado para esta linha celular foi a apoptose inicial, que aumentou significativamente para as doses de 1,5 Gy apresentando um valor de  $16,5 \pm 2,19\%$  ( $p=0,029$ ), de 6 Gy onde se obteve um valor de  $19,5 \pm 2,63\%$  ( $p=0,029$ ) e de 12 Gy apresentando um valor de  $23,7 \pm 3,22\%$  ( $p=0,029$ ), em relação ao controlo, onde se obteve um valor de  $4,0 \pm 0,86\%$ . O grupo de células que morreu por apoptose tardia/necrose aumentou significativamente para a dose de 6 Gy com um valor de  $7,2 \pm 1,67\%$  ( $p=0,029$ ), em relação ao controlo. No grupo de células em necrose não se registou diferenças significativas em relação controlo.

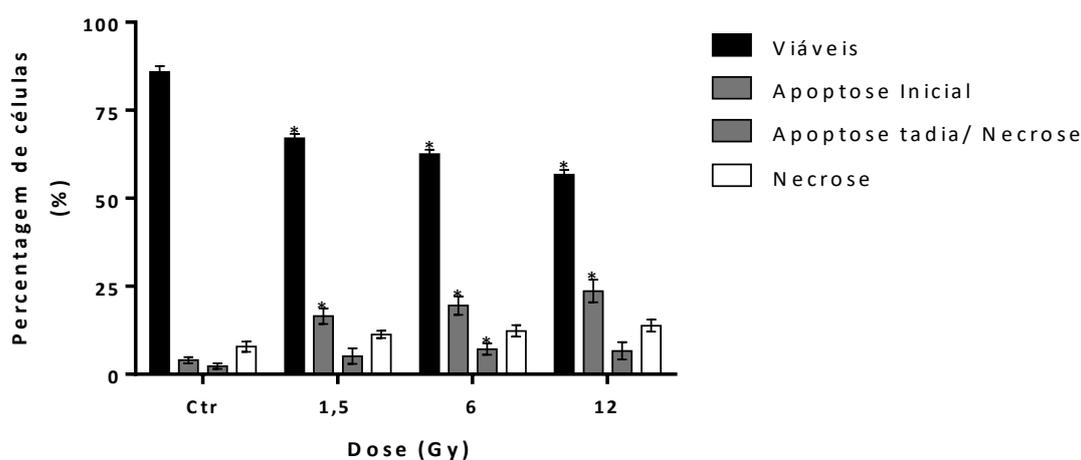


Figura 22: Tipo de morte das células da linha celular de cancro da próstata PC3. De forma a avaliar o tipo de morte recorreu-se à citometria de fluxo utilizando a dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo, após 48 horas da irradiação. Os gráficos representam a percentagem de células viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia/necrose e em necrose. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com \* para  $p < 0,05$ . As comparações entre doses são descritas ao longo do texto.

A viabilidade celular obtida com a dose de 1,5 Gy foi significativamente superior à viabilidade celular das células irradiadas com a dose de 12 Gy ( $p=0,029$ ). Assim como, a viabilidade celular obtida com a dose de 12 Gy foi significativamente inferior à viabilidade celular obtida com a dose de 6 Gy ( $p=0,029$ ).

No caso da linha celular do cancro da próstata LNCaP, observámos que o principal tipo de morte celular induzido pela radiação ionizante foi a necrose, onde o controlo apresentou um valor de  $10,3 \pm 0,63\%$  significativamente inferior aos valores obtidos com as doses de 1,5 Gy  $18,5 \pm 0,29\%$  ( $p=0,029$ ), de 6 Gy com o valor de  $23,8 \pm 2,32\%$  ( $p=0,029$ ) e de 12 Gy apresentando um valor de  $24,3 \pm 1,44\%$  ( $p=0,029$ ). Nas restantes populações não se registaram diferenças significativas em relação ao controlo.

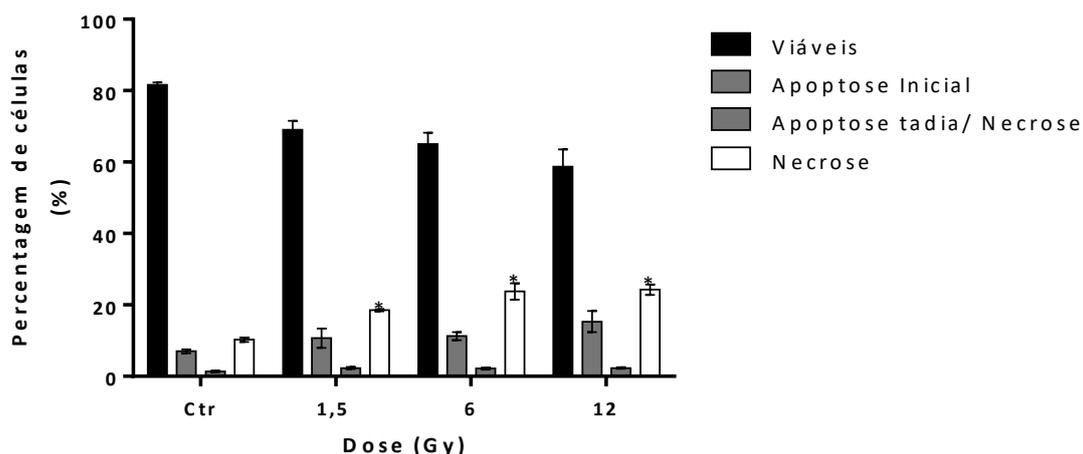


Figura 23: Tipo de morte das células da linha celular de cancro da próstata LNCaP. De forma a avaliar o tipo de morte recorreu-se à citometria de fluxo utilizando a dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo, após 48 horas da irradiação. Os gráficos representam a percentagem de células viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia/necrose e em necrose. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios independentes.

Na população de células mortas por necrose também se observou diferenças significativas entre doses, onde as células irradiadas com a dose de 1,5 Gy apresentou um valor significativamente inferior em relação à dose de 12 Gy ( $p=0,029$ ). Em relação aos outros tipos de morte celular não se observou nenhuma diferença significativa entre doses. Os resultados obtidos para a caracterização dos tipos de morte celular após irradiação encontram-se expostos na Tabela 9.

Tabela 9: Tipos de morte das células das linhas PC3 e LNCaP, 48h após a irradiação.

Dose	Linha celular	Viáveis	Apoptose Inicial	Apoptose Tardia/Necrose	Necrose
		Média±EP	Média±EP	Média±EP	Média±EP
Ctr	PC3	85,83±1,70	4,00±0,86	2,33±0,80	7,83±1,45
	LNCaP	81,67±0,67	7,00±0,58	1,40±0,25	10,25±0,63
1,5 Gy	PC3	67,00±1,32	16,50±2,19	5,17±2,18	11,33±1,02
	LNCaP	69,00±2,52	10,67±2,73	2,33±0,33	18,50±0,29*
6 Gy	PC3	62,50±1,31	19,50±2,63	7,17±1,66	12,33±1,63
	LNCaP	65,00±3,22	11,25±1,11*	2,17±0,31	23,75±2,32*
12 Gy	PC3	56,67±1,41	23,67±3,22	6,67±2,42	13,83±1,74
	LNCaP	58,67±4,91	15,33±2,96	2,33±0,21	24,25±1,44*

Legenda: Ctr=Controlo; EP=Erro padrão. Os resultados representam a percentagem de células viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia/necrose e em necrose. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios independentes. As diferenças significativas entre a linha celular LNCaP e a restante estão representadas com \* para  $p<0,05$ .

Recorrendo ao ensaio de citomorfologia (coloração May-Grünwald-Giemsa), observámos que no caso da linha celular de cancro da próstata PC3, no grupo de células não irradiadas (controlo) apresentam uma morfologia arredondada com elevada perceção do núcleo e do citoplasma, como se pode observar na Figura 24.A. Para o grupo de células irradiadas com doses mais elevadas apresentaram características de morte celular por apoptose, onde se consegue identificar, *blebs* na superfície das células, contração celular, em que a célula se torna globalmente mais pequena, o citoplasma mais denso e desidratação celular como mostra na Figura 24.B, C e D.

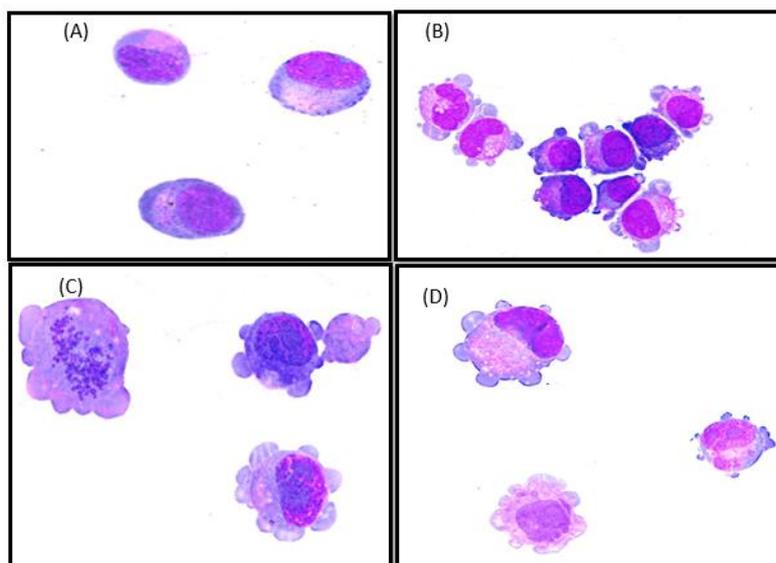


Figura 24: Avaliação das características morfológicas das células da linha celular de cancro da próstata PC3, 48 horas após exposição à radiação. Imagens representativas de esfregaços corados com May-Grünwald Giemsa. A imagem (A) representa as células controlo não irradiadas, a imagem (B) representa as células irradiadas com 1,5 Gy, a imagem (C) representa as células irradiadas com 6 Gy, a imagem (D) representa as células irradiadas com 12 Gy e a imagem. As imagens foram obtidas com uma ampliação 500x.

Em relação às células de cancro da próstata LNCaP, nas células controlo observou-se uma elevada relação entre o núcleo e o citoplasma, representado na Figura 25.A. Com o aumento da dose de radiação passou a observar-se células com alterações morfológicas que são compatíveis com a morte por necrose, como o ganho de volume celular, o intumescimento dos organelos, a rutura da membrana e, conseqüentemente, a perda do conteúdo intracelular, como mostra na Figura 25.B, C e D.

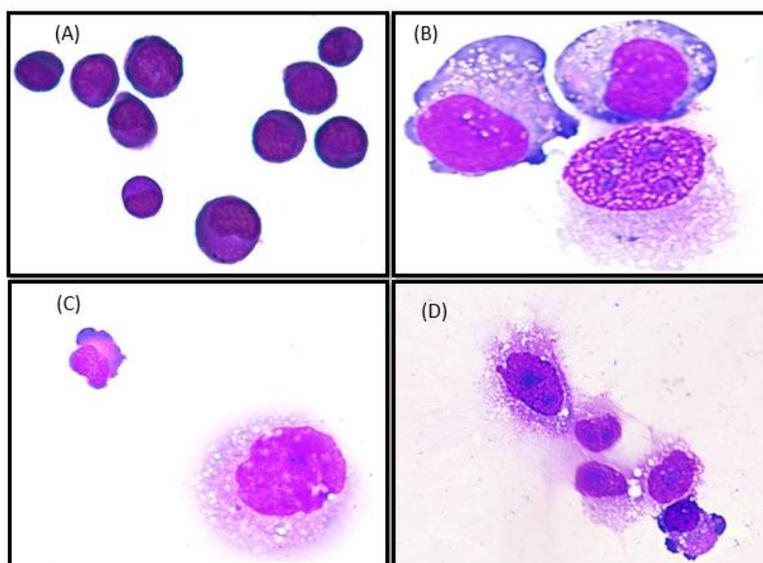


Figura 25: Avaliação das características morfológicas das células da linha celular de cancro da próstata LNCaP, 48 horas após exposição à radiação. Imagens representativas de esfregaços corados com May-Grünwald Giemsa. A imagem (A) representa as células controlo não irradiadas, a imagem (B) representa as células irradiadas com 1,5 Gy, a imagem (C) representa as células irradiadas com 6 Gy, a imagem (D) representa as células irradiadas com 12 Gy e a imagem. As imagens foram obtidas com uma ampliação 500x.

### 4.3 Stresse Oxidativo

A avaliação dos níveis de stresse oxidativo é essencial no que diz respeito aos efeitos induzidos pela radiação ionizante. Na Figura 26.A, mostra a produção intracelular basal de peróxidos, de anião superóxido, e o comportamento da defesa antioxidante glutathiona reduzida. No que concerne à produção basal de anião superóxido, representado na Figura 26.B, verificou-se que a linha PC3 apresentou um valor significativamente inferior, de  $265,00 \pm 60,12$ , quando comparado com o valor obtido para a linha LNCaP, de  $497 \pm 10,48$  ( $p=0,011$ ). Por fim, relativamente à expressão basal da GSH, representada na Figura 26.C, observámos níveis significativamente superiores na linha LNCaP, apresentando um valor de  $439,83 \pm 99,17$  ( $p=0,026$ ), quando comparado com a linha PC3, com um valor de  $180,33 \pm 55,56$ .

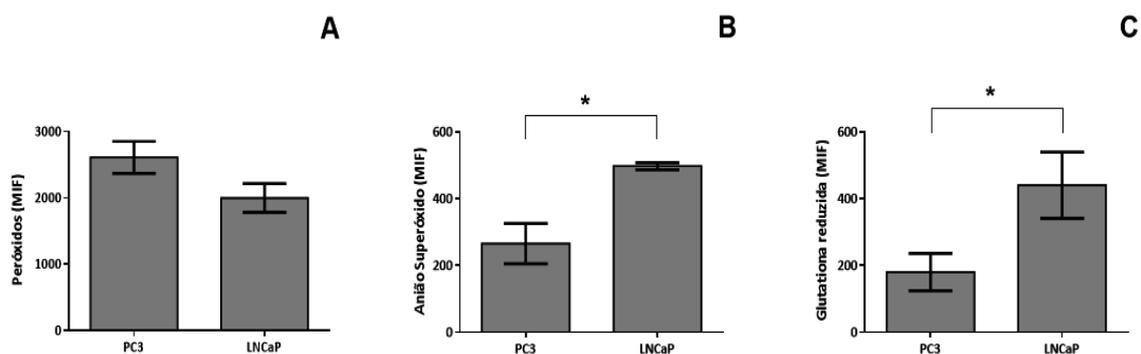


Figura 26: Avaliação o ambiente oxidativo basal. Valores basais de peróxidos (A), de anião superóxido (B) e de glutathiona reduzida (C) em média de intensidade de fluorescência (MIF) por citometria de fluxo nas células das linhas celulares PC3 e LNCaP. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes (n=3). As diferenças significativas estão representadas com \* para  $p < 0,05$ .

Para avaliar os níveis de stresse oxidativo induzido pela radiação ionizante determinou-se a produção intracelular de peróxidos, a produção de anião superóxido, e o comportamento da defesa antioxidante glutathiona reduzida, analisando a sua expressão, na linha celular do cancro da próstata PC3 e LNCaP, 48 horas após irradiação.

Na linha celular do cancro da próstata PC3, representado na Figura 27, observou-se que a produção intracelular de peróxidos foi de  $1,36 \pm 0,04$  nas células irradiadas com a dose de 1,5 Gy ( $p=0,013$ ), de  $1,46 \pm 0,04$  com a dose de 6 Gy ( $p=0,002$ ) e de  $1,66 \pm 0,06$  com a dose de 12 Gy ( $p=0,002$ ), valores significativamente superiores ao obtido para o controlo.

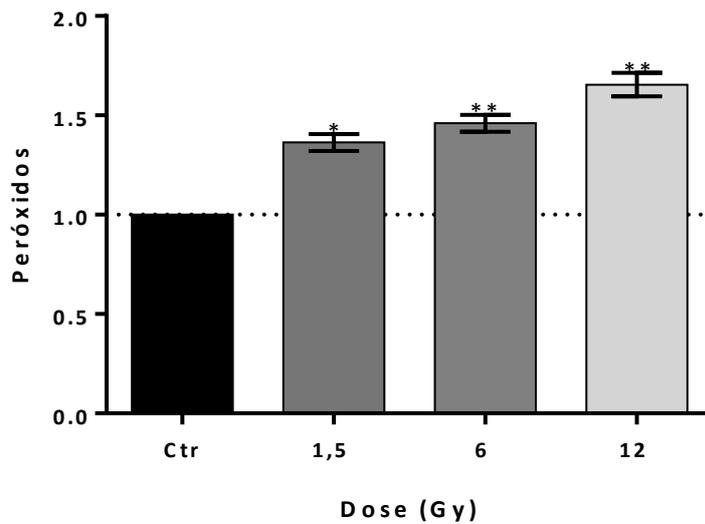


Figura 27: Produção intracelular de peróxidos das células da linha celular de cancro da próstata PC3. Através da citometria de fluxo recorrendo à marcação com a sonda específica DCFH<sub>2</sub>-DA, foi possível a análise da produção intracelular de peróxidos, após 48 horas da irradiação. Os resultados estão representados normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos 3 ensaio independentes. As diferenças significativas estão representadas com \* para  $p < 0,05$  e com \*\* para  $p < 0,01$ .

Em relação aos níveis da produção intracelular de anião superóxido, como representado na Figura 28, apenas se verificou que após irradiação com a dose de 6 Gy ( $p=0,042$ ) com o valor de  $1,09 \pm 0,03$  e de 12 Gy ( $p=0,006$ ) com o valor de  $1,12 \pm 0,01$  foram significativamente superiores em relação ao controlo.

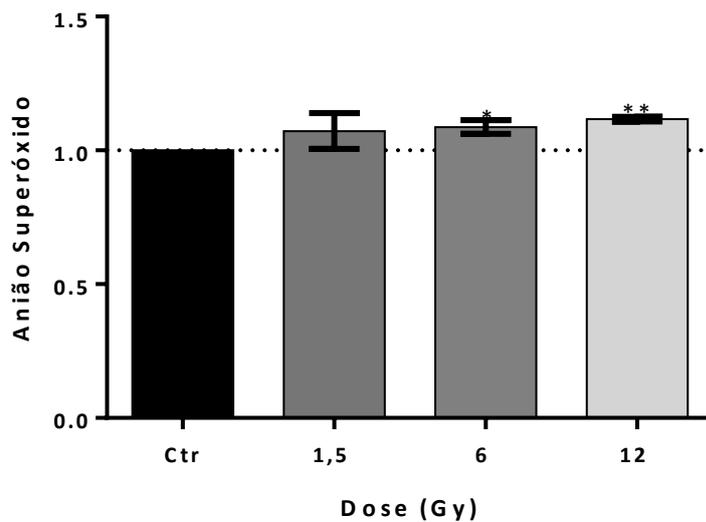


Figura 28: Produção intracelular de anião superóxido das células da linha celular de cancro da próstata PC3. Através da citometria de fluxo recorrendo à marcação com a sonda específica DHE, foi possível a análise da produção intracelular de anião superóxido, após 48 horas da irradiação. Os resultados estão representados normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos 3 ensaio independentes. As diferenças significativas estão representadas com \* para  $p < 0,05$  e com \*\* para  $p < 0,01$ .

No que diz respeito à expressão de glutathiona reduzida, representada na Figura 29 verificou-se que as células expostas à radiação ionizante com as doses de 1,5 Gy ( $p=0,028$ ) com o valor de  $0,90 \pm 0,03$  de 6 Gy ( $p=0,029$ ) com o valor de  $0,83 \pm 0,03$  e de 12 Gy ( $p=0,005$ ) com o valor de  $0,86 \pm 0,03$  foram significativamente inferiores em relação ao controlo.

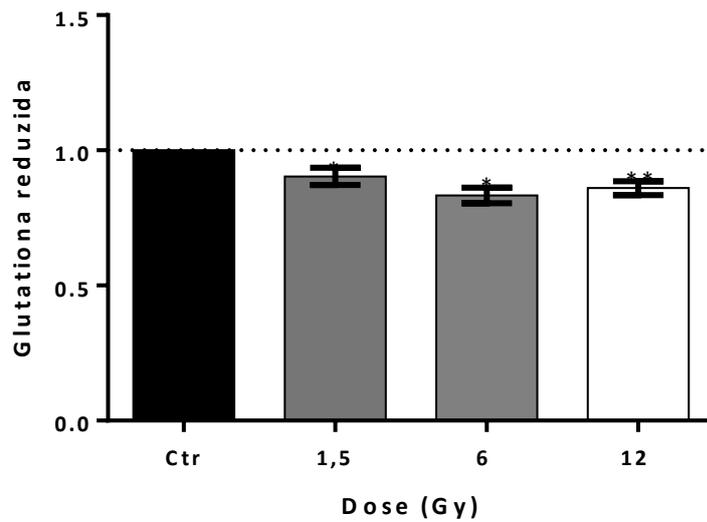


Figura 29 Expressão de glutathiona reduzida das células da linha celular de cancro da próstata PC3. Através da citometria de fluxo recorrendo à marcação com alaranjado de mercúrio, foi possível a análise da expressão da defesa antioxidante GSH, após 48 horas da irradiação. Os resultados estão representados normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos 3 ensaio independentes. As diferenças significativas estão representadas com \* para  $p < 0,05$  e com \*\* para  $p < 0,01$ .

Para a linha celular do cancro da próstata LNCaP, representado na Figura 30, a produção de peróxidos intracelulares aumentou significativamente para a população de células irradiadas com a dose de dose de 12 Gy ( $p = 0,006$ ) com um valor de  $1,2 \pm 0,03$ , em relação ao controlo.

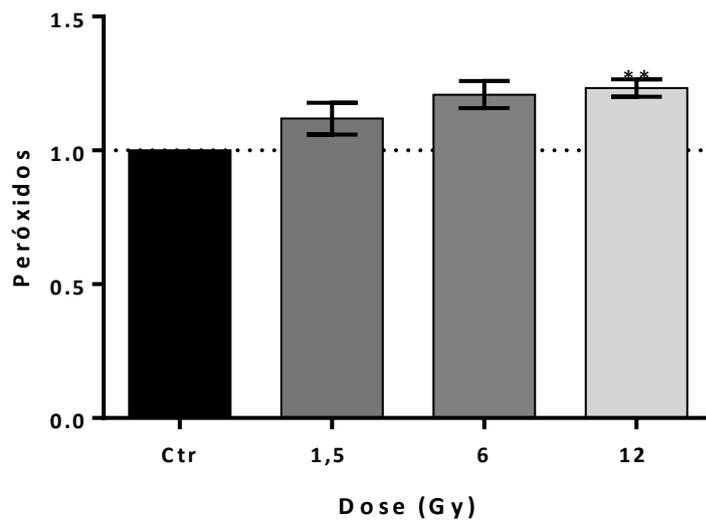


Figura 30: Produção intracelular de peróxidos das células da linha celular de cancro da próstata LNCaP. Através da citometria de fluxo recorrendo à marcação com a sonda específica DCFH<sub>2</sub>-DA, foi possível a análise da produção intracelular de peróxidos, após 48 horas da irradiação. Os resultados estão representados normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos 3 ensaio independentes. As diferenças significativas estão representadas com \*\* para  $p < 0,01$ .

A produção do anião superóxido, na linha celular do cancro da próstata LNCaP, aumentou significativamente, como mostra na Figura 31, para a população de células irradiadas com a dose 1,5 Gy ( $p=0,016$ ) com um valor de  $1,06 \pm 0,01$  e para a dose de 6 Gy ( $p=0,013$ ) apresentando um valor de  $1,14 \pm 0,02$ , em relação ao controlo.

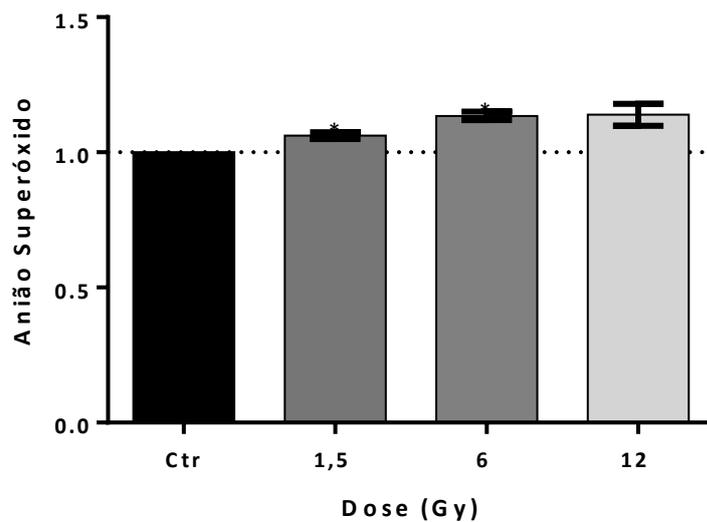


Figura 31: Produção intracelular de anião superóxido das células da linha celular de cancro da próstata LNCaP. Através da citometria de fluxo recorrendo à marcação com a sonda específica DHE, foi possível a análise da produção intracelular de anião superóxido, após 48 horas da irradiação. Os resultados estão representados normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos 3 ensaio independentes. As diferenças significativas estão representadas com \* para  $p < 0,05$ .

Quanto à expressão da glutatona reduzida, como mostra na Figura 32, não se observaram diferenças significativas em relação ao controlo, nem entre as diferentes doses.

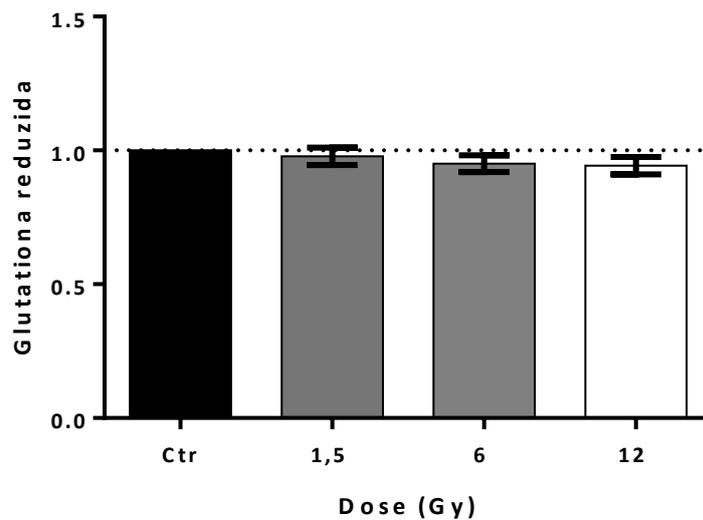


Figura 32: Expressão de glutathiona reduzida das células da linha celular de cancro da próstata LNCaP. Através da citometria de fluxo recorrendo à marcação com alaranjado de mercúrio, foi possível a análise da expressão da defesa antioxidante GSH, após 48 horas da irradiação. Os resultados estão representados normalizados ao controlo (controlo igual a 1). Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos 3 ensaio independentes.

Os resultados relativos à avaliação do stresse oxidativo após as irradiações com as várias doses encontram-se sintetizados na Tabela 10.

Tabela 10: Stresse oxidativo nas células das linhas celulares PC3 e LNCaP, 48 horas após a irradiação.

Dose	Linha celular	Peróxidos	Anião Superóxido	Glutathiona reduzida
		Média±EP	Média±EP	Média±EP
Ctr	PC3	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00
	LNCaP	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00
1,5 Gy	PC3	1,36±0,04	1,07±0,07	0,90±0,03
	LNCaP	1,12±0,06	1,06±0,01	0,98±0,03*
6 Gy	PC3	1,46±0,04	1,09±0,03	0,83±0,03
	LNCaP	1,21±0,05	1,14±0,02	0,95±0,03
12 Gy	PC3	1,66±0,06	1,12±0,01	0,86±0,03
	LNCaP	1,23±0,03	1,14±0,04	0,94±0,03

Legenda: Ctr=Controlo; EP=Erro Padrão. Os resultados estão representados em MIF, normalizados ao controlo (controlo igual a 1) e expressam a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios independentes. As diferenças significativas entre a linha celular LNCaP e a restante estão representadas com \* para  $p < 0,05$ .

## 4.4 Ciclo Celular

Para determinar os efeitos da radiação ionizante nas linhas celulares do cancro da próstata PC3 e LNCaP, analisou-se o modelo de agressão celular e cálculo da respetiva  $DL_{50}$ , a viabilidade e proliferação celular, o tipo de morte e as alterações a nível do stresse oxidativo e defesa antioxidante, revelando-se fundamental estudar o eventual efeito antiproliferativo da radiação ionizante no ciclo celular.

Na Figura 33, está representado o efeito da radiação ionizante ao nível do ciclo celular para a linha celular do cancro da próstata PC3. Para a população de células que não foi irradiada (controlo), a avaliação do ciclo celular, demonstrou uma distribuição normal do ciclo celular em que  $54,2 \pm 2,80\%$  de células na fase  $G_0/G_1$ , com  $16,6 \pm 1,47\%$  de células na fase S e com  $29,2 \pm 2,27\%$  de células na fase  $G_2/M$ . Analisando a fase  $G_0/G_1$  após a irradiação verificou-se que para as doses de 6 Gy com valores  $37,4 \pm 1,29\%$  e  $32,2 \pm 2,40\%$  e 12 Gy, diminuíram significativamente ( $p=0,029$  e  $p=0,029$ , respetivamente) em relação ao controlo. Ainda na fase  $G_0/G_1$ , se comparamos entre doses verificou-se que com a dose de 1,5 Gy obteve-se um valor de  $50,8 \pm 1,78\%$  significativamente mais elevado em relação às doses de 6 Gy ( $p=0,029$ ) e de 12 Gy ( $p=0,029$ ).

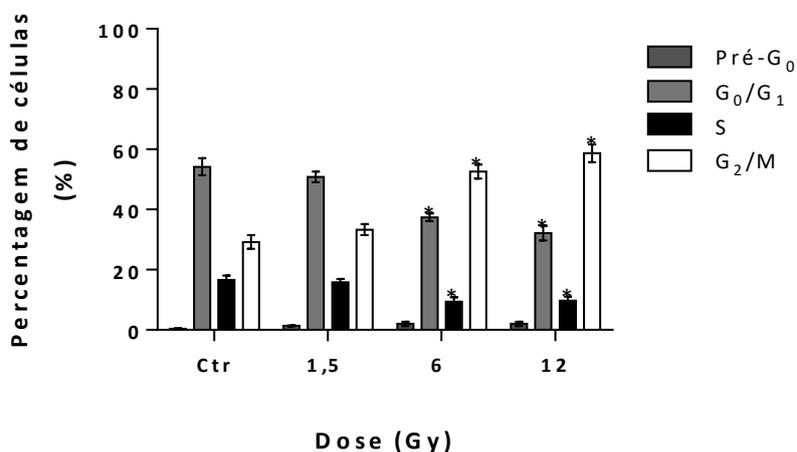


Figura 33: Ciclo celular das células da linha celular de cancro da próstata PC3. A citometria de fluxo permitiu avaliar o ciclo celular através da quantificação do DNA marcado com iodeto de propídeo. Os gráficos representam a percentagem de células nas fases pré-G<sub>0</sub>, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>/M. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com \* para  $p < 0,05$ . As comparações entre doses são descritas ao longo do texto.

Para a população em fase S, verificou-se uma diminuição significativa para as doses de 6 Gy ( $p=0,029$ ) com o valor de  $9,4\pm 1,47\%$  e de 12 Gy ( $p=0,029$ ) com o valor de  $9,7\pm 1,41\%$ , em relação ao controlo. Entre doses verificou-se que a percentagem de população em fase S, irradiada com 1,5 Gy, foi significativamente superior em relação às doses de 6 Gy ( $p=0,029$ ) e de 12 Gy ( $p=0,029$ ). As populações das células, na fase  $G_2/M$ , irradiadas com as doses de 6 Gy ( $p=0,029$ ) e de 12 Gy ( $p=0,029$ ) com valores de  $52,6\pm 2,36\%$  e de  $58,7\pm 2,99\%$  respetivamente, sofreram um aumento significativo em relação ao controlo, o valor obtido da população de células irradiadas com 1,5 Gy, na fase  $G_2/M$  foi significativamente inferior aos valores obtidos com as doses de 6 Gy ( $p=0,029$ ) e de 12 Gy ( $p=0,029$ ).

Para a linha celular do cancro da próstata LNCaP, representado na Figura 34, as células do controlo mostraram uma distribuição com  $89,8\pm 0,74\%$  de células na fase  $G_0/G_1$ , com  $4,5\pm 0,29\%$  de células para a fase S e com  $6,6\pm 0,51\%$  de células para a fase  $G_2/M$ . Analisando, em pormenor o que acontece em cada fase, observou-se que para a fase  $G_0/G_1$  as células irradiadas com as doses de 1,5 Gy com um valor de  $86\pm 0,0\%$ , de 6 Gy com um valor de  $83,3\pm 1,65\%$  e de 12 Gy com um valor de  $83,8\pm 0,63\%$ , apresentaram valores significativamente inferiores em relação ao controlo ( $p=0,008$ ,  $p=0,016$  e  $p=0,016$ , respetivamente). Entre doses, verificou-se que as células irradiadas com a dose de 1,5 Gy apresentaram um valor significativamente superior de células em fase  $G_0/G_1$  em relação aos valores das células irradiadas com a dose de 12 Gy ( $p=0,016$ ).

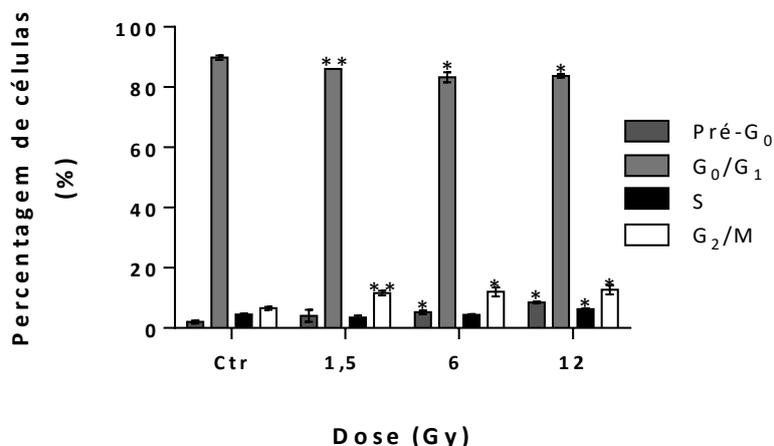


Figura 34: Ciclo celular das células da linha celular de cancro da próstata LNCaP. A citometria de fluxo permitiu avaliar o ciclo celular através da quantificação do DNA marcado com iodeto de propídeo. Os gráficos representam a percentagem de células nas fases pré-G<sub>0</sub>, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>/M. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios independentes. As diferenças significativas estão representadas com \* para  $p < 0,05$  e com \*\* para  $p < 0,01$ . As comparações entre doses são descritas ao longo do texto.

Para a população em fase S, observou-se que as células irradiadas com 12 Gy apresentaram um valor de  $6,3 \pm 0,25\%$ , significativamente superior em relação ao controlo ( $p = 0,029$ ). Entre doses verificou-se que para as células irradiadas com a dose de 1,5 Gy apresentaram um valor significativamente inferior em relação às células irradiadas com a dose de 12 Gy ( $p = 0,029$ ), na mesma fase. Observámos ainda, que as células irradiadas com a dose de 12 Gy apresentaram um valor significativamente inferior em relação ao valor obtido com a dose de 6 Gy ( $p = 0,016$ ).

Observámos um aumento significativo da percentagem das células na fase G<sub>2</sub>/M, quando irradiadas com a dose de 1,5 Gy ( $p = 0,008$ ) com um valor de  $11,6 \pm 0,75\%$ , de 6 Gy ( $p = 0,036$ ) com um valor de  $12,0 \pm 1,53\%$  e de 12 Gy ( $p = 0,036$ ) apresentando um valor de  $12,7 \pm 1,45\%$ , em relação ao valor obtido no controlo. Não se observaram diferenças significativas entre doses. Por último, o pico apoptótico aumentou significativamente para as células irradiadas com a dose de 6 Gy com um valor de  $5,3 \pm 0,63\%$  e para a dose de 12 Gy apresentando um valor de  $8,5 \pm 0,29\%$ , em relação ao valor obtido no controlo ( $p = 0,016$  e  $p = 0,016$ , respetivamente). Também se verificou que as células irradiadas com a dose de 6 Gy ( $p = 0,029$ ) apresentaram um valor significativamente inferior ao valor obtido para as células irradiadas com

a dose de 12 Gy, para o pico pré apoptótico. Os resultados relativos à avaliação do ciclo celular após irradiação encontram-se sintetizados na Tabela 11.

Tabela 11: Ciclo celular nas células das linhas celulares PC3 e LNCaP 48 h após a irradiação.

Dose	Linha celular	Pré-G <sub>0</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
		Média±EP	Média±EP	Média±EP	Média±EP
Ctr	PC3	0,4±0,25	54,20±2,80	16,60±1,47	29,20±2,27
	LNCaP	2,00±0,45	89,80±0,74	4,50±0,29	6,60±0,51
1,5 Gy	PC3	1,33±0,21	50,83±1,78	15,83±1,14	33,33±1,84
	LNCaP	4,00±2,00	86,00±0,00*	3,50±0,65*	11,60±0,75*
6 Gy	PC3	2,00±0,71	37,40±1,29	9,40±1,47	54,60±2,36
	LNCaP	5,25±0,63*	83,25±1,65*	4,40±0,25*	12,00±1,53
12 Gy	PC3	2,00±0,73	32,17±2,40	9,67±1,41	58,67±2,99
	LNCaP	8,50±0,29*	83,75±0,63*	6,25±0,25*	12,67±1,45

Legenda: Ctr=Controlo; EP= Erro Padrão. Os resultados representam a percentagem de células nas fases pré-G<sub>0</sub>, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>/M. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios independentes. As diferenças significativas entre a linha celular LNCaP e a restante estão representadas com \* para  $p < 0,05$ .



**Discussão**



O cancro da próstata é uma doença maligna, a segunda mais frequente entre homens (Daniyal *et al.*, 2014). Bubendorf *et al.* estimaram que em 35% das autópsias efetuadas a cadáveres com cancro da próstata, apresentavam metástases, dos quais 90 % eram metástases ósseas. Encontra-se igualmente descrito o surgimento de metástases nos gânglios linfáticos, que são o segundo local mais comum de metástases no cancro da próstata (Conde Moreno *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015).

A telerradioterapia de alta dose, usando técnicas modernas de modulação de intensidade e de técnicas de imagem, é um tratamento padrão para cancro da próstata localizado. Geralmente, é usado em combinação com a terapia hormonal, que inibe a sua estimulação por androgénios. Em termos de metástases, a combinação destes dois tipos de tratamentos alcança o bloqueio máximo de androgénios (Schmidt-Hansen *et al.*, 2014).

Na maioria dos casos de cancro da próstata com envolvimento de metástases, o uso de radioterapia é utilizado apenas como tratamento paliativo. A principal fonte de morbilidade em homens com esta patologia é a dor associada às metástases ósseas.

As metáteses ósseas do cancro da próstata são geralmente radiosensíveis, pelo que a maioria dos homens irá experienciar um alívio parcial ou total da dor com a radiação (Hotte e Saad, 2010). As metástases nos gânglios linfáticos de cancro da próstata, usualmente são removidas por cirurgia ou por radiocirurgia estereotáxica. A radioterapia pode ser depois utilizada para garantir que não haja reincidência do tumor, a chamada radioterapia adjuvante (Rischke *et al.*, 2015). A tomografia por emissão de positrões-tomografia computadorizada (PET-CT, do inglês *positron emission tomography-computed tomography*) é usada para delinear o tumor e assim garantir que o tratamento lhe é direcionado, preservando os tecidos saudáveis (Schick *et al.*, 2013).

Estudos que utilizem a radioterapia em doses individuais, não são muito frequentes. Ao longo dos anos, com o avançar da tecnologia e com a inovação de técnicas de imagem tridimensional e funcional, e nos aceleradores lineares torna-se fundamental avaliar os modelos que melhor se ajustam à entrega da dose de radiação. Tendo em conta todos estes avanços tecnológicos, pretendeu-se avaliar o efeito da radiação ionizante através da utilização de diferentes doses de radiação administradas em dose única. Foram feitos estudos *in vitro* com linhas celulares do cancro da próstata, onde se estudou o modelo de agressão celular que melhor se ajusta a cada tipo de cancro da próstata e avaliaram-se os efeitos na proliferação, na viabilidade celular, no tipo de morte celular, nos níveis de stresse oxidativo e no ciclo celular.

Os efeitos diretos ou indiretos da radiação ionizante foram avaliados em duas linhas

celulares do cancro da próstata PC3 e LNCaP, através da administração de doses de radiação entre os 0,5 Gy e os 12 Gy.

A perda de integridade reprodutiva e a incapacidade de proliferação são as características mais comuns de morte celular após exposição à radiação ionizante, manifestando-se como morte reprodutiva ou morte celular clonogénica. O ensaio clonogénico têm um papel essencial no estudo dos efeitos da radiação ionizante, e é o ponto de partida do estudo da radiobiologia (Djavid, Goliaie e Nikoofar, 2015). Após a realização do ensaio clonogénico, e efetuada a contagem das colónias, é possível calcular um fator que relaciona o número de colónias formadas nas condições da irradiação com as colónias obtidas no controlo, o fator de sobrevivência. Posto isto, é possível deduzir o efeito produzido pelas diferentes doses de radiação na capacidade proliferativa das células (Franken *et al.*, 2006).

Os fatores de sobrevivência das diferentes doses de radiação, obtidos do ensaio clonogénico, permitiram obter gráficos de sobrevivência celular em função da dose de radiação (FS vs. Dose). Seguidamente, foi possível obter o ajuste para cada linha celular ao modelo de agressão celular mais apropriado. Neste estudo foi utilizado o modelo linear quadrático, suportado na ideia de que várias lesões induzidas pela radiação ionizante desencadeiam uma interação entre respostas, com a finalidade de eliminar as células atingidas pela radiação (Joiner e Kogel, 2009; Mendes, 2016).

A sobrevivência celular como resposta à radiação com as doses até 12 Gy, representadas na Figura 15, apresentaram um decréscimo na sobrevivência celular nas duas linhas celulares do cancro da próstata. A dose letal média ( $DL_{50}$ ) permite comparar radiosensibilidades, e é definida como a dose com a qual metade da população celular perde viabilidade e/ou capacidade proliferativa. A linha celular do cancro da próstata PC3 apresentou uma  $DL_{50}$  de  $1,75 \pm 0,07$  Gy, e a linha celular LNCaP de  $1,68 \pm 0,03$  Gy. Estes resultados permitem-nos concluir que a linha LNCaP parece ser mais radiosensível do que a linha PC3.

O modelo linear quadrático é amplamente utilizado para descrever matematicamente os efeitos da radiação ionizante sobre o tecido normal e neoplásico. Segundo a literatura, este modelo, representa a morte celular induzida por duas ou mais ionizações, que desencadeiam quebras na dupla cadeia de DNA, onde a primeira lesão da cadeia de DNA é reparado antes da ocorrência de uma segunda lesão (McParland, 2010).

Os gráficos de sobrevivência obtidos após a exposição à radiação ionizante nos ensaios *in vitro*, não antevêm o comportamento dos tecidos como um todo, como acontece na radioterapia clínica. No entanto, a relação  $\alpha/\beta$  demonstrou ser útil para a compreensão das respostas aos diferentes regimes de fracionamento *in vivo*. Esta relação representa a dose para

a qual as componentes linear e quadrática contribuem igualmente para a morte celular, e se relaciona com as respostas imediata e tardia à radiação (Mendes, 2016).

Os gráficos de sobrevivência obtidos a partir de estudos *in vitro*, podem ser empregados para orientar a resposta clínica numa base relativa. Com base nos resultados obtidos para a sobrevivência celular, consegue-se ter uma ideia do comportamento de metástases ósseas e linfáticas do cancro da próstata em resposta à radiação ionizante. Fatores como a taxa de crescimento, o ciclo celular, a vascularização e a consequente oxigenação determinam diferentes respostas. Tendo isto em conta, é sugerido que sejam realizados estudos *in vivo* para a avaliação do isoefeito de modo a estimar a razão  $\alpha/\beta$  e a calcular a dependência da dose (Garcia, Wilkins e Raaphorst, 2007; Mendes, 2016).

A irradiação também demonstrou induzir uma inibição significativa da proliferação celular nestas duas linhas celulares do cancro da próstata. A proliferação foi avaliada indiretamente através de dois ensaios, a pesquisa do azul tripano e do Ki-67, em que o primeiro avalia a integridade da membrana celular e o segundo informa-nos sobre a capacidade proliferativa das células em estudo. Observou-se que o efeito anti proliferativo da radiação ionizante variou com a dose e com o tempo, ainda que este efeito fosse maior na linha celular do cancro da próstata PC3, como mostra na Figura 18. Pela pesquisa de Ki-67 podemos afirmar que, para ambas as linhas, nas doses de radiação mais altas, a radiação ionizante induziu quiescência celular. Isto verificou-se, uma vez que a proteína nuclear Ki-67 não se encontra presente na fase  $G_0$  do ciclo celular, fase na qual a maioria das células se encontram, como representado nas Figura 20 e Figura 21 (Jalava *et al.*, 2006).

A radiação ionizante induziu alterações na proliferação e na viabilidade celular dependente da dose, do tempo e do tipo de linha celular. As duas linhas celulares apresentam diferentes sensibilidades à radiação ionizante, que podem ser explicadas por serem obtidas de tumores com características moleculares e fenotípicas diferentes.

A análise da viabilidade celular, através de citometria de fluxo com dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo, mostrou que em ambas as linhas celulares existiu uma diminuição da viabilidade, que conseqüentemente levou ao aumento da morte celular. Resultados concordantes com o previamente observado com o azul de tripano.

Para a linha celular do cancro da próstata PC3 verificou-se que esta morte ocorreu maioritariamente por apoptose, como mostra na Figura 22. Por outro lado, na linha celular LNCaP o tipo de morte principal foi por necrose, representado na Figura 23.

A radioterapia, como a maioria dos tratamentos anticancerígenos, atinge o seu efeito terapêutico ao induzir diferentes tipos de morte celular. Contudo, não consegue aniquilar

células cancerígenas de imediato, podendo este processo demorar dias ou semanas de tratamento até que se verifique a sua morte. A morte celular pode ocorrer por apoptose, necrose, catástrofe mitótica, ou até por autofagia. A morte por apoptose ou por catástrofe mitótica parecem ser os dois principais mecanismos na morte de células irradiadas com radiação ionizante (Baskar *et al.*, 2012; Mendes, 2016). De acordo com os resultados com a dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo, observámos diferenças no tipo de morte mais frequente entre as linhas celulares de cancro da próstata PC3 e LNCaP. Este facto demonstra que os perfis moleculares poderão ter um papel importante na resposta celular à radioterapia. A necrose ocorre quando a célula sofre lesões graves, devido a agentes externos tóxicos, ausência de oxigénio e também exposição a radiação ionizante. Neste tipo de morte, as mitocôndrias são danificadas, não ocorrendo a morte por apoptose, a célula intumescer e acaba por se romper a membrana celular. O conteúdo celular é libertado para o meio extracelular, onde acaba por atrair moléculas do sistema imunitário, causando inflamação nesta região (Yoshimura e Okuno, 2010).

Através da observação das características morfológicas das células foi possível corroborar os dados obtidos anteriormente, onde na linha celular do cancro da próstata PC3 se observou a formação de *blebs*, desintegração do núcleo em fragmentos envoltos pela membrana nuclear, condensação da cromatina nuclear, traços característicos de morte por apoptose, como mostra na Figura 24.B, C e D. Contrariamente, na linha celular do cancro da próstata LNCaP os traços característicos observados correspondem a morte por necrose, mais concretamente à observação da perda da integridade membranar e do conteúdo intracelular, Figura 25.B, C e D.

A radiação ionizante também é capaz de provocar lesões em macromoléculas importantes da célula indiretamente, através da radiólise da água. A radiólise induz a produção de espécies reativas de oxigénio, que por sua vez são capazes de lesar macromoléculas importantes na célula. Neste estudo, após exposição à radiação observou-se que para as duas linhas celulares do cancro da próstata houve um aumento dos níveis de peróxidos e do anião superóxido.

As espécies reativas de oxigénio têm um papel importante em muitos processos fisiológicos, tais como: crescimento celular, diferenciação, proliferação, sinalização e senescência, assim como, em processos patológicos (Kim *et al.*, 2015). Certos estudos sugerem que estas espécies estão envolvidas de certa forma na indução de apoptose. Também apresentam uma grande capacidade citotóxica, pois são capazes de provocar lesões nas células através da peroxidação de lípidos, quebrar a cadeia dupla de DNA e oxidar aminoácidos

(Antognelli *et al.*, 2014). As espécies reativas de oxigénio ainda podem ativar diretamente a permeabilidade mitocondrial com consequente perda do seu potencial de membrana e induzindo morte celular por apoptose (Mendes, 2016).

Neste trabalho, ambas as linhas celulares do cancro da próstata apresentaram um aumento significativo dos níveis de stresse oxidativo, tanto de peróxidos como do anião superóxido. Na expressão da glutathiona reduzida observou-se que com o aumento da dose houve uma diminuição significativa dos níveis desta proteína na linha PC3, que se verificou ser significativamente inferior em relação à linha LNCaP, na dose de 1,5 Gy (Tabela 10). Estes resultados sugerem que este tripeptídeo foi consumido na tentativa de eliminação das espécies reativas de oxigénio produzidas. Houve um desequilíbrio no ambiente oxidativo celular, com o aumento dos níveis das espécies reativas de oxigénio e a diminuição da expressão da GSH. Com estes resultados podemos concluir que houve a indução de stresse oxidativo provocado pela radiação ionizante, e consequente morte celular.

A radiação ionizante induz a quebra da dupla cadeia de DNA que é a forma mais prejudicial de lesão de DNA. Um dos mecanismos que as células desenvolveram para sinalizar e reparar a lesão foi o atraso, ou mesmo o bloqueio da progressão do ciclo celular, principalmente nas fases G<sub>1</sub>/S, S e G<sub>2</sub>/M (Noguchi e Gadaleta, 2014). Se a célula conseguir reparar a lesão no DNA, o ciclo celular prossegue, contudo se o erro for irreparável a célula pode iniciar o processo de morte celular programada (Santivasi e Xia, 2014). A fase G<sub>2</sub>/M mostra ser a fase mais radiosensível, por outro lado a fase S é a mais radioresistente. A fase G<sub>1</sub> apresenta níveis intermédios de radiosensibilidade (Scott *et al.*, 2004).

O processo de tumorigénese induz múltiplas alterações genéticas que alteram a regulação de vias de sinalização, como as envolvidas nos pontos de controlo do ciclo celular. O cancro da próstata é caracterizado por alterações genéticas que afetam estas vias e lhe confere vantagem proliferativa (Scott *et al.*, 2004).

A linha celular do cancro da próstata LNCaP é caracterizada por apresentar P53 *wild-type*, e o inibidor da cinase dependente de ciclina 1 (P21) (CDKN1 (P21), do inglês *cyclin-dependent kinase Inhibitor 1 (P21)*), mas apresenta baixa expressão do regulador do ciclo celular, o inibidor da cinase dependente de ciclina 2 (P16) (CDKN2 (P16), do inglês *cyclin-dependent kinase Inhibitor 2 (P16)*), e sobreexpressão do gene anti apoptótico *BCL2*. A linha celular do cancro da próstata PC3 tem uma grande diferença em relação à linha LNCaP, não apresentando a proteína P53. Também tem diferenças na CDKN2 (P16), pois encontra-se na forma mutada, e apresenta baixos níveis da expressão de CDKN1 (P21) (Scott *et al.*, 2004).

No trabalho desenvolvido, na linha celular do cancro da próstata PC3 observou-se um

aumento significativo da população de células em fase G<sub>2</sub>/M, com o aumento da dose de radiação ionizante, e conseqüente uma diminuição significativa na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Esta ocorrência pode dever-se ao facto desta linha não apresentar a proteína P53, e assim não ser capaz de induzir o bloqueio do ciclo celular na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, para que a célula consiga reparar a lesão no DNA antes da replicação do DNA. Verificou-se ainda o surgimento de um pico apoptótico, geralmente designado por pré-G<sub>0</sub>, após irradiação, o que vem corroborar, o tipo de morte observado a apoptose, o principal tipo de morte para esta linha celular. Por outro lado, na linha celular LNCaP observou-se que com o aumento da dose de radiação houve um aumento significativo de percentagem de células na fase G<sub>2</sub>/M, em relação ao controlo. Contudo, independentemente da dose, a maioria das células encontram-se na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Este facto pode ser explicado pela circunstância de esta linha apresentar a proteína P53 *wild-type*, como anteriormente mencionado esta proteína está envolvida na indução do bloqueio na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> do ciclo celular.

## **Conclusão e Perspetivas Futuras**



Com a realização deste trabalho foi possível avaliar alterações celulares e moleculares induzidas pela radiação ionizante em linhas celulares de cancro da próstata PC3 e LNCaP. As células foram expostas a diferentes doses de radiação de 0,5 Gy a 12 Gy, de forma a avaliar os seus efeitos a nível da viabilidade e da proliferação celular, na sobrevivência celular, nos tipos de morte, nas alterações no ciclo celular e nas alterações dos níveis de stresse oxidativo.

Observou-se que a radiação ionizante tem um efeito antiproliferativo e citotóxico para as células em estudo, sendo dependente da dose e do tempo.

O ensaio clonogénico permitiu avaliar a longo prazo o efeito da radiação ionizante nas linhas celulares PC3 e LNCaP, onde se observou uma redução na sobrevivência celular de modo dependente da dose. A linha celular LNCaP mostrou uma maior radiosensibilidade comparada com a linha celular PC3. As duas linhas comportaram-se de acordo com o mesmo modelo de agressão celular, modelo linear quadrático.

O tipo de morte celular preferencial, 48 horas após exposição à radiação ionizante, demonstrou ser por apoptose na linha PC3, e por necrose na linha LNCaP. Em relação ao ciclo celular houve alteração na linha PC3, onde o ciclo foi bloqueado na fase  $G_2/M$ . Na linha LNCaP também houve um bloqueio do ciclo celular na fase  $G_2/M$ , contudo a maioria das células encontravam-se na fase  $G_0/G_1$ .

A radiação ionizante induziu stresse oxidativo nas duas linhas celulares de cancro da próstata. Observou-se o aumento dos níveis de peróxido e anião superóxido. A expressão da defesa antioxidante GSH, mostrou uma diminuição para ambas as linhas, contribuindo assim para o stresse oxidativo.

Posto isto, é possível concluir que as linhas celulares apresentam mecanismos moleculares distintos em resposta à exposição de radiação ionizante, ou seja, os perfis moleculares e celulares são determinantes para a compreensão da resposta celular à radiação ionizante.

É essencial perceber a interação complexa entre células em morte e o seu microambiente. Tendo isto em vista, podemos entrar numa mudança de paradigma na interpretação da resposta à radioterapia nos doentes com cancro.

Nos estudos *in vitro*, o modelo de irradiação forma uma plataforma otimizada, permitindo a continuação desta investigação. O próximo passo seria o estabelecimento de culturas primárias a partir de biopsias representativas desta patologia tendo em vista o estudo, usando co-culturas, das interações entres estas células na circunstância da radioterapia.



## **Bibliografia**



- AARON, La Tayia; FRANCO, Omar E.; HAYWARD, Simon W. - Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. **Urologic Clinics of North America**. 43:3 (2016) 279–288. doi: 10.1016/j.ucl.2016.04.012.
- ABOUZEID, Abraham H.; TORCHILIN, Vladimir P. - The role of cell cycle in the efficiency and activity of cancer nanomedicines. **Expert Opinion on Drug Delivery**. 10:6 (2013) 775–86. doi: 10.1517/17425247.2013.776538.
- AICHINGER H, DIERKER J, JOITE-BARFUSS , Säbel M. - Production and Measurement of X-Rays. Em HEIDELBERG, SPRINGER-VERLAG BERLIN (Ed.) - **Radiation Exposure and Image Quality in X-Ray Diagnostic Radiology**. Second ed. p. 13–20.
- AMERICAN CANCER SOCIETY - **Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition**. 3. ed. New York : American Cancer Society, 2016
- ANTOGNELLI, Cinzia *et al.* - Reactive oxygen species induce apoptosis in bronchial epithelial BEAS-2B cells by inhibiting the Antiglixylation glyoxalase I Defence: involvement of superoxide anion, hydrogen peroxide and NF- $\kappa$ B. **Apoptosis**. 19:1 (2014) 102–116. doi: 10.1007/s10495-013-0902-y.
- AZZAM, Edouard I.; JAY-GERIN, Jean Paul; PAIN, Debkumar - Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. **Cancer Letters**. 327:1–2 (2012) 48–60. doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.012.
- BAKIU, Erjona *et al.* - Comparison of 3D CRT and IMRT tratment plans. **Acta Informatica Medica**. . ISSN 03538109. 21:3 (2013) 211–212. doi: 10.5455/aim.2013.21.211-212.
- BALK, Steven; KO, Yoo-Joung; BUBLEY, Glenn J. - Biology of Prostate-Specific Antigen. **Journal of Clinical Oncology**. 21:2 (2003) 27–33. doi: 10.1016/S0090-4295(03)00775-1.
- BARNUM, Kevin J.; O'CONNELL, Matthew J. - Cell Cycle Regulation by Checkpoints. Em PRESS, HUMANA (Ed.) - **Cell Cycle Control**. New York : v. 1170. p. 29–40.
- BARTEK, Jiri; LUKAS, Claudia; LUKAS, Jiri - Checking on DNA damage in S phase. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 5:10 (2004) 792–804. doi: 10.1038/nrm1493.
- BASKAR, R. *et al.* - Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. **Internacional Journal of Medical Sciences**. 9:3 (2012) 193–199. doi: 10.7150/ijms.3635.
- BEYZADEOGLU, Murat; OZYIGIT, Gokhan; SELEK, Ugur - **Radiation Oncology: A MCQ and Case Study-Based Review**. 1st. ed. New York
- BIRBEN, Esra *et al.* - Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization Journal**. 5:1 (2012) 9–19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
- BRAY, Freddie *et al.* - Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **International Journal of Cancer**. 132:5 (2013) 1133–1145. doi: 10.1002/ijc.27711.
- BUMP, Edward A.; BROWN, J.Martin - Role of glutathione in the radiation response of mammalian cells invitro and in vivo. **Pharmacology and Therapeutics**. 47:1 (1990) 117–136. doi: 10.1016/0163-7258(90)90048-7.
- CANALICHIO, Katie; JABER, Yasmeen; WANG, Run - Surgery and hormonal treatment for prostate cancer and sexual function. **Translational Andrology and Urology**. 4:2 (2015) 103–9. doi: 10.3978/j.issn.2223-4683.2015.01.13.
- CASTEDO, Maria *et al.* - Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**. 23:16 (2004) 2825–2837. doi: 10.1038/sj.onc.1207528.

CATALONA, William J. *et al.* - Comparison of Digital Rectal Examination and Serum Prostate Specific Antigen in the Early Detection of Prostate Cancer: Results of a Multicenter Clinical. **Journal of Urology**. 197:2 (2017) 200–207. doi: 10.1016/j.juro.2016.10.073.

CHATTERJEE, Anupam - Reduced Glutathione: A Radioprotector or a Modulator of DNA-Repair Activity? **Nutrients**. 5:2 (2013) 525–542. doi: 10.3390/nu5020525.

CONDE MORENO, Antonio José *et al.* - Oligometastases in prostate cancer: restaging stage IV cancers and new radiotherapy options. **Radiation Oncology**. 9:2014) 258–271. doi: 10.1186/s13014-014-0258-7.

CUPERTINO, Alenice; ÂNGELA, Marta; GATTI, Reynaldo M. - Estudo Retrospectivo das Reações Adversas e Interações Medicamentosas na Quimioterapia no Tratamento do Câncer de Mama: Relato de Caso. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. 6:17 (2008) 26–36.

DALL'ERA, Marc A. *et al.* - Active surveillance for Early-stage Prostate Cancer: Review of the Current Literature. **Cancer**. 112:8 (2008) 1650–1659. doi: 10.1002/cncr.23373.

DANIYAL, Muhammad *et al.* - Epidemiology , Etiology , Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. 15:22 (2014) 9575–9578. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.22.95755.

DJAVID, Gholamreza Esmaeli; GOLIAIE, Bahram; NIKOOFAR, Alireza - Analysis of Radiomodulatory Effect of Low-Level Laser Irradiation by Clonogenic Survival Assay. **Photomedicine and Laser Surgery**. 33:9 (2015) 452–459. doi: 10.1089/pho.2015.3893.

DODSON, Helen; WHEATLEY, Sally P.; MORRISON, Ciaran G. - Involvement of Centrosome Amplification in Radiation-Induced Mitotic Catastrophe. **Cell Cycle**. 6:3 (2007) 364–370. doi: 10.4161/cc.6.3.3834.

EDGE, Stephen B.; COMPTON, Carolyn C. - The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. **Annals of Surgical Oncology**. 17:6 (2010) 1471–1474. doi: 10.1245/s10434-010-0985-4.

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

EPSTEIN, Jonathan I. *et al.* - A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. **European Urology**. 69:3 (2016) 428–435. doi: 10.1016/j.eururo.2015.06.046.

FERLAY, Jacques *et al.* - Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**. 136:5 (2015) 359–386. doi: 10.1002/ijc.29210.

FRANCO, Joana Sofia Cadilha - **Análise do Polimorfismo rs266882 no Gene KLK3 por PCR-RFLP em Casos de Diagnóstico de Adenocarcinoma da Próstata**. : Escola Superior de Saúde Egas Moniz, 2015

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

GARCIA, Lourdes M.; WILKINS, David E.; RAAPHORST, Gijsbert P. -  $\alpha/\beta$  ratio: A Dose Range Dependence Study. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**. 67:2 (2007) 587–593. doi: 10.1016/j.ijrobp.2006.10.017.

GIVAN, Alice Longobardi - **Flow Cytometry: First Principles**. New York

GORGULHO, Alessandra A.; SALLES, Antônio A. F. De - Gamma Knife radiosurgery : Introduction and technical aspects. Em **Neuromodulation in Psychiatric**. New York : Springer, 2016. p. 353–367.

HAN, Wei; YU, Kwan Ngok - Response of Cells to Ionizing Radiation. **Advances in Biomedical Sciences and Engineering**. 2009) 204–262. doi: 10.2174/978160805040610901010204.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. - Hallmarks of cancer: The Next Generation. **Cell**. 144:5 (2011) 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

HARASHIMA, Hirofumi; DISSMEYER, Nico; SCHNITTGER, Arp - Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. **Trends in Cell Biology**. 23:7 (2013) 345–356. doi: 10.1016/j.tcb.2013.03.002.

HEGEMANN, Nina-sophie *et al.* - Hypofractionated radiotherapy for prostate cancer. **Radiation oncology**. 9:1 (2014) 275–289. doi: 10.1186/s13014-014-0275-6.

HEIDENREICH, A. *et al.* - Guidelines on Prostate Cancer. **European Association of Urology**. 53:1 (2008) 68–80. doi: 10.1016/j.eururo.2007.09.002.

HELLSTROM, Wayne J. G. - **Male Infertility and Sexual Dysfunction**. New Orleans : Springer Science+Business Media New York, 1997

HELPAP, Burkhard *et al.* - The Significance of Accurate Determination of Gleason Score for Therapeutic Options and Prognosis of Prostate Cancer. **Pathology and Oncology Research**. 22:2 (2015) 349–356. doi: 10.1007/s12253-015-0013-x.

HINGORANI, Ravi *et al.* - **Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerse™ System**. San Jose

HIRATA, Yoshito; BRUCHOVSKY, Nicholas; AIHARA, Kazuyuki - Development of a mathematical model that predicts the outcome of hormone therapy for prostate cancer. **Journal of Theoretical Biology**. 264:2 (2010) 517–527. doi: 10.1016/j.jtbi.2010.02.027.

HJELMBORG, Jacob B. *et al.* - The Heritability of Prostate Cancer in the Nordic Twin Study of Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**. 23:11 (2014) 2303–2310. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0568.

HÖCHT, Stefan *et al.* - Hypofractionated radiotherapy for localized prostate cancer. **Strahlentherapie und Onkologie**. 193:1 (2017) 1–12. doi: 10.1007/s00066-016-1041-5.

HOTTE, Sebastien J.; SAAD, F. - Current management of castrate-resistant prostate cancer. **Current Oncology**. 17:2 (2010) 72–79. doi: 10.3747/co.v17i0.718.

IGNEY, Frederik H.; KRAMMER, Peter H. - Death and Anti-Death: Tumour Resistance To Apoptosis. **Nature Reviews Cancer**. 2:4 (2002) 277–288. doi: 10.1038/nrc776.

JALAVA, P. *et al.* - Ki67 immunohistochemistry: A valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: Proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index. **Histopathology**. 48:6 (2006) 674–682. doi: 10.1111/j.1365-2559.2006.02402.x.

JOINER, Michael; KOGEL, Albert Van Der - **Basic Clinical Radiobiology**. 4th. ed. London : Hodder Arnold, 2009

KIM, K. S. *et al.* - Reactive oxygen species-activated nanomaterials as theranostic agents. **Nanomedicine**. 10:17 (2015) 2709–2723. doi: 10.2217/nnm.15.108.

- KROEMER, G. *et al.* - Classification of Cell Death 2009. **Cell death and differentiation**. 16:1 (2009) 3–11. doi: 10.1038/cdd.2008.150.
- KUMAR, V. L.; MAJUMDER, P. K. - Prostate gland: Structure, functions and regulation. **International Urology and Nephrology**. 27:3 (1995) 231–243. doi: 10.1007/BF02564756.
- LAVERY, Anita; KIRBY, Roger S.; CHOWDHURY, Simon - Prostate cancer. **Medicine**. 44:1 (2016) 47–51. doi: 10.1016/j.mpmed.2015.10.001.
- LIMA, J. J. Pedroso De - **Biofísica Médica**. 2.<sup>a</sup> ed. Coimbra : Coimbra, Imprensa da Universidade de, 2005
- LOPES, Catarina Isabel Isidoro - **Ação do Licopeno na Prevenção e Tratamento do Cancro da Próstata**. [S.l.] : Universidade de Coimbra, 2014
- LUMEN, Nicolaas *et al.* - Developments in external beam radiotherapy for prostate cancer. **Urology**. 82:1 (2013) 5–10. doi: 10.1016/j.urology.2013.03.043.
- MARQUES, Inês Alexandra Figueira - **Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudos dos mecanismos de atuação**: Universidade de Coimbra, 2016
- MARZO, Angelo M. DE *et al.* - Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**. 7:4 (2007) 256–269. doi: 10.1038/nrc2090.
- MATOS, C. S. *et al.* - New Strategies Against Prostate Cancer – Pt(II)-Based Chemotherapy. **Current Medicinal Chemistry**. 19:27 (2012) 4678–4687. doi: 10.2174/092986712803306394.
- MCNEAL, John E. - The zonal anatomy of the prostate. **The Prostate**. 2:1 (1981) 35–49. doi: 10.1002/pros.2990020105.
- MCPARLAND, Brian - **Nuclear Medicine Radiation Dosimetry: Advanced Theoretical Principles**. 1st. ed. London : Springer-Verlag London, 2010
- MENDES, Fernando - **Caracterização celular e molecular dos efeitos da radiação em neoplasias. Estudo experimental em linfoma e carcinoma do pulmão de pequenas células**: Universidade de Coimbra, 2016
- MERSCH, Jacqueline *et al.* - Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian. **Cancer**. 121:2 (2015) 269–275. doi: 10.1002/cncr.29041.
- MONTEIRO, Pedro Gomes - Terapêutica e Seguimento do Carcinoma da Próstata. **Acta Urológica**. 23:3 (2006) 89–92.
- MOON, Dominic H.; EFSTATHIOU, Jason A.; CHEN, Ronald C. - What is the best way to radiate the prostate in 2016? **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. 35:2 (2017) 59–68. doi: 10.1016/j.urolonc.2016.06.002.
- MOREIRA, Almeida - **Radiobiologia – efeito das radiações ionizantes na célula – e formas de proteção das radiações ionizantes**: Universidade da Beira Interior, 2011
- MOTTET, Nicolas *et al.* - EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. **European urology**. . ISSN 1873-7560. August (2016) 1–12. doi: 10.1016/j.eururo.2016.08.003.
- MOYER, Virginia A. - Screening for Prostate Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. **Annals of Internal Medicine**. 157:2 (2012) 120–135. doi: 10.7326/0003-4819-157-2-201207170-00459.
- MYDLO, J. H.; GODEC, C. J. - **Prostate Cancer: Science and Clinical Practice**. 2nd. ed. San Diego :

Press, American, 2015

NIGG, E. - Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. **BioEssays**. 17:6 (1995) 471–480. doi: 10.1002/bies.950170603.

NOGUCHI, Eishi; GADALETA, Mariana C. - **Cell Cycle Control**. 2. ed. London : Press, Humana, 2014

PAGE, Ray; TAKIMOTO, Chris - Principles of Chemotherapy. Em **Cancer Management: A Multidisciplinary Approach**. 13. ed. New York : UBM Medica, 2008v. 2. p. 55–65.

PARKER, C. - Locally advanced prostate cancer: Pro-radiation. **Crit Rev Oncol Hematol**. 78:(2011) S14–S15.

PASACHOFF, Naomi - **Marie Curie and the science of radioactivity**. New York : Oxford University Press, 1996. ISBN 0195092147.

PINA, Francisco *et al.* - Prostate cancer incidence and mortality in Portugal: trends, projections and regional differences. **European Journal of Cancer Prevention**. 0:0 (2016) 1–7. doi: 10.1097/CEJ.0000000000000285.

POZAROWSKI, Piotr; DARZYNKIEWICZ, Zbigniew - Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. **Methods in Molecular Biology**. 281:2 (2004) 301–311. doi: 10.1385/1-59259-811-0:301.

PRINS, G. S. - What is the prostate and what are its functions? Em **Handbook of Andrology**. 2. ed. Kansas : The American Society of Andrology, 2010. p. 1–8.

RABENDER, CS; ALAM, A.; MIKKELSEN, RB - Ionizing Radiation Induced Nitric Oxide Signaling. **Austin Journal of Nuclear Medicine and Radiotherapy**. 1:1 (2014) 1–5.

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

RAMON, J.; DENIS, L. J. - **Prostate Cancer**. New York : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007

RAY, K. J.; SIBSON, N. R.; KILTIE, A. E. - Treatment of Breast and Prostate Cancer by Hypofractionated Radiotherapy: Potential Risks and Benefits. **Clinical Oncology**. 27:7 (2015) 420–426. doi: 10.1016/j.clon.2015.02.008.

RICCARDI, Carlo; NICOLETTI, Ildo - Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**. 1:3 (2006) 1458–1461. doi: 10.1038/nprot.2006.238.

RISCHKE, Hans Christian *et al.* - Adjuvant radiotherapy after salvage lymph node dissection because of nodal relapse of prostate cancer versus salvage lymph node dissection only. **Strahlenther Onkol**. 191:4 (2015) 310–320. doi: 10.1007/s00066-014-0763-5.

RODRIGUES, Manuel António Lopes - **Qualidade de vida e satisfação com os cuidados recebidos pelas doentes com carcinoma da mama em tratamento com quimioterapia por via endovenosa**: Instituto de Ciências Biomeidcas de Abel Salazar - Universidade do Porto, 2007

RONINSON, Igor B.; BROUDE, Eugenia V.; CHANG, Bey-Dih - If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. **Drug Resistance Updates**. 4:5 (2001) 303–313. doi: 10.1054/drup.2001.0213.

RUSSELL, Pamela; KINGSLEY, Elizabeth - Human Prostate Cancer Cell Lines. **Methods in Molecular Medicine: Prostate Cancer Methods & Protocols**. 81:12 (2003) 21–39. doi: 10.1385/1-59259-372-0:21.

SALES, Tiago Luís Folgado - **Efeitos da radiação ionizante em linhas celulares de cancro do pulmão de não pequenas células : estudos in vitro**: Universidade de Coimbra, 2014

- SANTIVASI, Wil L.; XIA, Fen - Ionizing Radiation-Induced DNA Damage, Response, and Repair. **Antioxidants & Redox Signaling**. 21:2 (2014) 251–259. doi: 10.1089/ars.2013.5668.
- SCHICK, Ulrike *et al.* - Androgen deprivation and high-dose radiotherapy for oligometastatic prostate cancer patients with less than five regional and/or distant metastases. **Acta oncologica (Stockholm, Sweden)**. 52:8 (2013) 1622–8. doi: 10.3109/0284186X.2013.764010.
- SCHMIDT-HANSEN, M. *et al.* - Hormone and Radiotherapy versus Hormone or Radiotherapy Alone for Non-metastatic Prostate Cancer: A Systematic Review with Meta-analyses. **Clinical Oncology**. 26:10 (2014) 21–46. doi: 10.1016/j.clon.2014.06.016.
- SCOTT, Susan L. *et al.* - Survival and cell cycle kinetics of human prostate cancer cell lines after single- and multifraction exposures to ionizing radiation. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**. 59:1 (2004) 219–227. doi: 10.1016/j.ijrobp.2004.01.027.
- SEO, Hyun Ju *et al.* - Comparison of robot-assisted radical prostatectomy and open radical prostatectomy outcomes: A systematic review and meta-analysis. **Yonsei Medical Journal**. 57:5 (2016) 1165–1177. doi: 10.3349/ymj.2016.57.5.1165.
- SHINJI KARIYA - Radiation Therapy for Prostate Cancer. Em **Advances in Prostate Cancer**. Rijeka : InTech, 2013. p. 117–143.
- SIES, Helmut - Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**. 4:(2015) 180–183. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002.
- SMITTENAAR, C. R. *et al.* - Cancer incidence and mortality projections in the UK until 2035. **British journal of cancer**. . ISSN 1532-1827. 115:9 (2016) 1147–1155. doi: 10.1038/bjc.2016.304.
- SOBECKI, Michal *et al.* - The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. **eLife**. 5:MARCH2016 (2016) 1–33. doi: 10.7554/eLife.13722.
- SØRENSEN, Claus Storgaard *et al.* - Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. **Cancer Cell**. 3:3 (2003) 247–258. doi: 10.1016/S1535-6108(03)00048-5.
- STROBER, W. - Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**. Appendix 3:B (2001) 1–2. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.
- SZULKIN, Robert *et al.* - Estimating Heritability of Prostate Cancer-Specific Survival Using Population-Based Registers. **The Prostate**. 77:8 (2017) 900–907. doi: 10.1002/pros.23344.
- TOSOIAN, Jeffrey J. *et al.* - Active Surveillance Program for Prostate Cancer: An Update of the Johns Hopkins Experience. **Journal of Clinical Oncology**. 29:16 (2011) 2185–2190. doi: 10.1200/JCO.2010.32.8112.
- TURKBEBY, B.; PINTO, P. A.; CHOYKE, P. L. - Imaging techniques for prostate cancer: implications for focal therapy. **Nature Reviews Urology**. 6:4 (2009) 191–203. doi: 10.1038/nrurol.2009.27.
- VANLANGENAKKER, Nele *et al.* - Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. **Current Molecular Medicine**. 8:3 (2008) 207–220. doi: 10.2174/156652408784221306.
- WALKER, John M.; ARMSTRONG, Donald - **Advanced protocols in oxidative stress II**. 1. ed. New York : Press, Humana, 2010
- WALSH, Patrick - The Role of Radical Prostatectomy in the Management of Prostatic Cancer. (1987) 12.
- WANG, Yu-Jen *et al.* - The outcome and prognostic factors for lymph node recurrence after

node-sparing definitive external beam radiotherapy for localized prostate cancer. **World Journal of Surgical Oncology**. 13:7 (2015) 312. doi: 10.1186/s12957-015-0721-4.

WARD, Laura Sterian - Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. 46:4 (2002) 351–360. doi: 10.1590/S0004-27302002000400006.

WITTE, John S. - Prostate Cancer: A Closer Look at Risk Factors. **Clinical OMICs**. 3:1 (2016) 21–22. doi: 10.1089/clinomi.03.01.08.

WONDERGEM, J. - Minimum Essential Syllabus for Radiobiology: Direct and Indirect Effects. Em **Radiation biology: A Handbook for Teachers and Students**. Vienna : International Atomic Energy Agency, 2010. p. 23–26.

WU, Xifeng; GU, Jian - Heritability of prostate cancer: a tale of rare variants and common single nucleotide polymorphisms. **Annals of Translational Medicine**. 4:10 (2016) 206–209. doi: 10.21037/atm.2016.05.31.

YILMAZ, H.; AKSU, G.; DILLIOGLUGIL, O. - External beam radiotherapy for localized prostate cancer. **Asian journal of andrology**. 17:6 (2015) 892–898. doi: 10.4103/1008-682X.156857.

YOSHIMURA, Elisabeth Mateus; OKUNO, Emico - **Física das Radiações**. São Paulo : Oficina de Textos, 2010

ZHOU, Cindy Ke *et al.* - Prostate cancer incidence in 43 populations worldwide: An analysis of time trends overall and by age group. **International Journal of Cancer**. 138:6 (2016) 1388–1400. doi: 10.1002/ijc.29894.

ZIETMAN, Anthony L. *et al.* - Comparison of Conventional-Dose vs High-Dose Conformal Radiation Therapy in Clinically Localized Adenocarcinoma of the Prostate. **Jama**. 294:10 (2005) 1233–1241. doi: 10.1001/jama.294.10.1233.