



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Rosana Fernandes Martins

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE RESPOSTA
À TERAPÊUTICA PARA O CANCRO DO PULMÃO:
ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação no âmbito do Mestrado em Farmacologia Aplicada,
orientada pela Professora Doutora Ana Salomé Pires e pela
Professora Doutora Maria Rosete e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Fevereiro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Rosana Fernandes Martins

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE RESPOSTA
À TERAPÊUTICA PARA O CANCRO DO PULMÃO:
ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação no âmbito do Mestrado em Farmacologia Aplicada, orientada pela
Professora Doutora Ana Salomé Pires e pela Professora Doutora Maria Rosete e
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Fevereiro de 2021

Agradecimentos

Gostaria de iniciar o presente trabalho agradecendo a algumas pessoas e entidades, que foram importantes para a elaboração do mesmo, e sem elas tal não poderia ser feito.

Ao Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra, iCBR, por me deixar integrar no grupo de Biofísica para a elaboração da dissertação. Por me ter recebido e dando-me a oportunidade de realizar um trabalho tão importante no meu percurso académico.

Aos serviços farmacêuticos do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra pela cedência dos fármacos, porque sem estes a realização da tese de mestrado não seria possível.

À Professora Doutora Ana Salomé Pires a minha orientadora externa, quero agradecer pela amizade oferecida, pela fantástica orientação, ajuda prestada, disponibilidade, transmissão de conhecimento, compreensão durante todo o desenvolvimento do trabalho, companhia e muita paciência, também pelos conselhos tornando-me uma pessoa muito mais autoconfiante e responsável, pela motivação, nunca me deixando desistir. Também pelo seu voto de confiança e principalmente por estar sempre presente em tudo o que fosse necessário.

À Professora Doutora Teresa Rosete a minha orientadora interna, pela sua simpatia e pela sua disponibilidade na orientação da realização desta dissertação de mestrado.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, diretora do Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, por proporcionar as condições necessárias à realização deste trabalho científico e pela sua disponibilidade no cuidado da correção desta dissertação.

À Professora Doutora Margarida Abrantes, pela sua simpatia, por me ter acompanhado e pelo incentivo durante os meses da realização desta dissertação, também queria agradecer pelo voto de confiança e pela disponibilidade em ajudar em tudo o que fosse necessário.

À Dra. Daniela Madama, pelo seu companheirismo, ajuda, carinho e incentivo e acima de tudo pela partilha de conhecimento, e pelos bons momentos de descontração.

Ao Professor Doutor Marco Alves pelo auxílio prestado na realização dos estudos de Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear

À Professora Doutora Cristina Gonçalves pelo auxílio prestado na realização dos estudos de citometria de fluxo.

Aos Mestres, Tamaeh, Inês Marques, Ricardo Teixeira, Catarina Guilherme, Nuno e Safura pelo apoio e pela ajuda na minha integração no grupo, pela amizade, pela ajuda, no esclarecimento de dúvidas sempre que foi necessário e pelos momentos de descontração quando era preciso.

Aos meus colegas de mestrado, Lúcia Monteiro, Lúcia Fernandes, Gabi, Bia, Zé, Eurico, Catarina, Ana, e João pelo companheirismo, ajuda, partilha de conhecimento, disponibilidade, também pelos momentos divertidos por que passamos e pelo espírito de força e entreatajuda nos momentos mais difíceis.

À minha melhor amiga Rita, que sempre me acompanhou desde o início do meu percurso académico, por todos os momentos bons e menos bons por que passámos, pelo apoio incondicional em cada decisão que tomo, pela força que me dá a cada dia que passa.

Ao Leonardo, pela sua imensa paciência, pela força transmitida, pelo seu carinho, pelo apoio incondicional, pelo incentivo e companheirismo, apoiando cada sonho meu, nunca me deixando desistir e pelo amor demonstrado em todo o caminho que já percorremos.

À minha família, por sempre acreditarem em mim dando-me o seu apoio incondicional em todas as minhas decisões e por estarem sempre lá todos os dias da minha vida e em cada passo que dou.

Por fim a todos aqueles que indireta ou diretamente ajudam-me todos os dias, com a sua contribuição.

O meu sincero obrigada a todos!

Lista de Abreviaturas

ALT	<i>Alanine aminotransferase</i>
AnV	<i>Annexin V</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
CAR T CELL	<i>Chimeric antigen receptor Tcells</i>
CK5/6	<i>Cytokeratin 5/6</i>
CK7	<i>Cytokeratin 7</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated</i>
DHFR	<i>Dihydrofolate</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ETC	<i>Electron transport chain</i>
FITC	<i>Fluorescein-5-isothiocyanate</i>
GARFT	<i>Phosphoribosylglycinamide formyltransferase</i>
GLS	<i>Glutaminase</i>
GLUT I	<i>Glucose transporter I</i>
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPV	<i>Human Papilloma Virus</i>
IC ₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
ICPIs	<i>Immune checkpoint inhibitors</i>
IgG4	<i>Immunoglobulin 4</i>
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide</i>
MtDNA	<i>Mitochondrial DNA</i>
NAD ⁺	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form</i>
NK Cell	<i>Natural killer cells</i>
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i>

OXPHOS	<i>Oxidative phosphorylation</i>
PC	<i>Pyruvate carboxylase</i>
PD-1	<i>Programmed death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death ligand 1</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i>
QT	<i>Quimioterapia</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RMN	<i>Ressonância Magnética Nuclear</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SCLC	<i>Small cell lung carcinoma</i>
SCC	<i>Squamous cell lung carcinoma</i>
TCA	<i>Tricarboxylic acid cycle</i>
TP53	<i>Tumour Protein p53</i>
TS	<i>Thymidylate Synthase</i>
TTF-1	<i>Thyroid transcription factor-1</i>
Treg Cell	<i>Regulatory T cell</i>

Resumo

O cancro do pulmão, a nível mundial, constitui uma das principais causas de mortalidade.

Em termos patológicos o cancro do pulmão é uma doença heterogénea, classicamente dividida em duas categorias principais, os NSCLC (do inglês, *non-small cell lung cancer*) e os SCLC (do inglês, *small cell lung carcinoma*). Os NSCLC, representam cerca de 85% das neoplasias malignas do pulmão e subdividem-se em três subcategorias: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de grandes células.

A opção terapêutica recomendada para o tratamento de qualquer tipo de cancro é sempre condicionada pelo estágio em que se encontra o tumor no momento do diagnóstico e pelas características biológicas do mesmo. No cancro do pulmão esta tomada de decisão torna-se um desafio ainda mais substancial, já que a maioria dos doentes são diagnosticados em estádios avançados, estimando-se uma sobrevida de 5 anos. A investigação constante, numa área de intervenção tão importante como o cancro, é inquestionavelmente necessária. Uma dessas áreas é a metabolómica, definida como o estudo de processos biológicos envolvendo compostos de baixo peso molecular (metabolitos), presentes em células ou organismos, que participam na manutenção das funções celulares.

O principal objetivo deste projeto de investigação foi compreender as alterações do metabolismo de células de linhas de cancro do pulmão do tipo não pequenas células, com recurso à metabolómica. Pretendemos estudar as alterações no perfil metabolómico após diferentes regimes de tratamento, nomeadamente após exposição a fármacos utilizados regularmente na prática clínica nos regimes clássicos de quimioterapia (QT) (carboplatina/cisplatina) em que estes são usados em combinação com o pemetrexede e a gemcitabina. Na imunoterapia, nomeadamente os ICPIs (do inglês, *immune checkpoint inhibitors*), tais como o nivolumab e o pembrolizumab, foram igualmente alvo de estudo, a fim de tentar revelar potenciais biomarcadores.

A primeira parte do trabalho consistiu na caracterização de duas linhas celulares tumorais de NSCLC (A549 e H1299) em termos de morfologia e de imunocitoquímica. Posteriormente, avaliou-se o efeito dos diferentes fármacos e suas combinações, na proliferação celular, recorrendo ao estudo da atividade metabólica, por espectrofotometria, através do ensaio MTT (do inglês, *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*).

A segunda parte deste trabalho teve como objetivo quantificar os metabolitos intra ou intercelulares, face à exposição das células às diferentes terapias, com recurso à espectroscopia por ressonância magnética nuclear. Por último, para apoiar o estudo da metabolómica, foram avaliadas a viabilidade celular e o perfil de morte celular provocadas pelos diferentes regimes

terapêuticos, com recurso à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo, através da técnica de citometria de fluxo.

A caracterização das linhas celulares mostrou que a linha celular HI299 é representativa do carcinoma de grandes células e a linha celular A549 é representativa de adenocarcinoma. Ambas as linhas celulares não expressam o recetor PD-L1 (do inglês, *Programmed death ligand 1*) pelo que não foi dado seguimento aos estudos com os ICPIs, nivolumab e pembrolizumab, visto o seu mecanismo de ação estar na dependência deste recetor.

Os fármacos e as combinações que revelaram maior atividade anti-proliferativa na linha celular HI299 foram a cisplatina associada à gemcitabina. Por outro lado, na linha celular A549, concluiu-se que a cisplatina administrada isoladamente foi a que apresentou maior atividade anti-proliferativa. Assim, a associação entre a cisplatina e a gemcitabina é um excelente candidato à terapia combinada, pois está associada a efeitos adversos moderados e a toxicidade está dependente da concentração administrada.

O estudo da viabilidade celular permitiu-nos verificar que apenas houve uma diminuição de aproximadamente 15% de células viáveis, não comprometendo a análise metabolómica.

A técnica de espectroscopia por ressonância magnética permite quantificar diversos metabolitos e obter o perfil metabolómico das células após exposição a diferentes regimes de tratamento quimioterapêuticos. Além dos constrangimentos existentes devido à pandemia, questões técnicas associadas a uma avaria no equipamento de ressonância magnética nuclear, no qual estas amostras seriam analisadas, impediram a obtenção dos resultados da análise metabolómica. Assim, a continuidade deste trabalho prende-se com a quantificação dos metabolitos presentes nas amostras das linhas celulares em estudo e posterior identificação de possíveis biomarcadores *in vitro*, como também a translação deste estudo pré-clínico para um estudo clínico, cujo principal objetivo consiste na validação da identificação desses biomarcadores em biofluidos, de forma a perceber se poderão efetivamente ser considerados biomarcadores específicos para o cancro do pulmão.

Palavras-chave: cancro do pulmão, metabolómica, quimioterapia, biomarcadores.

Abstract

Lung cancer worldwide is a major cause of mortality.

Pathologically, lung cancer is a heterogeneous disease, classically divided into two main categories, namely NSCLC (non-small cell lung cancer) and SCLC (small cell lung cancer). NSCLC represent 85% of malignant lung cancer and are subdivided into three categories: adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell carcinoma.

The therapeutic option chosen for the treatment of any type of cancer is always dependent on the stage of the tumour at the diagnosis and on its biological characteristics. In lung cancer, this decision is a substantial challenge, since most of the patients are diagnosed at advanced stages, with a 5-years survival estimate. Thus, constant research in an area of intervention as important as cancer is unquestionably necessary. One of these areas is metabolomics, defined as the study of biological processes involving low molecular weight compounds (metabolites), present in cells or organisms, which participate in the maintenance of cellular functions.

The main objective of this research project is to understand the altered metabolism of NSCLC cell lines, using metabolomics. Thus, it is intended to study changes in the metabolomic profile after different treatment regimens, namely after exposure to drugs regularly used in clinical practice within classic QT regimens (carboplatin/cisplatin) in which these are used in combination with pemetrexed and gemcitabine. In immunotherapy, namely ICPIs (immune checkpoint inhibitors) such as nivolumab and pembrolizumab, to reveal potential biomarkers.

The first part of this work included the characterization of two lung cancer tumour cell lines (A549 and H1299) in terms of morphological and immunohistochemical characterization.

Subsequently, the effect of different drugs and their combinations was evaluated on cell proliferation, using the study metabolic activity, through MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The second part of this work aimed to quantify intra or intercellular metabolites in view of the exposure of cells to different therapies using nuclear magnetic resonance spectroscopy.

Finally, to support the study of metabolomics, cell viability and the profile of cell death caused by the different therapeutic approaches studied were evaluated, using double labelling with annexin V and propidium iodide by flow cytometry.

The characterization of the cell lines showed that H1299 cell line is representative of large cell carcinoma and A549 cell line is representative of adenocarcinoma. Both cell lines do not express the PD-L1 receptor (Programmed death ligand 1), so studies with ICPIs, namely

nivolumab and pembrolizumab, were not followed up, as their mode of action is dependent on this receptor.

The drugs and combinations, which showed greater anti-proliferative activity in the H1299 cell line, were cisplatin associated with gemcitabine. In the A549 cell line, it can be concluded that cisplatin administered alone showed greater anti-proliferative activity. Thus, the association between cisplatin and gemcitabine is seen as an excellent candidate for combination therapy, as it is associated with moderate side effects and toxicity is dependent on the dose administered.

The study of cell viability did not verify that there was only a decrease of approximately 10% of viable cells, without compromising the metabolomic analysis.

The technique of spectroscopy by nuclear magnetic resonance allows quantifying several metabolites and obtaining the metabolic profile of cells after exposure to different chemotherapeutic treatment regimens. In addition to the existing constraints due to the pandemic, technical issues associated with a failure in the nuclear magnetic resonance equipment in which these samples would be analyzed hampered the obtaining of the metabolomics results. Thus, the continuity of this work comprises the quantification of the metabolites present in the samples of the cell lines under study and subsequent identification of possible biomarkers *in vitro* and the translate this preclinical study into a clinical study, whose main objective is to validate the identification of these biomarkers in biofluids, in order to understand if they could be considered specific biomarkers for lung cancer.

Keywords: lung cancer, metabolomics, chemotherapy, biomarkers.

Índice

Agradecimentos	III
Lista de Abreviaturas	V
Resumo	VII
Abstract	IX
Índice	XI
Índice de Figuras.....	XIII
Índice de Tabelas.....	XIV
Capítulo I. Introdução.....	I
1. Conceitos Gerais.....	I
2. Cancro do Pulmão	2
2.1 Anatomia Pulmonar	2
2.2 Epidemiologia e Etiologia.....	4
2.3 Histologia	6
2.4 Estadiamento e Diagnóstico	8
2.5 Tratamento	9
3. Metabolómica.....	15
3.1 <i>Hallmarks of Cancer</i>	16
3.2 Metabolismo	17
3.3 Reprogramação Metabólica	21
3.4 Metabolómica na Clínica Oncológica	28
Capítulo II. Objetivos.....	31
Capítulo III. Materiais e Métodos	33
1. Culturas Celulares	33
1.1 Linhas Celulares.....	33
2. Ensaios laboratoriais	34

2.1 Manutenção das Culturas Celulares	34
2.2 Caracterização das Linhas Celulares	34
2.3 Avaliação da Citotoxicidade	35
2.4 Avaliação da Viabilidade Celular	41
2.5 Quantificação Metabolómica por RMN.....	44
3. Análise Estatística.....	48
Capítulo IV. Resultados e Discussão.....	49
1. Caracterização das Linhas Celulares	49
2. Avaliação da Proliferação Celular.....	50
3. Avaliação da Viabilidade Celular	57
4. Análise Metabolómica	60
Capítulo V. Conclusão e Perspetivas Futuras	63
Capítulo VI. Referências.....	67

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação ilustrativa do epitélio pulmonar.	3
Figura 2 - Representação gráfica relativamente aos dados epidemiológicas de incidência e mortalidade de cancro de pulmão	4
Figura 3 - Representação esquemática dos dados epidemiológicos dos diversos tipos de cancro a nível mundial	5
Figura 4 - Representação esquemática e respetivas percentagens dos dados epidemiológicos dos diversos tipos de cancro em Portugal.....	6
Figura 5 - Definições da classificação TNM	9
Figura 6 - Representação esquemática da estrutura química dos agentes alquilantes	12
Figura 7 - Representação esquemática da estrutura química do pemetrexed.....	13
Figura 8 - Representação esquemática da estrutura química da gemcitabina	13
Figura 9 - Representação ilustrativa do mecanismo de ação dos fármacos inibidores de PD-1/PD-L1.....	15
Figura 10 - Características biológicas específicas adquiridas pelo tumor.....	16
Figura 11 - Representação esquemática do metabolismo da glicose	18
Figura 12 - Representação esquemática da via da fosforilação oxidativa.....	19
Figura 13 - Representação esquemática das vias da glicólise e pentose fosfato (PPP).....	20
Figura 14 - Ciclo de Krebs.....	21
Figura 15 - Representação esquemática das diferenças entre a fosforilação oxidativa e glicólise anaeróbia	23
Figura 16 - Glutaminólise.....	25
Figura 17 - Representação esquemática simplificada das principais vias metabólicas lipídicas	26
Figura 18 - Representação ilustrativa da câmara de Neubauer.....	36
Figura 19 - Conversão do MTT	39
Figura 20 - Protocolo do ensaio do MTT	40
Figura 21 - Esquema de um citómetro de fluxo	42
Figura 22 - Marcação da fosfatidilserina pela anexina V.....	43
Figura 23 - Curvas de dose-resposta da linha celular tumoral HI299	51
Figura 24 - Curvas de dose-resposta da linha celular tumoral A549.....	53
Figura 25 - Viabilidade celular na linha celular HI299 com cisplatina.....	58
Figura 26 - Viabilidade celular na linha celular HI299 com carboplatina.	59

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Estadiamento anatómico.....	8
Tabela 2 – Anticorpos utilizados na caracterização imunocitoquímica.....	35
Tabela 3 – Gamas de concentração dos fármacos utilizadas em regime de monoterapia.	37
Tabela 4 – Concentrações ou gama de concentrações dos fármacos usados em regime de combinação.	38
Tabela 5 – Concentrações utilizadas para a Espetroscopia por Ressonância Magnética Nuclear.	38
Tabela 6 – Classificação das células de acordo com a intensidade de marcação com AnV e IP	43
Tabela 7 – Caracterização das linhas celulares de cancro do pulmão de não pequenas células, A549 e H1299.....	49
Tabela 8 – Valores de IC ₂₀ e IC ₅₀ dos fármacos e as combinações testadas na linha celular H1299, após 48h de incubação, assim como os valores de r ² e intervalos de confiança a 95% (IC 95%) referentes ao IC ₅₀	52
Tabela 9 – Valores de IC ₂₀ e IC ₅₀ dos fármacos e as combinações testadas na linha celular A549, após 48h de incubação, os intervalos de confiança a 95% (IC 95%) referentes ao IC ₅₀ e os valores de r ²	55

Capítulo I. Introdução

I. Conceitos Gerais

Hoje em dia, com o avanço científico e tecnológico, é possível entender, de uma maneira geral, o que acontece quando as células se tornam cancerígenas (Hanahan, Weinberg, & Francisco, 2000). O corpo humano é composto por milhões de células, que apresentam um ciclo de vida normal, ou seja, têm a capacidade de crescer, multiplicarem-se e morrerem, renovando os tecidos. O processo carcinogénico inicia-se, quando os genes que normalmente controlam esse ciclo, perdem a capacidade, quer de controlar, quer de reparar os danos caso haja mutações (Pitot, 1993). Devido à acumulação dessas mutações, por falhas nos mecanismos de reparação, as células entram num processo de crescimento e multiplicação descontrolado, acabando por destruir e invadir as células e os tecidos adjacentes, dando assim origem ao cancro (Torgovnick & Schumacher, 2015). Este designa um grupo vasto de doenças que pode afetar qualquer parte do organismo, sendo também denominado por tumores malignos ou neoplasias. Como já referido, o cancro resulta das acumulações de mutações que ocorrem nos oncogenes que, quando mutados, poderão iniciar processos carcinogénicos, ou nos genes supressores tumorais, que são responsáveis por controlar o ciclo celular impedindo o progresso do crescimento celular de células mutadas (Corps, 2011).

Contudo, não é possível encontrar uma razão específica e exata do que leva ao desenvolvimento do cancro (Nagy, 2011). Sabe-se que as células são influenciadas por diversos fatores ambientais, físicos, químicos e genéticos, ou simplesmente por mutações ocasionais, que influenciam e se tornam decisivos para despoletar a malignidade celular (Torgovnick & Schumacher, 2015). Assim, o cancro torna-se numa das maiores problemáticas a nível da saúde da nossa sociedade (Hanahan *et al.*, 2000).

O cancro irá ser uma das principais causas de morte a nível mundial no século XXI, apesar de as doenças cardiovasculares ainda ocuparem o primeiro lugar. As taxas de incidência e de mortalidade relativamente ao cancro estão a aumentar. As razões são diversas, mas centram-se principalmente no envelhecimento da população, bem como nas alterações da prevalência e distribuição dos principais fatores de risco para esta doença, tais como hormonais, hereditários, ou doenças metabólicas e autoimunes. Os fatores extrínsecos também influenciam na prevalência desta doença, como por exemplo, o tabaco, o consumo de álcool, o tipo de dieta alimentar, a exposição à radiação ou infeções, como são exemplos

as infeções por HPV (do inglês, *human papilloma virus*), por HBV (do inglês, *hepatitis B virus*), ou por HIV (do inglês, *human immunodeficiency virus*) (Bray et al., 2018) (Saeed et al., 2019).

Em 2018, a nível mundial contabilizaram-se 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes. Em 2040, estima-se que o número de novos casos aumente para 29,5 milhões e que esta doença seja responsável por 16,5 milhões de mortes (Cancer, 2019).

2. Cancro do Pulmão

Apesar de todos os progressos científicos quer a nível do tratamento, quer a nível do diagnóstico desenvolvidos nos últimos anos, o cancro do pulmão continua a ser um dos cancros mais frequentes, sendo responsável por um número elevado de mortes em todo o mundo, tornando-se um problema com um grande impacto não só na medicina mas também a nível económico e social (Haznadar et al., 2016b; Nasim, Sabath, & Eapen, 2019). Face a estas problemáticas, a busca constante por novas abordagens terapêuticas nesta área torna-se imprescindível.

2.1 Anatomia Pulmonar

O sistema respiratório é constituído por dois tipos de vias aéreas, de acordo com a sua função principal, sendo elas, as vias aéreas de condução e a zona de trocas gasosas (Figura 1). As vias aéreas de condução, são compostas pelas fossas nasais, a faringe, a laringe, a traqueia, os brônquios e os bronquíolos, e são responsáveis por transportar a mistura gasosa até à zona de trocas gasosas. Para além disso, garantem o aquecimento, o humedecimento e a filtração do ar inspirado, purificando-o de partículas e de agentes patogénicos que possam entrar pelas cavidades nasais ou boca. A zona de trocas gasosas abrangem os bronquíolos respiratórios, os canais alveolares, o saco alveolar e os alvéolos pulmonares, e a sua função principal consiste nas trocas gasosas (Hollenhorst, Richter, & Fronius, 2011; Soleas, Paz, Marcus, McGuigan, & Waddell, 2012).

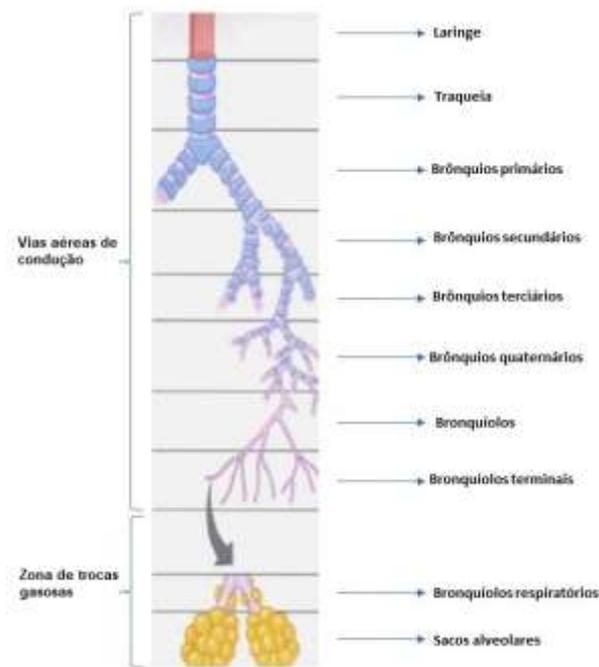


Figura 1 – Representação ilustrativa do epitélio pulmonar adaptado de (BéruBé et al., 2010). O sistema respiratório é constituído por dois tipos de vias aéreas principais: as vias aéreas de condução, onde se incluem as fossas nasais, a faringe, a laringe, a traqueia, os brônquios e os bronquíolos; e a zona de trocas gasosas que abrangem os bronquíolos respiratórios, os canais alveolares, o saco alveolar e os alvéolos pulmonares.

As vias aéreas de condução são revestidas essencialmente pelo epitélio respiratório, um epitélio pseudoestratificado ciliado, o qual, para além das células ciliadas, apresenta uma variedade de outras células como as células caliciformes células basais indiferenciadas, células de Clara, e células intermediárias. Ao longo do trato respiratório, o tipo de célula, a sua quantidade e distribuição variam. Os cílios das células ciliadas permitem que o muco e as partículas estranhas sejam direcionados para a faringe onde, posteriormente, são removidas quer por deglutição ou quer pela expetoração. As células caliciformes são responsáveis por segregar muco para o lúmen das vias aéreas, o qual é responsável por lubrificar a superfície epitelial, humedecendo o ar e por reter partículas estranhas que possam ser prejudiciais. As células basais são células indiferenciadas que permitem manter a homeostase do epitélio normal, após uma lesão ou durante a própria renovação tecidual. As células de Clara, são caracterizadas por não serem ciliadas e segregam substâncias glicoproteicas, nomeadamente mucinas e peptídeos antimicrobianos, para o lúmen da via aérea com o intuito de proteger o epitélio bronquiolar. Para além disso apresentam a capacidade de renovarem o epitélio bronquiolar. Por último, as células intermediárias, apesar da sua função não estar bem elucidada, apresentam microvilosidades na superfície celular apical, detetando compostos estranhos que possam estar nas vias aéreas. Os alvéolos pulmonares são constituídos por dois tipos de células; os pneumócitos do tipo I, cuja função principal consiste na formação de uma barreira que favorece as trocas gasosas e impede a passagem de fluidos e os pneumócitos do

tipo II, que sintetizam o surfactante pulmonar, substância fundamental durante a respiração, que diminui a tensão superficial do líquido que reveste os alvéolos pulmonares, impedindo o seu colapso (BéruBé, Prytherch, Job, & Hughes, 2010; Knight & Holgate, 2003).

2.2 Epidemiologia e Etiologia

No século XXI, o cancro do pulmão evoluiu de uma doença incomum e incompreendida para o cancro mais incidente e prevalente no mundo, sendo a principal causa de morte por cancro (Berndt, 1966). Em 2018 foram detetados 2,1 milhões de novos casos e esta neoplasia foi responsável por 1,8 milhões de mortes. Em 2040 prevê-se que sejam diagnosticados 3,6 milhões de novos casos e que haja aproximadamente 3,1 milhões de mortes devido a esta doença (Globocan Observatory, 2019b) (Figura 2)

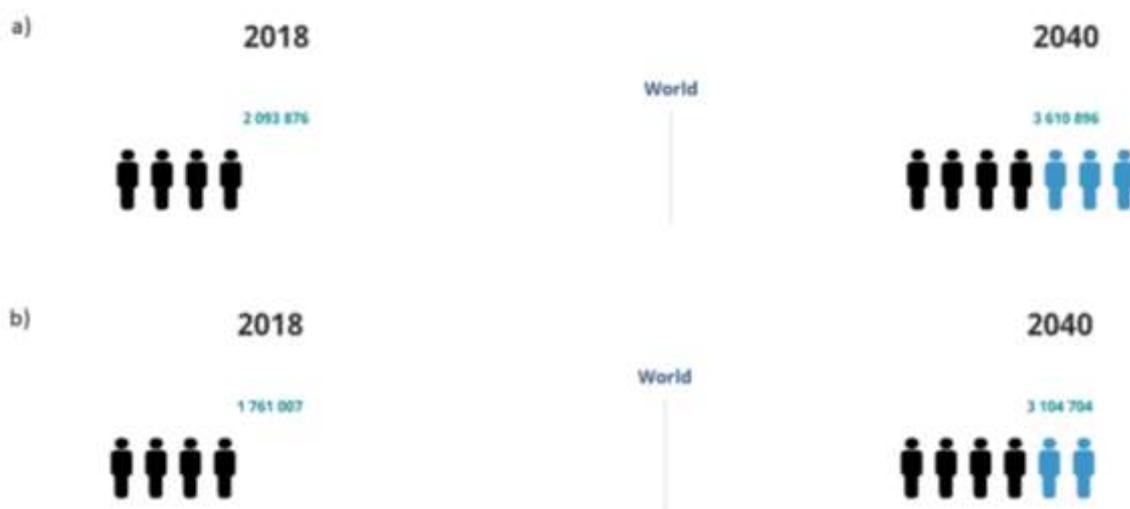


Figura 2 – Representação gráfica relativamente aos dados epidemiológicos de incidência e mortalidade de cancro de pulmão em termos de a) taxa de incidência a nível mundial em 2018 face a 2040 e de b) taxa de mortalidade a nível mundial de 2018 face a 2040. As figuras azuis representam as mudanças demográficas em 2040 relativamente ao ano de 2018. Adaptado de (Cancer, 2019).

A nível mundial, o cancro do pulmão é o mais incidente, seguindo-se o cancro da mama e o cancro colorretal (Figura 3a). Relativamente à mortalidade, também se classifica em primeiro lugar, seguindo-se o cancro colorretal e o cancro do estômago (Figura 3b) (Globocan Observatory, 2019a).

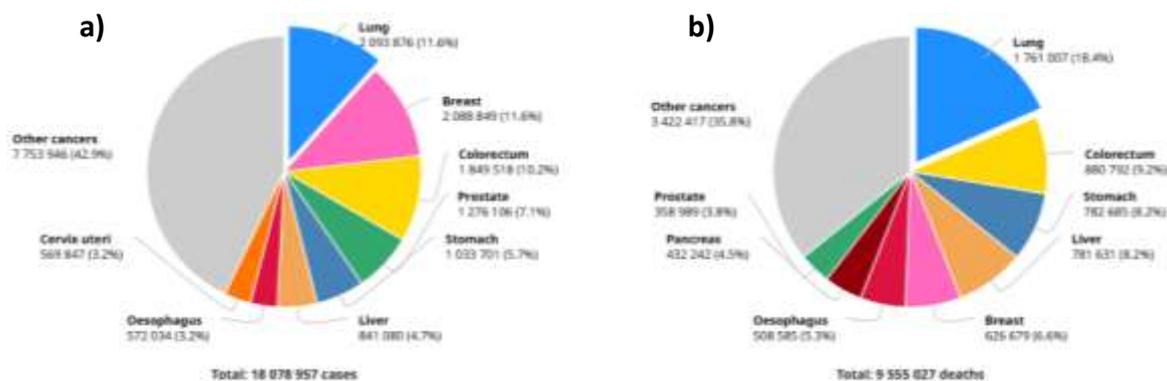


Figura 3 – Representação esquemática dos dados epidemiológicos dos diversos tipos de cancro a nível mundial. a) Representação esquemática e respetivas percentagens dos novos casos detetados. b) Representação esquemática e respetivas percentagens do número de mortes provocadas por cancro. Adaptado de Globocan Observatory, 2019.

Relativamente ao género, mundialmente, o cancro do pulmão afeta principalmente o masculino, apresentando taxas de incidência e mortalidade maiores face ao feminino. No género masculino, o cancro do pulmão está em primeiro lugar, registando 1,4 milhões de novos casos por ano e 1,1 milhões de mortes. Relativamente ao género feminino, em termos de incidência encontra-se em terceiro lugar registando 725 mil novos casos, e em termos de mortalidade classifica-se em segundo lugar registando 576 mil mortes (Globocan Observatory, 2019a).

Em Portugal, no ano de 2018 foram detetados cerca de 58 mil novos casos de cancro, sendo que esta doença foi responsável por 28 mil mortes. O cancro do pulmão está em quarto lugar, registando cerca de 5 mil novos casos detetados (Figura 4a) e sendo responsável por 4 mil mortes. No género masculino o cancro do pulmão está em terceiro lugar registando 3,9 mil novos casos (Figura 4b) e no género feminino está em quarto lugar registando 1,2 mil novos casos (Figura 4c) (Globocan Observatory, 2019b).

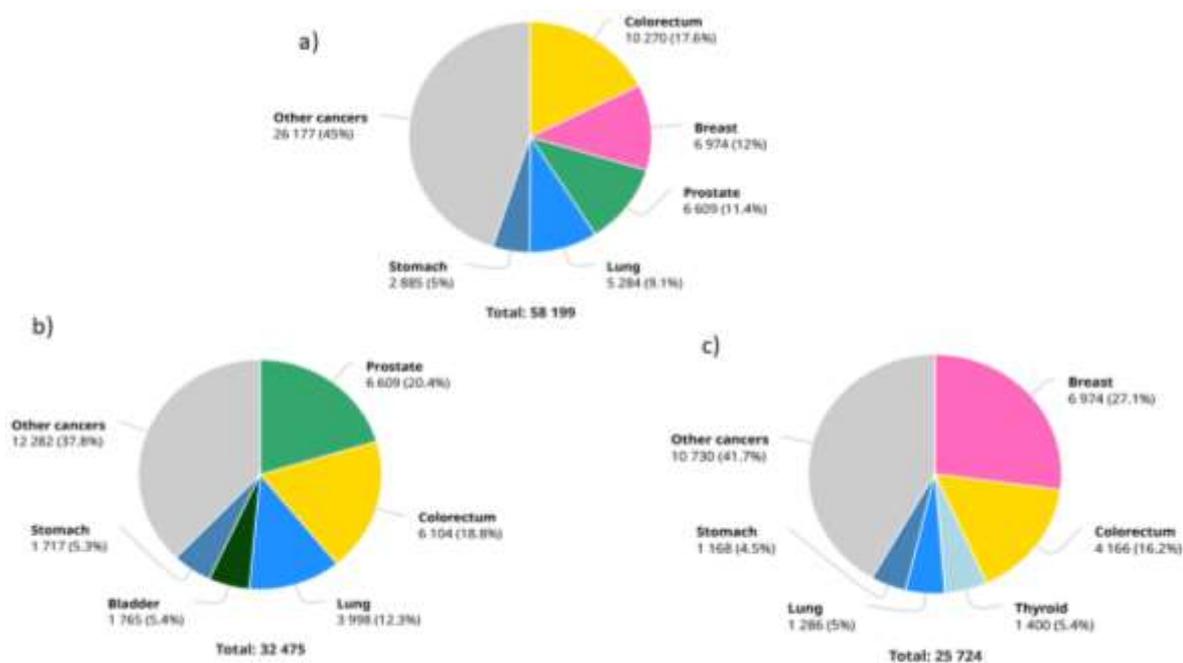


Figura 4 – Representação esquemática e respetivas percentagens dos dados epidemiológicos dos diversos tipos de cancro em Portugal, relativamente a a) novos casos detetados; b) novos casos detetados do género masculino; c) novos casos detetados do género feminino (Globocan Observatory, 2019).

2.3 Histologia

O cancro do pulmão pode ser classificado patologicamente segundo uma abordagem histológica ou citológica. No entanto, a classificação histológica associada ao estadiamento é um critério relevante na tomada de decisão do tratamento a eleger perante o diagnóstico (Travis, 2011).

O cancro do pulmão é classificado em duas grandes classes, de acordo com as diferenças histológicas ao nível dos tecidos, na capacidade de metastização e na resposta ao tratamento. Posto isto, temos o carcinoma do pulmão de pequenas células (SCLC, do inglês *small cell lung carcinoma*) e carcinoma do pulmão de não pequenas células (NSCLC, do inglês *non small cell lung carcinoma*) (Alberg, Brock, Ford, Samet, & Spivack, 2013; Larsen & Minna, 2011; Travis, 2011; Zheng, 2016).

O SCLC é menos comum, quando comparado com o NSCLC, e é caracterizado por crescer rapidamente e muitas vezes apresenta metástases, contudo, apresenta uma boa resposta à quimioterapia (QT) (Travis, 2011). Este carcinoma é definido por ser um tumor maligno epitelial. Por outro lado, o NSCLC em comparação com o SCLC, não apresenta um potencial metastático tão elevado, contudo, não responde à QT de uma maneira tão eficaz (Larsen & Minna, 2011).

O NSCLC é subdividido histologicamente em três subclasses principais sendo elas: o adenocarcinoma, o carcinoma de células escamosas e o carcinoma de grandes células (Larsen & Minna, 2011; Travis, 2011).

Ao longo desta dissertação apenas será abordada a classe do carcinoma do pulmão de não pequenas células, visto ser o tipo de cancro de pulmão mais frequente na população mundial.

2.3.1 Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células

2.3.1.1 Adenocarcinoma

O adenocarcinoma, normalmente, inicia-se a partir de uma hiperplasia adenomatosa atípica, que depois tende a progredir para um carcinoma podendo tornar-se invasivo. É importante realçar que nem todos os carcinomas deste tipo surgem de uma hiperplasia e que nem todos os adenocarcinomas se tornam invasivos (Wistuba & Gazdar, 2006). É definido como sendo um tumor epitelial maligno com diferenciação glandular ou produção de mucina (Travis, 2011). Este subtipo é considerado o tipo de tumor pulmonar maligno mais comum, manifestando-se maioritariamente no género feminino e na população não fumadora (Travis, 2011). Este tipo de tumor é também caracterizado por apresentar diversos padrões histológicos sendo eles, acinar, papilar, bronquioalveolar e sólido com produção de mucina. Os adenocarcinomas de padrões mistos, são caracterizados por apresentarem diferentes padrões histológicos, o que se torna um verdadeiro desafio no que diz respeito ao tipo de tratamento mais adequado (Terasaki *et al.*, 2003). Também são caracterizados por expressar diversos marcadores moleculares tais como a napsina A, TTF-1 (do inglês, *thyroid transcription factor-1*), CK7 (do inglês, *cytokeratin 7*), CK5/6 (do inglês, *cytokeratin 5/6*) (J. Wang, Wang, Xu, Li, & Liu, 2020).

Este tipo de carcinoma é caracterizado por apresentar lesões mais periféricas e crescer mais lentamente. A sua metastização é considerada ampla e precoce, já que atinge as vias de drenagem linfática, apresentando metástases a nível do cérebro, dos ossos, do fígado e das glândulas suprarrenais (Kawano *et al.*, 2012).

2.3.1.2 Carcinoma de Células Escamosas

O carcinoma de células escamosas (SCC, do inglês *squamous cell carcinoma*), representa 25-35% da classe NSCLC. Este subtipo é caracterizado devido à transformação do epitélio brônquico e o principal fator de risco associado é o tabagismo. O SCC origina-se nas

vias aéreas brônquicas de médio calibre o que difere do adenocarcinoma que se origina nos brônquios de menor calibre (Berardi *et al.*, 2015).

2.3.1.3 Carcinoma de Grandes Células

O carcinoma de grandes células é caracterizado por apresentar um perfil celular indiferenciado (Travis, 2011). Este tipo de tumor apresenta diferentes variáveis, sendo a mais comum do subtipo neuroendócrino. O carcinoma de grandes células é caracterizado por crescer muito mais rápido, relativamente a outros subtipos de carcinomas, razão pela qual doentes diagnosticados com este subtipo apresentam um mau prognóstico (Iyoda *et al.*, 2001; Travis, 2011).

2.4 Estadiamento e Diagnóstico

Uma das classificações mais frequentes dos tumores baseia-se no sistema TNM, que avalia a extensão e dimensão do tumor primário (T), a ausência ou presença de gânglios linfáticos regionais (N) e ainda se existem metástases (M) (Figura 5) (Lababede, Meziane, & Rice, 2011; Mirsadraee, 2012). Posteriormente, com base neste sistema, definiram-se quatro estádios clínicos. O principal objetivo, que se prende com estas duas classificações, é fornecer ao clínico uma extensão da doença mais precisa, que ajude na avaliação do prognóstico e na tomada de decisão relativamente ao plano de tratamento (Tabela I) (UyBico *et al.*, 2010).

Tabela I – Estadiamento anatómico. Adaptado de UyBico *et al.*, 2010.

Estadiamento anatómico	
Carcinoma Oculto	TX, N0, M0
Estádio 0	Tis, N0, M0
Estádio IA	T1a/b, N0, M0
Estádio IB	T2a, N0, M0
Estádio IIA	T2b, N0, M0
	T1a/b, N1, M0
	T2a, N1, M0
Estádio IIB	T2b, N1, M0
	T3, N0, M0
Estádio IIIA	T1a/b, N2, M0
	T2a/b, N2, M0
	T3, N1/2, M0
	T4, N0/1, M0
Estádio IIIB	T4, N2, M0
	Qualquer T, N3, M0
Estádio IV	Qualquer T, qualquer N, M1a/b

Tumor primário (T)	
Tx	O tumor primário não pode ser localizado, ou o tumor é comprovado pela presença de células neoplásicas na expectoração ou em lavados brônquicos, porém não é visualizado por imagiologia ou broncoscopia, ou qualquer outro método.
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor com menos de 3cm no seu maior diâmetro, circundado por pleura ou tecido pulmonar em toda a sua extensão e sem evidência de invasão mais proximal do que a um brônquio lobar (ou seja, não o brônquio principal) na broncoscopia. (Nota: O tumor superficial, independentemente da sua dimensão, com a sua componente invasiva limitada à parede brônquica e com possível invasão proximal do brônquio principal, também é caracterizado T1)
T1a	Tumor com maior diâmetro ≤ 2 cm
T1b	Tumor com > 2 cm e ≤ 3 cm no seu diâmetro maior
T2	Tumor com diâmetro maior > 3 cm, mas ≤ 7 cm ou envolvendo brônquio principal mas está, pelo menos, 2cm distal em relação à carina ou invade a pleura visceral ou provoca atelectasia ou pneumonite obstrutiva que se estende à região hilar, mas não envolve todo o pulmão.
T2a	Tumor com maior diâmetro > 3 cm mas ≤ 5 cm
T2b	Tumor com maior diâmetro > 5 cm mas ≤ 7 cm
T3	Tumor com mais de 7 cm ou com invasão directa da parede torácica (incluindo tumores do sulco superior), o diafragma, pleura mediastínica ou pericárdio parietal ou tumor no brônquio principal distantes < 2 cm da carina, mas sem envolvimento da carina ou tumor com atelectasia ou pneumonite obstrutiva de todo o pulmão ou tumor associado a nódulo pulmonar independente no mesmo lobo.
T4	Tumor de qualquer dimensão, com invasão do mediastino, coração, grandes vasos, traqueia, esôfago, corpo vertebral ou carina ou tumor cursando com nódulos tumorais separados no mesmo pulmão.
Nódulos linfáticos regionais (N)	
NX	Metástases em nódulos linfáticos não demonstráveis
N0	Ausência de metástases em nódulos linfáticos
N1	Metástases em nódulos linfáticos da região peribrônquica e/ou nódulos linfáticos ipsilaterais e intrapulmonares, incluindo envolvimento por extensão directa do tumor primário
N2	Metástases em nódulo(s) linfático(s) mediastínicos homolaterais e/ou subcarinal
N3	Metástases em nódulos linfáticos mediastínicos contralaterais, hilares contralaterais, no escaleno e supraclaviculares ipsi ou contralaterais.
Metástases à distância (M)	
MX	Metástases à distância não demonstráveis
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Presença de metástases à distância
M1a	Nódulos tumorais separados no pulmão contralateral ou derrame pleural (ou pericárdico) cito ou histologicamente provado
M1b	Metástases à distância extra torácica.

Figura 5 – Definições da classificação TNM, retirado de Lababede, Meziane & Rice, 2011.

É importante definir que o diagnóstico, tem sempre por base a história clínica do doente, avaliando os seus hábitos, o ambiente envolvente e a história familiar de cancro. O diagnóstico é ainda complementado com recurso a análises bioquímicas e histológicas e ainda imagiologia médica (Bepler *et al.*, 2010). De acordo com a Tabela 1, o estadiamento é feito da seguinte forma: no carcinoma oculto não se consegue localizar o tumor, não sendo identificado por técnicas de imagiologia, não apresenta metástases nos gânglios linfáticos ou noutros locais. Os tumores classificados como estágio 0, são tumores localizados (*in situ*) e não apresentam metástases. O estágio I divide-se em três subestádios variando apenas no tamanho do tumor e na presença de metástases linfáticas. O estágio III divide-se em dois subestádios, o tamanho do tumor é superior a 7 cm, havendo também a presença de metástases. O estágio IV é caracterizado devido à presença de metáteses em locais distantes.

2.5 Tratamento

O plano de tratamento é amplamente definido com base na histologia e estágio do tumor. Uma das maiores problemáticas do tipo NSCLC é que só é diagnosticado em fases

mais tardias. A terapia sistémica continua a ser a base do tratamento destes carcinomas, no entanto os resultados são insatisfatórios. Posto isto, o NSCLC torna-se um dos cancros mais difíceis de tratar (C.-Y. Huang, Ju, Chang, Muralidhar Reddy, & Velmurugan, 2017).

A primeira linha a considerar para o NSCLC nos estádios iniciais (I e II) geralmente é a cirurgia, para prevenir recidivas, e a radioterapia e a QT são utilizadas como co-adjuvantes (Vansteenkiste *et al.*, 2013). Por outro lado, para estádios mais avançados (III e IV), os doentes são tratados com QT como primeira linha, sendo que os fármacos mais utilizados são a cisplatina ou carboplatina podendo ser usados em associação com o pemetrexede ou a gemcitabina. Nos casos de tumores que apresentem marcadores moleculares específicos, opta-se pela utilização de terapias dirigidas a alvos moleculares em monoterapia ou em associação com a quimioterapia (Vansteenkiste *et al.*, 2013).

2.5.1 Quimioterapia

A QT é considerada como a introdução de agentes químicos ou fármacos com a capacidade de eliminar as células cancerígenas, apresentando uma vasta gama de efeitos sistémicos (C.-Y. Huang *et al.*, 2017). Atualmente existem várias classes farmacológicas anticancerígenas, baseadas no seu mecanismo de ação, e incluem as seguintes: os agentes alquilantes, os antimetabolitos, os antibióticos antitumorais, os inibidores das topoisomerasas, e os inibidores mitóticos (Sak, 2012).

Apesar dos melhores regimes de tratamento disponíveis, o prognóstico para doentes com NSCLC avançado continua a ser uma problemática. Face a essa adversidade, a terapia combinada torna-se uma mais valia. Várias combinações são passíveis de uso, sendo a mais promissora a que associa um complexo de platina, onde se inserem a cisplatina e a carboplatina, e um outro citotóxico, como é o caso do pemetrexede e da gemcitabina (C.-Y. Huang *et al.*, 2017).

Este trabalho apenas abordará os agentes alquilantes, mais especificamente os complexos de platina, na qual se insere a carboplatina e a cisplatina, e os antimetabolitos mais especificamente, os antifolatos onde se insere o pemetrexede, e os análogos de purinas onde se inclui a gemcitabina.

2.5.1.1 Agentes Alquilantes

Em Oncologia, o termo agente alquilante, refere-se a qualquer composto antineoplásico, que se liga de forma irreversível a uma diversidade de biomoléculas suscetíveis, como ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos e nucleótidos. Esta interação desencadeia a

morte celular, devido a uma interferência na estrutura e formação dessas biomoléculas, provocando a inativação de enzimas de reparação do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) e causando danos na membrana (Oronsky, Reid, Knox, & Scicinski, 2012).

Os agentes alquilantes podem ser classificados em diferentes grupos, na qual se inserem os análogos de platina, como a cisplatina e a carboplatina (Figura 6), que se ligam ao alvo através do átomo de platina (Oronsky *et al.*, 2012).

2.5.1.1.1 Cisplatina

A cisplatina ou cis-diaminodocloroplatina (II) é um dos agentes quimioterapêuticos mais eficaz e amplamente utilizado no tratamento de tumores sólidos, nomeadamente carcinomas da bexiga, cabeça e pescoço, pulmão, ovário e testículo (Dasari & Tchounwou, 2014). É um composto à base de platina que forma ligações com as cadeias de DNA, interferindo nos mecanismos de reparação, pelo que se torna um potente indutor da paragem do ciclo celular, induzindo apoptose nas células tumorais (Figura 6a) (Dasari & Tchounwou, 2014). Contudo, a cisplatina está associada à ocorrência de vários efeitos adversos indesejáveis, tais como gastrointestinais (náuseas e vômitos), distúrbios eletrolíticos graves, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, gastrotoxicidade, ototoxicidade e mielossupressão. Além disso, a maioria dos doentes diagnosticados com carcinoma do pulmão, acaba por desenvolver novamente tumores (recidivas), devido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte das células malignas (Dasari & Tchounwou, 2014). Para superar essa problemática, tem-se recorrido frequentemente ao uso de terapias combinadas com outros fármacos, com vista a reduzir também a toxicidade.

2.5.1.1.2 Carboplatina

A carboplatina, tal como a cisplatina também é um agente anticancerígeno, muito utilizado para diversos tipos de cancro. Este agente é um derivado da cisplatina, possuindo um mecanismo de ação semelhante, no entanto, apresenta estrutura e toxicidade diferentes (Figura 6b). O principal alvo é o DNA, no qual o fármaco se liga fortemente, inibindo a replicação e a transcrição (Sousa, Włodarczyk, & Monteiro, 2014).

À semelhança da cisplatina, a carboplatina também está associada à resistência por parte das células cancerígenas, tais como, mecanismos envolvidos na própria reparação do DNA, transportadores intracelulares e nos mecanismos de desintoxicação, nomeadamente na biotransformação e extrusão destes agentes quimioterapêuticos (Sousa *et al.*, 2014).

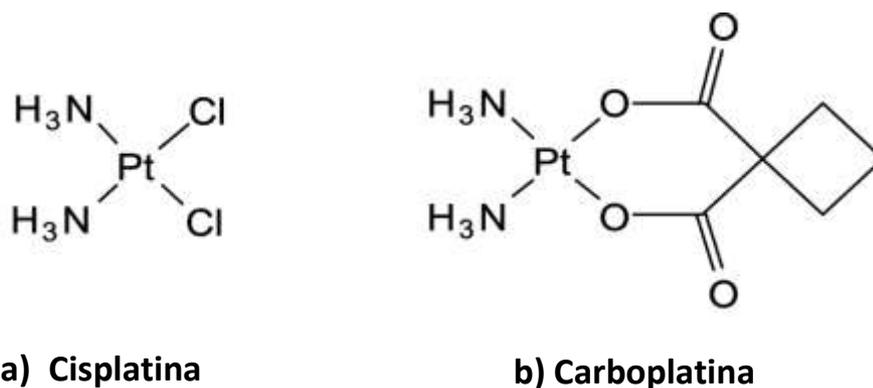


Figura 6 – Representação esquemática da estrutura química dos agentes alquilantes: a) Cisplatina e b) Carboplatina

2.5.1.2 Antimetabolitos

A QT recorrendo ao uso de antimetabolitos, é também uma das estratégias terapêuticas mais utilizadas no tratamento de doenças neoplásicas. Os antimetabolitos podem ser definidos como análogos de compostos naturais que interferem com vias metabólicas essenciais. Embora os enzimas inibidos por estes antimetabolitos estejam presentes nas células normais, é possível que apresentem uma seletividade em relação às células cancerígenas, devido às suas elevadas taxas de replicação. A maioria destes compostos interfere na síntese de ácidos nucleicos, dificultando a síntese de DNA, ou do ácido ribonucleico (RNA, do inglês *ribonucleic acid*) (Avendaño & Menéndes, 2008).

Os primeiros fármacos deste tipo que demonstraram eficácia foram os derivados de intermediários na síntese dos folatos. Atualmente fazem parte desta família 17 fármacos diferentes. Estes fármacos têm como alvo uma enzima metabólica específica e, geralmente, são caracterizados por serem bem tolerados e por apresentarem respostas notáveis em cânceres de estágio avançado, podendo levar à remissão completa em alguns casos (Mehrmohamadi, Jeong, & Locasale, 2017). Os antimetabolitos encontram-se subdivididos em diferentes classes farmacológicas, sendo elas os antagonistas dos folatos, os análogos das purinas e os análogos das pirimidinas (Mehrmohamadi *et al.*, 2017).

Nesta dissertação será dado ênfase à classe farmacológica dos antagonistas dos folatos, onde se insere o pemetrexede, e à classe farmacológica dos análogos das purinas, onde se insere a gemcitabina.

2.5.1.2.1 Antagonistas dos Folatos: Pemetrexede

O folato é um nutriente essencial necessário para a replicação do DNA e apresenta-se como um substrato essencial para diversas reações enzimáticas envolvidas na síntese de aminoácidos (Thatcher *et al.*, 2015).

O pemetrexede (Figura 7) é um antagonista exclusivo do folato que inibe a timidilato sintetase (TS, do inglês *thymidylate synthase*), a dihidrofolato reductase (DHFR, do inglês *dihydrofolate reductase*) e a enzima sintética glicinamida ribonucleotídica formiltransferase (GARFT, do inglês *phosphoribosylglycinamide formyltransferase*). Estes enzimas, por sua vez, estão envolvidos na síntese das purinas e das pirimidinas, pelo que ao serem inibidas comprometem a síntese de DNA e de RNA (Yang et al., 2013).

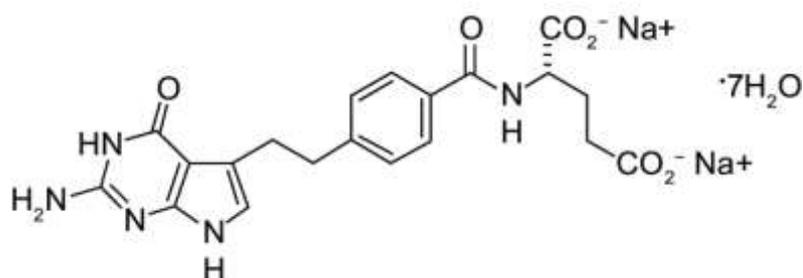


Figura 7 – Representação esquemática da estrutura química do pemetrexed

2.5.1.2.2 Análogos das Purinas: Gemcitabina

A gemcitabina (Figura 8) é um antimetabolito dos análogos das pirimidinas e é considerada um dos novos agentes citotóxicos mais promissores. Este antimetabolito é muito potente e específico, já que é estruturalmente semelhante à citidina. Durante a replicação de DNA, este análogo insere-se na cadeia de DNA. Como os nucleosídeos não o reconhecem, não se irão ligar e, conseqüentemente, a síntese de DNA fica comprometida e a célula sofrerá apoptose, sendo inibido o crescimento do tumor (Hayashi, Kurata, & Nakagawa, 2011; Toschi, Finocchiaro, Bartolini, Gioia, & Cappuzzo, 2005).

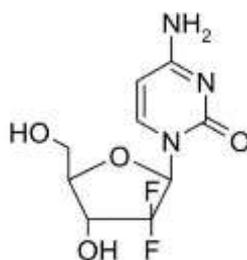


Figura 8 – Representação esquemática da estrutura química da gemcitabina.

2.5.2 Imunoterapia

A imunoterapia tornou-se um dos pilares estabelecidos para o tratamento das doenças neoplásicas, melhorando o prognóstico de muitos doentes. As principais estratégias nas quais a imunoterapia se baseia são os inibidores dos checkpoints imunitário (ICPIs, do inglês *Immune-Checkpoint inhibitors*) e as células T contendo um recetor de antígeno quimérico (CAR T cells,

do inglês *Chimeric antigen receptor T cells*). A importância da imunoterapia foi reconhecida pelo prêmio Nobel da Fisiologia ou Medicina em 2018, pela descoberta da proteína associada aos linfócitos T citotóxicos (CTLA-4, do inglês *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*), da proteína de morte celular programada I (PD-I, do inglês *programmed cell death protein 1*) e do seu recetor, o ligando da proteína de morte celular programada I (PD-LI, do inglês *programmed death-ligand 1*) (Kruger et al., 2019).

Atualmente, os ICPIs são a classe de imunoterapia mais estudada. A estratégia do uso de ICPIs mais comum é o bloqueio da interação PD-I/PD-LI (Riley, June, Langer, & Mitchell, 2019).

O recetor PD-I é expresso em diferentes células, incluindo os linfócitos CD4⁺, CD8⁺, os linfócitos B, as células NK (*NK cells*, do inglês *natural killer cells*) e as células T reguladoras (*Treg cells*, do inglês *regulatory T cells*). Os ligandos de PD-I incluem os PD-LI e os PD-L2. Os PD-LI são expressos em células T e B, células dendríticas e macrófagos, sendo também expressos em células tumorais. Os PD-L2 também interagem com o PD-I inibindo a função efetora das células T, mas ao contrário dos PD-LI que estão maioritariamente expressos nas células T, os PD-L2 estão expressos principalmente em macrófagos e células dendríticas, sugerindo que o PD-L2 é menos eficaz na regulação da resposta periférica das células T (Sundar, Cho, Brahmer, & Soo, 2015).

Fisiologicamente, os *checkpoints* imunitários são responsáveis por proteger os tecidos saudáveis, impedindo que estes sejam afetados e destruídos pelo sistema imunitário. Quando as células T são ativadas, por exemplo em resposta a uma inflamação, estas expressam PD-I o que lhes permite reconhecer células anormais e cancerígenas. As células tumorais, para evitar esse reconhecimento e impedir a sua eliminação, expressam PD-LI, o qual se liga ao PD-I das células T inativando-as (Figura 9a). Posto isto, o uso de fármacos imunoterapêuticos direcionados especificamente para o bloqueio desta interação PD-I/PD-LI favorece uma resposta imunitária antitumoral funcional mediada pelas células T, e que leva à morte das células tumorais (Figura 9b). São exemplos desses fármacos o pembrolizumab e o nivolumab (Benson & Agarwala, 2018).

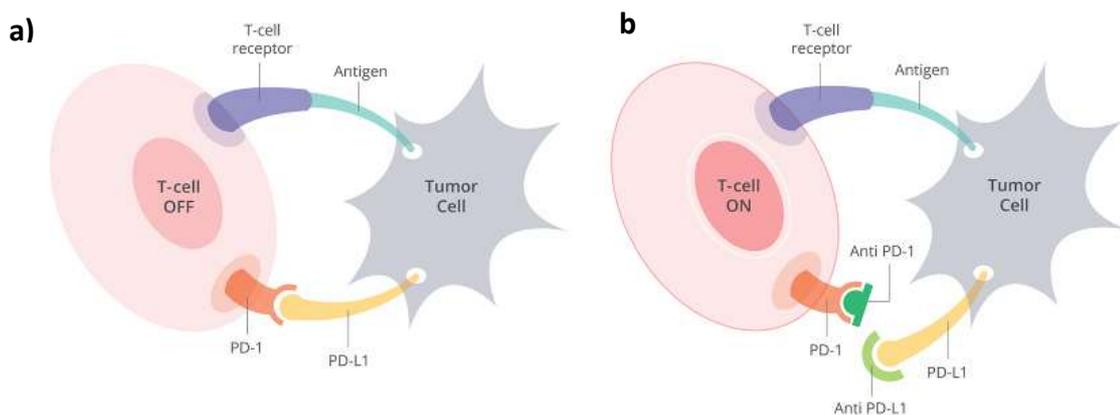


Figura 9 – Representação ilustrativa do mecanismo de ação dos fármacos inibidores de PD-1/PD-L1. Em a) a sobreexpressão de PD-L1 nas células tumorais leva à ligação de PD-L1 ao recetor PD-1 das células T inativando-as, resultando numa resposta imune antitumoral disfuncional. Em b) o uso farmacológico dos inibidores de PD-1/PD-L1 impede a interação entre o recetor PD-1 das células T e o PD-L1 das células tumorais, favorecendo uma resposta imunitária antitumoral funcional. Adaptado de (Benson & Agarwala, 2018).

2.5.2.1. Pembrolizumab e Nivolumab

O pembrolizumab é um anticorpo monoclonal da imunoglobulina G4 (IgG4, do inglês *Immunoglobulin G4*) humanizado. O nivolumab é um anticorpo monoclonal IGg4 totalmente humano. Ambos apresentam o mesmo mecanismo de ação, ou seja, centram-se na inibição do recetor PD-1, impedindo a ligação do recetor PD-1 das células T com os seus ligandos PD-L1/PD-L2 e evitando a inativação das células T. Estes medicamentos atualmente estão aprovados para o tratamento do melanoma avançado e para o NSCLC. Diversos estudos publicados demonstram que estes fármacos são seguros e têm eficácia nestes doentes, resultando na diminuição do crescimento do tumor (Bunney, Zink, Holm, Billington, & Kotz, 2017a; Guo, Zhang, & Chen, 2017).

Contudo, é importante realçar que o pembrolizumab apenas foi aprovado para doentes que expressem PD-L1, contrariamente ao nivolumab que poderá ser utilizado independentemente da expressão do PD-L1. Face a este desafio, encontram-se atualmente em estudo alvos moleculares para além do PD-L1 que possam ser uma mais valia no tratamento deste tipo de neoplasia (R. Chen *et al.*, 2018).

3. Metabolómica

As células cancerígenas têm a capacidade de adaptar o seu metabolismo com o principal objetivo de crescer, sobreviver e proliferar, o que as torna diferentes das células normais. As alterações metabólicas envolvidas fazem com que haja um interesse considerável em as explorar para o desenvolvimento de novas terapias (Mehrmoahadi *et al.*, 2017).

3.1 Hallmarks of Cancer

O ambiente que envolve o desenvolvimento de determinado tumor é responsável por características biológicas específicas que as células cancerígenas adquirem, designadas por *hallmarks* (Figura 10). São elas: a sinalização proliferativa sustentada, a evasão aos supressores tumorais, o escape ao sistema imunitário, o potencial replicativo ilimitado, a promoção da inflamação, a invasão e a metastização, a indução da angiogénese, a instabilidade genómica, a resistência à morte celular e a reprogramação metabólica (Hanahan & Weinberg, 2011).



Figura 10 – Características biológicas específicas adquiridas pelo tumor. Adaptado de (Hanahan & Weinberg, 2011).

As células tumorais surgem devido a várias alterações genéticas e metabólicas, que contribuem para o seu desenvolvimento. As ligações entre o metabolismo e o cancro são multifacetadas, a reprogramação metabólica como a glicólise aeróbia aumentada, as alterações nas enzimas metabólicas constituintes do ciclo de *Krebs* e a dependência do metabolismo lipídico e da glutamina são características-chave das células cancerígenas. Posto isto, a compreensão dessas alterações metabólicas é crucial para o desenvolvimento de novas terapêuticas e identificação de novos biomarcadores (Sreedhar & Zhao, 2017).

Ao longo desta dissertação, dar-se-á ênfase à reprogramação metabólica.

3.2 Metabolismo

O metabolismo celular é descrito como um conjunto de reações ou processos químicos que convertem nutrientes ou moléculas endógenas em produtos necessários à sobrevivência celular, nomeadamente ácidos nucleicos, proteínas e lípidos (Yu, Li, & Zhang, 2017). A molécula que mobiliza todas estas reações é a adenosina trifosfato (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*) (Quintas, Freire, & Halpern, 2008).

O metabolismo, atualmente, tem despertado um particular interesse para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, já que neste processo intervêm oncogenes e genes supressores tumorais que têm como função principal o controlo do crescimento e a divisão celular (Dang, 2012). As células têm a capacidade de utilizar nutrientes que se encontram disponíveis na corrente sanguínea em favor da sobrevivência, crescimento e multiplicação. A glicólise é uma das principais vias metabólicas da qual as células adquirem energia para sustentar o crescimento, a divisão e o controlo do potencial redox (DeBerardinis & Cheng, 2010; Levine & Puzio-Kuter, 2010). Para que a ocorrência destes processos seja bem-sucedida, é necessário sintetizar substratos essenciais para a constituição celular, nomeadamente para os ácidos nucleicos, proteínas e membranas (Levine & Puzio-Kuter, 2010).

3.2.1 Metabolismo da Glicose

A glicose é considerada a molécula mais importante para os organismos vivos, visto que dela dependem para obter energia, para que ocorram todos os processos celulares e metabólicos. Existem três processos, através dos quais é possível obter energia a partir da glicose: a glicólise, que ocorre em condições anaeróbias, a fosforilação oxidativa, que ocorre em condições aeróbias e, por último, a via das pentoses fosfato (X. Li, Gu, & Zhou, 2015).

3.2.1.1 Glicólise

A glicólise (Figura 11), que ocorre no citoplasma, é a via metabólica responsável por converter a glicose em piruvato obtendo-se como produtos finais desta reação, 4 moléculas de ATP, 2 moléculas de NADH (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide reduced form*) e 2 moléculas de piruvato (Quintas *et al.*, 2008). Como representado na Figura 11 diferentes intermediários desta via metabólica poderão levar à produção de nucleótidos, através da via das pentoses fosfato, à produção de acetil-coenzima A e à formação de lactato. Sob condições

de hipoxia, ou seja, quando os níveis de oxigênio são baixos, o piruvato é posteriormente convertido em lactato (Dang, 2012).

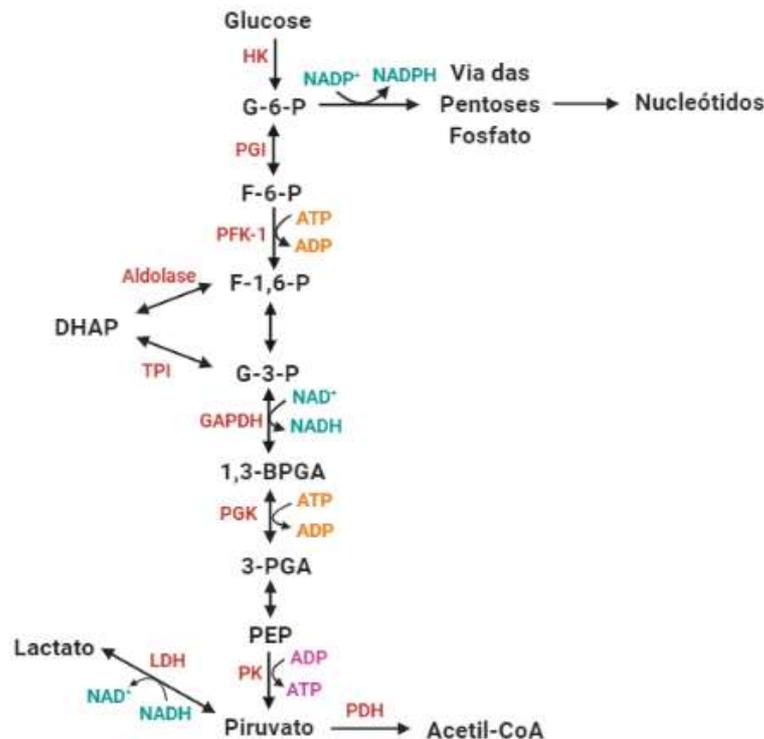


Figura 11 – Representação esquemática do metabolismo da glicose. A glicólise é uma via metabólica na qual intervêm diferentes enzimas específicas, na qual a glicose é catabolizada em piruvato, NADH e ATP. Legenda: G-6-P: Glicose-6-fosfato; F-6-P: Frutose-6-fosfato; F-1,6-P: Frutose-1,6-bifosfato; DHAP: Fosfato de di-hidroxiacetona; G-3-P: Gliceraldeído-3-fosfato; 1,3-BPGA: 1,3-bifosfoglicerato; 3-PGA: 3-fosfoglicerato; PEP: Fosfoenolpiruvato; HK: Hexocinase; PGI: Fosfoglucoisomerase; PFK-1: Fosfofrutocinase I; TPI: Triose fosfato isomerase; GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PGK: Fosfogliceratocinase; PK: Piruvato cinase; LDH: Lactato desidrogenase adaptado de (Muñoz-Pinedo, El Mjiyad, & Ricci, 2012).

3.2.1.2 Fosforilação Oxidativa

As células normais dependem principalmente da fosforilação oxidativa (OXPHOS, do inglês *oxidative phosphorylation*) (Figura 12) mitocondrial para gerar ATP. A via metabólica OXPHOS gera ATP pela transferência de elétrons ao longo de uma série de complexos proteicos transmembranares que se localizam na membrana interna mitocondrial, conhecido como cadeia de transporte de elétrons ou ETC (do inglês, *electron transport chain*). O NADH, FADH₂ e o succinato atuam como doadores de elétrons, à medida que os elétrons passam através dos diferentes complexos proteicos (I-IV), da matriz mitocondrial para o interior do espaço intermembranar. Quando esta via se encontra ativa, há um alto gradiente de prótons que fluem através da membrana interna para a matriz mitocondrial pelo complexo V, havendo uma elevada síntese de ATP pela ATP sintetase. O oxigênio atua como aceitador terminal de elétrons (Ashton, McKenna, Kunz-Schughart, & Higgins, 2018).

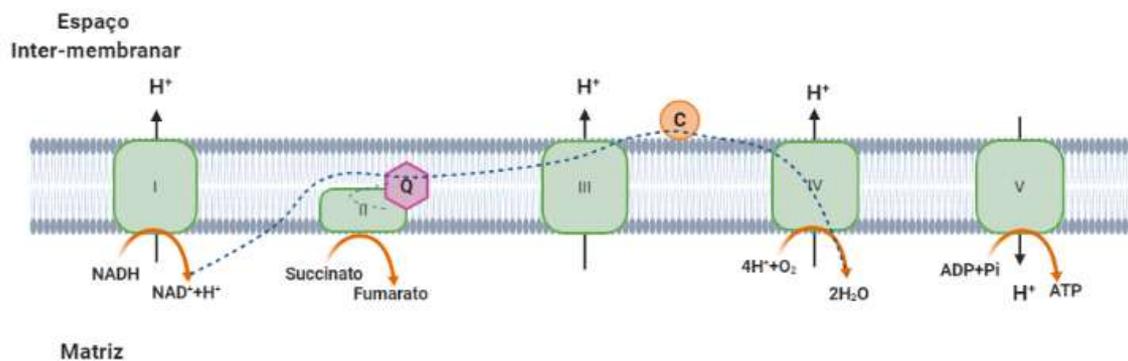


Figura 12 – Representação esquemática da via da fosforilação oxidativa. A via metabólica OXPHOS, gera ATP devido ao transporte de elétrons através de uma série de complexos de proteínas transmembranares localizados na membrana mitocondrial interna, denominada também por ETC. A linha tracejada indica o fluxo de elétrons através do complexo I, complexo II, coenzima Q 10 (Q), complexo III, citocromo c (C) e complexo IV, atuando o O_2 como aceitador final de elétrons. Adaptado de (Ashton et al., 2018).

No entanto, a maioria das células cancerígenas usa como principal via metabólica a glicólise, produzindo piruvato e lactato como metabolitos finais. Embora a glicólise seja ineficiente na produção de ATP, as células cancerígenas em proliferação sob condições nutridas, utilizam a glicose para produzir biomassa (aminoácidos, nucleótidos e lípidos) para sustentar as novas células (Cho, Cha, Kim, Kim, & Yook, 2018). Relativamente à via metabólica OXPHOS, em determinados tipos de cancro a sua atividade encontra-se diminuída, podendo estar relacionada com mutações ao nível do DNA mitocondrial (mtDNA) ou à reduzida quantidade de mtDNA, nomeadamente no cancro da mama, no cancro gástrico, no carcinoma hepatocelular e no NSCLC. Por outro lado está descrito que em alguns cancros, o mtDNA é um dos requisitos para a génese tumoral das células cancerígenas, mediando a resistência a fármacos citotóxicos, já que na maioria dos casos, o metabolismo mitocondrial e a produção de ROS (do inglês, *reactive oxygen species*) são essenciais para a tumorigenicidade (Ashton et al., 2018).

3.2.1.3 Via das Pentoses Fosfato

A via das pentoses fosfato (PPP) (Figura 13) compreende uma etapa inicial que é oxidativa, na qual promove a descarboxilação oxidativa da glicose-6-fosfato (G-6-P) produzindo a ribulose-5-fosfato (Ru-5-P) a qual, por sua vez, é isomerizada em ribose-5-fosfato (R-5-P), que será o precursor dos nucleótidos e de muitas coenzimas nomeadamente o NADPH, FADH e a coenzima A. Por outro lado, através da etapa não oxidativa, a R-5-P é metabolizada para produzir a frutose-6-fosfato (F-6-P) e o gliceraldeído-3-fosfato (G-3-P) que também são fornecidos pela via glicolítica. De um modo geral a etapa oxidativa ocorre no sentido de converter o NADP em NADPH, enquanto que a etapa não oxidativa recicla as

pentoses fosfato originando a G-6-P. A energia proveniente da oxidação da glicose, através desta via, é armazenada sob a forma de NADPH e não de ATP, como acontece na via glicolítica, visto que o NADPH é essencial na eliminação das espécies reativas de oxigênio. Tanto a glicólise, como a via das pentoses fosfato, ocorrem no citosol e encontram-se interligadas através dos intermediários comuns, nomeadamente a G-6-P, a F-6-P e o G-3-P. Assim, estas duas vias desempenham um papel muito importante no apoio à sobrevivência e crescimento de células cancerígenas, produzindo pentose fosfato para a síntese de ácidos nucleicos e fornecendo NADPH, necessário para a síntese lipídica (Cho *et al.*, 2018; Jin & Zhou, 2019).

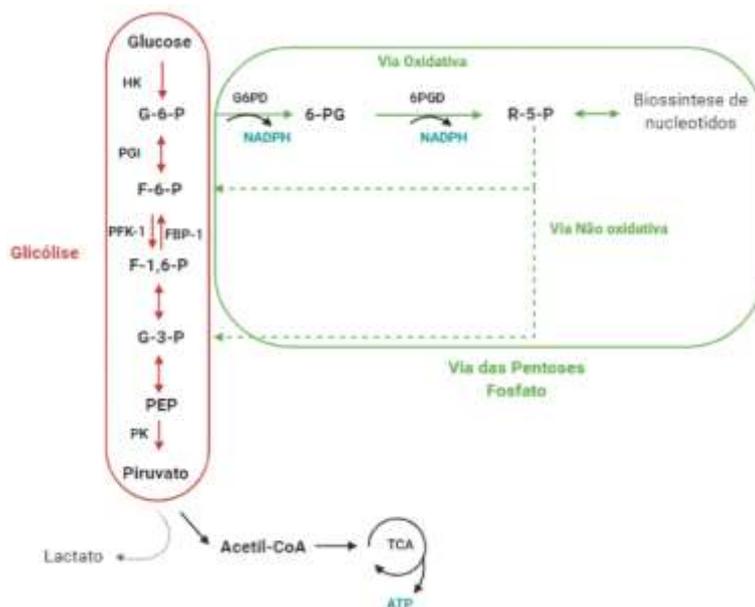


Figura 13 – Representação esquemática das vias da glicólise e pentose fosfato (PPP). As vias da glicólise (representada a vermelho) e das pentoses fosfato (PPP) (representada a verde). As setas unidirecionais indicam etapas enzimáticas irreversíveis, enquanto que as setas bidirecionais indicam reações reversíveis. As setas representadas a vermelho dizem respeito à via glicolítica e as setas a verde contínuas dizem respeito à via oxidativa das PPP enquanto que as setas a tracejado e verde dizem respeito à via não oxidativa das PPP. Legenda: G-6-P: glicose-6-fosfato; F-6-P: frutose-6-fosfato; F-1,6-P: frutose-1,6-bifosfato; G-3-P: gliceraldeído-3-fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; 6-PG: 6-fosfogluclactona; R-5-P: ribose-5-fosfato; HK: hexoquinase; PFK-1: fosfofructocinase-1; FBP-1: fFrutose-1,6-bifosfatase; PK: piruvato-quinase; G6PD: glicose-6-fosfato desidrogenase; 6-PGD: 6-fosfogluconato desidrogenase. Adaptado de (Jin & Zhou, 2019).

3.2.2 Ciclo de Krebs

O ciclo de Krebs, ciclo do ácido cítrico ou ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA, do inglês, *tricarboxylic acid cycle*) (Figura 14) envolve uma série de reações químicas que produzem energia através da oxidação do piruvato. Ele é responsável por fornecer precursores para a biossíntese de biomoléculas, como os aminoácidos e NADH. Este último é utilizado pela cadeia de transporte de eletrões, convertido em NAD⁺ (do inglês, *Nicotinamide adenine dinucleotide*) e, posteriormente, produz energia na forma de ATP. O TCA é considerado o centro metabólico mais importante da célula e ocorre principalmente nas mitocôndrias, em contraste com a glicólise que ocorre no citosol. O ciclo de Krebs envolve uma sequência de

etapas catalisadas por diferentes enzimas. Pequenas mutações ou alterações nos genes que codificam estas enzimas podem levar ao desenvolvimento do processo carcinogênico (Ryan *et al.*, 2019; Sreedhar & Zhao, 2017).

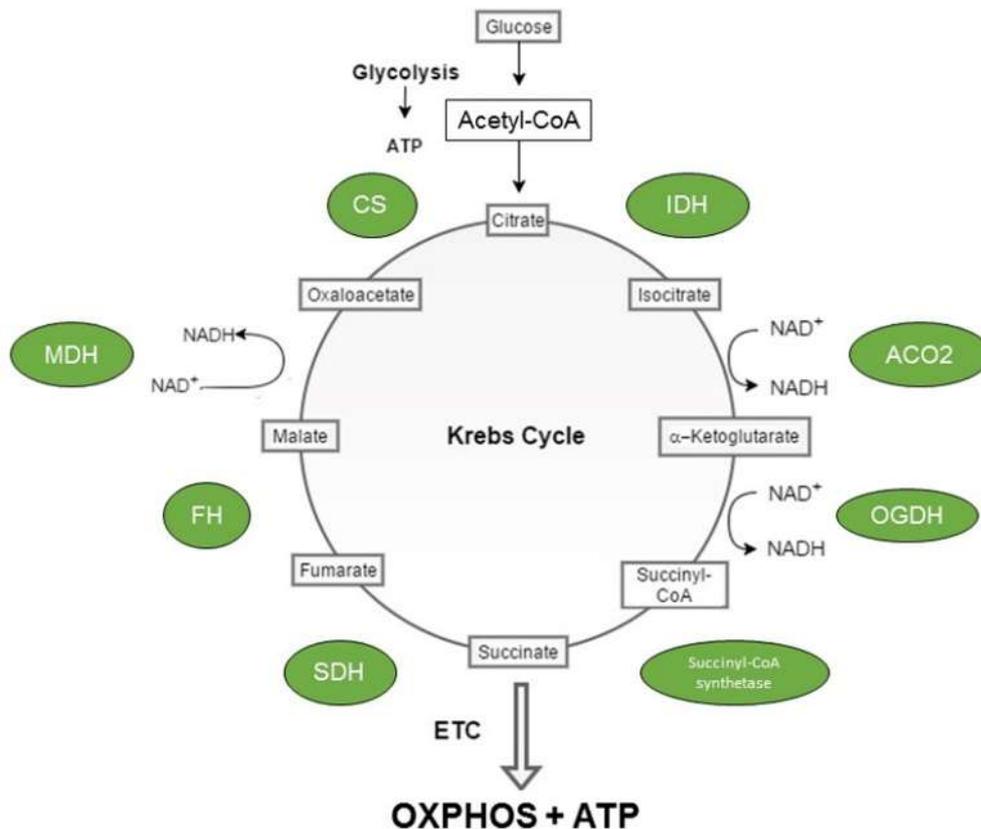


Figura 14 – Ciclo de Krebs. O ciclo de Krebs é uma via metabólica que ocorre na matriz mitocondrial. Um ciclo completo é catalisado por uma série de reações enzimáticas, catalisadas por diferentes enzimas, tais como a citrato sintetase (CS), isocitrato desidrogenase (IDH), aconitase (ACO2), α-cetoglutarato desidrogenase (OGDH), succinil-CoA sintetase, succinato desidrogenase (SDH), fumarase (FH) e a malato desidrogenase (MDH). A sua função principal é fornecer precursores para a biossíntese de biomoléculas. O NADH por sua vez será utilizado pela cadeia de transporte de elétrons (ETC) e convertido em NAD⁺ para produzir ATP através da via oxidativa fosforilativa (OXPHOS). Retirado de (Ryan *et al.*, 2019).

3.3 Reprogramação Metabólica

A reprogramação metabólica é considerada um dos *hallmarks* do cancro. As células cancerígenas são caracterizadas por apresentarem um fenótipo comum que consiste na proliferação celular desregulada. No entanto, para que este processo ocorra de forma eficiente e garanta a sua sobrevivência, precisam de produzir energia e nutrientes. Para que a célula cancerígena se possa dividir e multiplicar descontroladamente é necessário que ocorram alterações metabólicas como, por exemplo, eventos oncogénicos sucessivos onde se inserem a ativação de determinados oncogenes e/ou a perda ou mutação de genes supressores tumorais, o que comprometerá as vias metabólicas e, conseqüentemente, alterará todo o

microambiente celular. O microambiente tumoral é caracterizado por apresentar níveis baixos de oxigênio e escassez de nutrientes, pelo que as células tumorais se terão de adaptar, reprogramando as suas vias metabólicas de modo a produzir o máximo de energia possível e obter, com eficiência, os nutrientes necessários à sua sobrevivência (Beloribi-Djefafia, Vasseur, & Guillaumond, 2016).

Os eventos adaptativos com maior destaque ao nível do metabolismo das células cancerígenas centram-se na captação exacerbada de glicose, levando ao aumento da produção de lactato; e na dependência da glutamina, que é necessária para a biossíntese dos aminoácidos, dos nucleótidos e dos lípidos. Deste modo, destaca-se a importância de estudar o metabolismo da glicose, dos aminoácidos e dos lípidos no cancro, visto que estes nutrientes intervêm em diferentes vias e o seu metabolismo é regulado por diversos genes (Beloribi-Djefafia *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2019). A capacidade de adaptação de uma célula relativamente à privação de determinado nutriente depende de diversos fatores de regulação, como por exemplo de proteínas supressoras tumorais e alterações genéticas e metabólicas que apresentam, depende da glicose e da síntese dos lípidos e aminoácidos para obterem os nutrientes necessários à sua sobrevivência (Kaelin & Thompson, 2010; Miranda-Gonçalves, Lameirinhas, Henrique, & Jerónimo, 2018).

3.3.1 Efeito Warburg

Em condições aeróbias, as células normais produzem o piruvato a partir da glicólise no citosol, que posteriormente será encaminhado para o ciclo de *Krebs* na mitocôndria. Dessa reação resultará o NADH, que promove a fosforilação oxidativa para produzir ATP, e uma quantidade mínima de lactato. Contudo, em condições de hipoxia, ou seja, baixas concentrações de oxigênio, as células normais produzem grandes quantidades de lactato a partir do piruvato, através da via da glicólise (Liberti & Locasale, 2016).

As células tumorais apresentam uma característica particular, na medida em que preferem converter o piruvato em lactato, ou seja preferem a via da glicólise, em vez de prosseguir para a próxima etapa, mesmo em condições aeróbias normais, sendo este processo designado de glicólise aeróbia ou efeito de *Warburg* (Figura 15) (Coelho, Fortunato, & Carvalho, 2018; X. Li *et al.*, 2015).

A proliferação desregulada que desencadeia o processo tumorigénico é iniciado devido a ajustes no metabolismo energético como, por exemplo, a ativação ou inativação de algumas vias de sinalização molecular, com o objetivo de estimular o crescimento e a divisão celular, adaptando-se às condições adversas presentes no ambiente. Entre as vias mais frequentemente

alteradas temos a via PI3K (do inglês, *Phosphatidylinositol-3-kinase*), que é ativada quando ocorrem mutações nos genes supressores tumorais, favorecendo a proliferação das células alteradas (Amorim, Vieira, Gonçalves, Rhana, & Rodrigues, 2018).

Resumindo, as células cancerígenas, tornam-se capazes de produzir grandes quantidades de lactato, independentemente da presença ou ausência de oxigênio (Hanahan & Weinberg, 2011; Vander Heiden, Cantley, & Thompson, 2009).

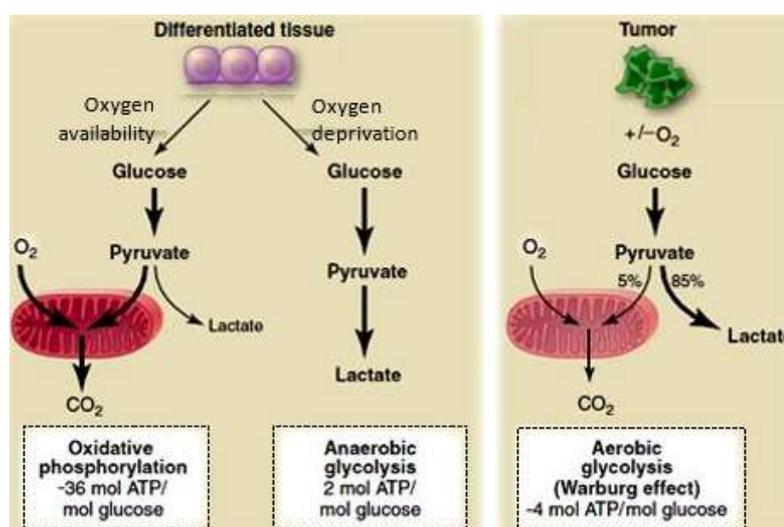


Figura 15 – Representação esquemática das diferenças entre a fosforilação oxidativa e glicólise anaeróbica nas células normais e o efeito de Warburg nas células tumorais. O metabolismo das células cancerígenas é caracterizado pela predominância da via glicolítica face à oxidação fosforilativa, havendo elevada produção de lactato. Adaptado de Heiden, Cantley & Thompson, 2009.

3.3.2 Glicólise Aeróbia

As células normais, dependem majoritariamente do metabolismo oxidativo para obter a energia necessária para as suas funções e para o seu crescimento, metabolismo esse responsável por converter a glicose em dióxido de carbono e água e produzir energia na forma de ATP. Assim sendo, a glicose é então convertida em piruvato pela via da glicólise, obtendo-se 4 moléculas de ATP, tendo em consideração que duas destas são consumidas nesta reação. O piruvato, por sua vez, irá integrar o ciclo de *Krebs* nas mitocôndrias obtendo-se 36 moléculas de ATP. Assim sendo, numa célula normal, a partir de uma única molécula de glicose, obtêm-se 38 moléculas de ATP (Stubbs & Griffiths, 2010).

Nas células tumorais isto não acontece, dado que a oxidação do piruvato é substituída pela produção de lactato, catalisada pela LDH (do inglês, *lactate dehydrogenase*), sem produção de ATP; assim, uma molécula de glicose origina apenas 2 moléculas de ATP, pelo que as células malignas apresentam taxas de glicólise elevadas com o intuito de aumentar a produção de ATP (X. Li et al., 2015). Deste modo, uma das principais características que define as células

tumorais é o elevado consumo de glicose e o aumento da produção da quantidade de lactato relativamente às células normais. Esta adaptação deve-se ao uso contínuo da via metabólica glicolítica, mesmo na presença adequada de oxigénio (Gatenby & Gillies, 2007; Stubbs & Griffiths, 2010). A produção mínima de ATP, que é proporcionada pela glicólise relativamente à fosforilação oxidativa mitocondrial, que ocorre nas células cancerígenas, é compensada em parte pela regulação positiva dos transportadores de glicose, nomeadamente os GLUTs (do inglês, *glucose transporter*), resultando num aumento de importação de glicose para o citoplasma. Pensa-se que estas adaptações glicolíticas que as células malignas adquirem estão relacionadas com a ativação dos oncogenes *RAS* e *MYC* e com a inativação de genes supressores tumorais, como o *TP53* (do inglês, *tumour protein p53*); bem como com a alteração de outras vias metabólicas, da glutamina, da síntese de ácidos nucleicos e de lípidos (Dang, 2012; Diaz-Ruiz, Rigoulet, & Devin, 2011). Como referido anteriormente, a maioria das células cancerígenas depende da glicólise aeróbia para a produção de ATP e, a enzima LDH, que catalisa a conversão do piruvato em lactato, é a chave para determinar o fenótipo glicolítico das células cancerígenas. Assim, a LDH é um alvo promissor para a terapia antitumoral, indicando que a capacidade seletiva da glicólise nestas células representa uma potencial abordagem eficaz no tratamento de diferentes cancros (Sreedhar & Zhao, 2017).

3.3.3 Via metabólica dos aminoácidos

Os aminoácidos são considerados combustíveis essenciais para reações biossintéticas, pelo que estão intrinsecamente envolvidos no metabolismo celular. Como mencionado, as células cancerígenas são caracterizadas por apresentarem um metabolismo alterado, com diversas modificações em múltiplas vias metabólicas. Os aminoácidos são imprescindíveis às células cancerígenas, já que contribuem para a sua proliferação, pois fornecem nutrientes (Zhang, Pavlova, & Thompson, 2017).

A glutamina, apesar de não ser um aminoácido essencial, é crucial para a proliferação celular, não só porque é o aminoácido que existe em maior quantidade no corpo humano, como também é utilizado como fonte primária de carbono para a produção de energia, como também para a síntese de outras macromoléculas, nomeadamente nucleótidos, aminoácidos e lípidos. Algumas células tumorais são caracterizadas como sendo dependentes de glutamina, exibindo elevadas taxas de captação deste aminoácido (Suzanne Klimberg & McClellan, 1996).

3.3.3.1 Glutaminólise

A glutaminólise ou metabolismo da glutamina, que cataboliza a glutamina para produzir ATP e lactato, é uma via metabólica que envolve a desaminação inicial da glutamina pela GLS (do inglês, *glutaminase*), que resulta na produção do glutamato e amónia. O glutamato é convertido em alfa-cetoglutarato, um intermediário do TCA, para produzir ATP e carbonos para a síntese de aminoácidos, nucleótidos e lípidos. Além do seu papel crítico no fornecimento de carbono e nitrogénio para a síntese destas macromoléculas, a glutaminólise também tem um papel importante na regulação do equilíbrio redox, na sinalização celular e nos mecanismos de apoptose e autofagia (Figura 16) (Bunney, Zink, Holm, Billington, & Kotz, 2017b).

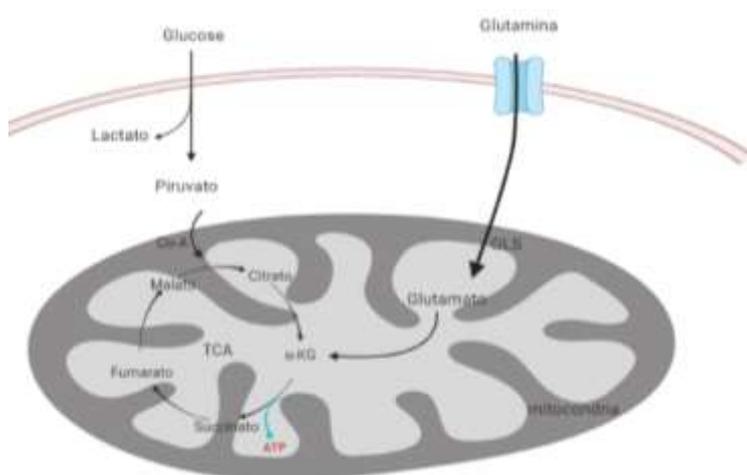


Figura 16 – Glutaminólise. A glutamina é transportada através de transportadores, para integrar a via da glutaminólise. A via da glutaminólise envolve uma desaminação inicial da glutamina pela GLS, resultando na produção de glutamato e amónia. Por sua vez, o glutamato é convertido em α -KG, que produzirá ATP e carbonos para a síntese de outras macromoléculas. GLS: glutaminase; α -KG: α -cetoglutarato; TCA: ciclo de Krebs. Adaptado de Jin, Alesi, & Kang, 2017.

A alteração do metabolismo deste aminoácido, nomeadamente a nível dos seus recetores tem sido demonstrada em diversos tipos de cancro, nomeadamente no cancro do pulmão (Sierra, Cordova, Chen, & Rajadhyaksha, 2015).

A importância da glutamina no metabolismo tumoral deriva de características partilhadas com a glicose, pois ambos os nutrientes são considerados os mais essenciais, dado que, do ponto de vista energético, fornecem a maior parte da energia necessária para sustentar o crescimento e a divisão celular, e ainda participam como intermediários para a síntese de macromoléculas. De facto, a glutamina está envolvida em numerosas vias anabólicas, tais como dos ácidos nucleicos, podendo ser degradada no ciclo de Krebs que, posteriormente, fornecerá precursores para a biossíntese de outras macromoléculas e para a produção de energia (DeBerardinis & Cheng, 2010; Hodge & Apkarian, 1990).

Altas concentrações extracelulares de glutamina estimulam o crescimento tumoral promovendo a proliferação celular, inibem a morte celular e são essenciais na transformação metabólica. Além disso, o fluxo de enzimas mitocondriais envolvidas na oxidação da glutamina e do glutamato é elevado nas células tumorais quando comparado com as células normais (Bunney *et al.*, 2017b).

Deste modo, o bloqueio do metabolismo da glutamina, que é uma via obrigatória para a proliferação de células tumorais, interferirá com a captação de glicose. A inibição pode ser eficaz em restringir o crescimento de células do cancro através da limitação da disponibilidade de um nutriente essencial para o crescimento celular. Como tal, a inibição combinada da glicólise e da glutaminólise, pode ser especialmente eficaz na identificação das células tumorais altamente glicolíticas, sendo vista como um possível alvo terapêutico (Dang, 2012).

3.3.4 Via Metabólica dos Lípidos

A investigação científica focada no metabolismo lipídico (Figura 17) das células cancerígenas tem gerado evidências de que este apresenta alterações específicas. Essas modificações podem afetar a disponibilidade de lípidos estruturais para a síntese de membranas, como também a síntese e a degradação de lípidos que contribuem para a homeostase energética e, conseqüentemente, afetam os processos de sinalização celular que posteriormente se refletem na desregulação do crescimento e proliferação celular (Santos & Schulze, 2012).

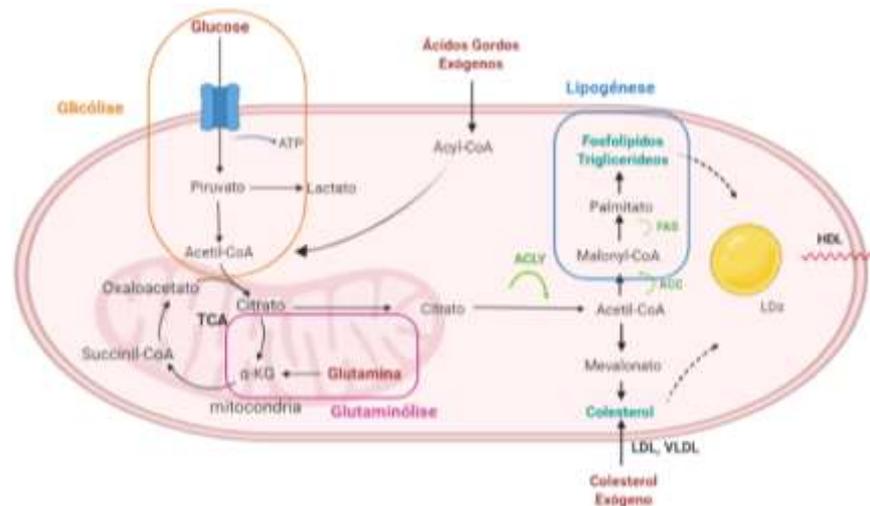


Figura 17 – Representação esquemática simplificada das principais vias metabólicas lipídicas alteradas nas células cancerígenas. Os ácidos gordos são obtidos através da dieta (ácidos gordos exógenos) ou sintetizados de novo (lipogênese), ou seja, síntese de triglicerídeos e colesterol. O citrato pode ser derivado da glicose (glicólise) e/ou da glutamina (glutaminólise). Os ácidos gordos em excesso podem ser armazenados em LDs (Lipid droplets) ou libertados na corrente sanguínea (HDL). As células cancerígenas são capazes de absorver estes ácidos gordos para obter energia podendo também absorver colesterol exógeno, transportado por LDL e lipoproteínas de baixa densidade (VLDL). Adaptado de (Beloribi-Djefaffia *et al.*, 2016).

Os lípidos são considerados uma das principais classes de moléculas biológicas, na qual se inserem os triacilglicerídeos, fosfoglicerídeos, esteróis e os esfingolípido, sendo a sua característica particular o facto de serem moléculas insolúveis em água. Para além disso, desempenham papéis importantes a nível celular e estrutural. Os ácidos gordos são os principais componentes da síntese de triacilglicerídeos que são usados principalmente para o armazenamento de energia. Por outro lado, os fosfolípidos, os esteróis e os esfingolípido são os principais componentes estruturais das membranas. Os lípidos também desempenham funções importantes na sinalização celular (Beloribi-Djefafia *et al.*, 2016; Muro, Atilla-Gokcumen, & Eggert, 2014).

Devido às suas funções diversificadas, os lípidos contribuem para vários aspetos da biologia do tumor, quer a nível do crescimento, da produção de energia e homeostasia, como também na disseminação das células cancerígenas. A elevada proliferação destas células requer não só energia, como também uma rápida síntese de lípidos para formar as novas membranas celulares. Estudos realizados, a nível da expressão génica, revelam que as células cancerígenas apresentam expressões elevadas das enzimas envolvidas nas vias de lipogénese e síntese de colesterol, como por exemplo acetil-CoA, a carboxilase, a FASN (do inglês, *fatty acid synthase*) e a citrato liase (ACLY do inglês, *ATP citrate lyase*), com o intuito de aumentar as taxas de captação de lípidos e colesterol, bem como ativar a síntese endógena destas macromoléculas (lipogénese) (Beloribi-Djefafia *et al.*, 2016).

Assim, estudar todo o metabolismo celular torna-se imprescindível para compreender toda a mecanística tumoral envolvente, pela busca de um diagnóstico e, posteriormente, num tratamento mais adequado para cada tipo de tumor.

De um ponto de vista geral, quando uma via metabólica está alterada, consequentemente, todas as outras vias metabólicas subjacentes vão sofrer alterações, já que existe uma interligação entre todo o metabolismo da célula, tornando-se de extrema importância a compreensão dos mecanismos que levam a essa reprogramação metabólica nas células cancerígenas (Sreedhar & Zhao, 2017).

O aumento do consumo de glicose, a produção de lactato, as taxas elevadas da síntese de aminoácidos, lípidos, nucleótidos e a capacidade proliferativa acentuada, são fatores característicos do perfil metabólico de quase todos os tipos de células cancerígenas, que sustentam o seu rápido crescimento celular.

3.4 Metabolómica na Clínica Oncológica

Na última década, o conhecimento sobre o metabolismo tumoral tem vindo a tornar-se uma mais valia, sendo amplamente inferido a partir de alterações na expressão de genes e proteínas. Contudo, esta abordagem não integra fatores como modificações pós-traducionais ou compartimentação metabólica, fornecendo um quadro incompleto do fenótipo metabólico maligno. Com o avanço científico e o desenvolvimento de técnicas analíticas como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*), tem sido possível a avaliação direta do metabolismo e dos respetivos metabolitos, quer a nível dos tecidos, quer nos fluidos biológicos, fornecendo informações importantes e que se tornam imprescindíveis para um melhor entendimento face ao metabolismo tumoral (Fiehn, 2002; Markley *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2011; Ruiying *et al.*, 2020). A metabolómica, integra a área das “ómicas” e tem por objetivo complementar conceitos que a genómica, a transcriptómica e a proteómica fornecem. Desta forma, a metabolómica tem permitido a identificação de novos biomarcadores de diagnóstico, de prognóstico e de recidiva e de possíveis alvos terapêuticos e, eventualmente facilitar a interpretação de fenótipos celulares (Markley *et al.*, 2017; Nicholson, Lindon, & Holmes, 1999).

A metabolómica é descrita como o estudo de processos biológicos que se baseia na identificação e quantificação de todos os metabolitos, presentes nas células, que participam no crescimento e na manutenção das funções celulares (Fiehn, 2002). Por outro lado, a metabonómica consiste na medição quantitativa de uma determinada resposta metabólica por parte dos sistemas constituintes de um organismo face a estímulos fisiopatológicos ou devido a modificações genéticas (Nicholson *et al.*, 1999).

De uma maneira geral, o estudo do perfil metabolómico passa pela identificação de mais de um alvo, por exemplo, de metabolitos que podem ser característicos de uma doença, ou que se expressam de acordo com os efeitos bioquímicos de um fármaco (Brennan, 2014).

Os metabolitos são moléculas de baixo peso molecular, envolvidas no metabolismo intermediário em que a sua concentração influencia modificações e expressões de determinadas proteínas. Esta concentração pode depender de fatores constituintes do próprio genoma, do estilo de vida e do meio-ambiente envolvente. Posto isto, a interação entre o genoma e o ambiente influencia o metaboloma que, por sua vez, se reflete no estado fisiológico geral de um organismo (Markley *et al.*, 2017).

A relação entre as alterações metabólicas e o aumento da glicólise e a diminuição da fosforilação oxidativa (o “efeito Warburg”) no cancro estão bem documentadas. Posto isto, o principal interesse foca-se nos componentes da via glicolítica, na síntese de nucleotídeos,

aminoácidos e ácidos gordos (Miyamoto *et al.*, 2015). Atualmente, o conhecimento do metabolismo do cancro do pulmão é limitado e amplamente deduzido apenas da alteração da expressão de genes ou proteínas e, por essa razão, a aplicação da metabolómica ao estudo do cancro de pulmão tem-se intensificado ao longo dos anos (Noreldeen, Liu, & Xu, 2020).

Podem ser utilizados diferentes tipos de amostras em estudos metabólicos, incluindo células em cultura, tecidos e biofluidos (ex. a urina e o sangue). Mais de 150 metabolitos, detetados em diversas matrizes biológicas por diferentes plataformas analíticas metabolómicas, têm sido relacionados com o metabolismo alterado do cancro de pulmão. Alguns resultados foram consistentes em vários estudos publicados; no entanto, há uma clara variabilidade entre os artigos e não há resultados definitivos sobre o efeito da terapia na evolução do perfil metabolómico (L. Huang *et al.*, 2020; Merz & Serkova, 2009).

Assim, o estudo do perfil metabolómico torna-se imprescindível na monitorização e identificação de diferentes metabolitos intervenientes em diferentes vias metabólicas, que possam ser reconhecidos como alvos terapêuticos característicos do cancro do pulmão, fornecendo informações relevantes na identificação de possíveis biomarcadores.

Capítulo II. Objetivos

Um dos principais desafios com que a comunidade médica se debate atualmente relativamente ao cancro do pulmão é que mais de 61% dos doentes são diagnosticados nos estádios avançados III e IV, quando as opções terapêuticas são limitadas e a sobrevida a 5 anos pode ser tão baixa quanto 4%. Em contraste, a sobrevida a 5 anos de doentes com cancro de pulmão em estágio inicial e localizado é de cerca de 50%. Embora tenha havido grandes avanços no tratamento do cancro do pulmão nos últimos 10 anos, esta continua a ser uma doença para a qual novas estratégias de tratamento são urgentemente necessárias. Essas estatísticas fornecem forte motivação para a procura de biomarcadores que possam auxiliar na deteção precoce do cancro de pulmão. Até ao momento, esses biomarcadores não são clinicamente utilizados (Haznadar *et al.*, 2016a).

Perante o enorme desafio que é tratar o doente, e tendo em linha de conta todos os constrangimentos assinalados, é impreterível procurar resposta na investigação de fatores de natureza biológica e clínica, suscetíveis de identificar alvos moleculares passíveis de intervenção terapêutica, tanto a montante, em termos de prevenção e prognóstico, como de uma terapêutica dirigida com um caráter curativo e claramente personalizada. Estes são, em linhas gerais, os resultados e a aplicabilidade prática que se pretende alcançar com esta dissertação.

Um dos objetivos inicialmente propostos para esta dissertação de mestrado seria caracterizar o perfil metabolómico de células de cancro do pulmão do tipo NSCLC, previamente expostas aos regimes terapêuticos QT ou ICPIs, com vista à identificação de metabolitos e vias metabólicas responsáveis pelos mecanismos que promovem a progressão tumoral, recidiva e, eventualmente, resistência à terapia. Contudo, devido aos constrangimentos relacionados com a pandemia da COVID-19 e devido a questões técnicas associadas a uma avaria no equipamento de ressonância magnética nuclear, no qual seriam analisadas as amostras acima indicadas, não foi possível a obtenção dos resultados da metabolómica e, por conseguinte, não se conseguiu alcançar este objetivo.

Os objetivos secundários incluem a determinação das curvas de proliferação com posterior determinação da concentração inibitória média de fármaco (IC_{50} , do inglês *half maximal inhibitory concentration*) para depois proceder à otimização do tempo e das concentrações de exposição aos diferentes regimes terapêuticos nas diferentes linhas celulares de cancro de pulmão do tipo NSCLC a usar nos estudos subsequentes. Seguidamente, pretende-se comparar os perfis metabolómicos das diferentes linhas celulares de NSCLC de

culturas controlo e de culturas expostas aos regimes terapêuticos, tanto de QT como dos ICPIs, com o intuito de identificar novos biomarcadores que possam apresentar utilidade para o desenvolvimento de novas terapias.

Em conclusão, este estudo pretende não só destacar o potencial da metabolómica para melhorar a compreensão atual do metabolismo alterado do cancro de pulmão e tentar revelar novos perfis de marcadores com valor de prognóstico, mas também contribuir para o desenvolvimento de novas técnicas e terapias que possam ajudar no tratamento desta neoplasia.

Capítulo III. Materiais e Métodos

O presente capítulo descreve os materiais e os procedimentos experimentais utilizados ao longo deste trabalho, incluindo a cultura de células, os ensaios experimentais, a preparação de amostras para análise, aquisição de dados de RMN e a respetiva análise dos mesmos recorrendo aos métodos estatísticos.

I. Culturas Celulares

Esta secção descreve as respetivas linhas celulares e os protocolos de propagação celular utilizados nesta dissertação.

I.1 Linhas Celulares

Duas linhas celulares tumorais humanas foram usadas ao longo deste trabalho, sendo elas A549 (ATCC® CCL-185™) e H1299 (ATCC® CRL-5803™).

A linha celular A549, foi iniciada em 1972 por D. J. Giard, através da cultura de explantes do tecido carcinomatoso pulmonar de um doente caucasiano do género masculino com 58 anos de idade. Esta linha celular é representativa de NSCLC do subtipo adenocarcinoma que representa as células basais do epitélio alveolar, sendo classificadas como células alveolares do tipo II ou pneumócitos do tipo II. As células A549 apresentam positividade para a imunoperoxidase, para a queratina e sintetizam lecitina com percentagem elevada de ácidos gordos, através da via da difosfocolina citidina (Giard *et al.*, 1973).

A linha celular NCI-H1299, designada por H1299, é uma linha de células epiteliais de NSCLC, que foram obtidas a partir de tecido isolado de um gânglio linfático de um doente do género masculino de 43 anos de idade, caucasiano. As células desta linha são capazes de sintetizar o peptídeo neuromedina B (do inglês *peptide neuromedin B*) (Phelps *et al.*, 1996).

É importante realçar que as células da linha celular A549 expressam o gene *TP53* na forma normal (TP53wt), enquanto as células da linha celular H1299 não expressam (TP53null).

2. Ensaio laboratoriais

2.1 Manutenção das Culturas Celulares

A linha celular A549 foi cultivada em meio RPMI-1640 (do inglês *Roswell Park Memorial Institute*, Sigma, R4130), e a linha celular H1299 foi cultivada em meio DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma, D5648). Ambos os meios foram previamente suplementados com soro bovino fetal a 5% (FBS, do inglês *fetal bovine serum*, Sigma, F7524), 1% de antibiótico (Sigma, A5955; 100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomicina), 1 mM de piruvato de sódio (Gibco, 11360) para o RPMI e 0,25 mM de piruvato de sódio para o DMEM. Estas linhas celulares foram cultivadas e mantidas em monocamada aderente a 37°C em atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂ em incubadora (Binder).

2.2 Caracterização das Linhas Celulares

O desenvolvimento da biologia molecular e a evolução das técnicas utilizadas, permitiu aos patologistas classificar os diferentes tipos de cancro, tornando uma mais valia na compreensão do mecanismo do cancro de pulmão, facilitando o diagnóstico mais precoce e a prescrição de tratamento mais adequada. Posto isto, tornou-se essencial confirmar o tipo histológico das linhas celulares utilizadas nesta dissertação. Assim recorre-se à imunocitoquímica que utiliza um conjunto de anticorpos específicos para a caracterização e diferenciação histológica dos diversos tipos e subtipos de cancro.

Diversos estudos sugerem que a napsina A, TTF-1, CK7, CK5/6 são marcadores moleculares representativos de adenocarcinoma de pulmão (J. Wang *et al.*, 2020).

As linhas celulares foram submetidas a caracterização morfológica e imunocitoquímica. Foram centrifugadas numa citocentrífuga (Shandon Cytospin II), a 767xG durante 3 minutos, posteriormente centrifugou-se o material remanescente com recurso a uma centrífuga (Heraeus Sepatech Labofuge Ae), a 1021xG durante 5 minutos, para coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) e estudos imunocitoquímicos.

A caracterização imunocitoquímica foi efetuada numa plataforma dedicada (Ventana Marker Platform Bench Mark ULTRA IHC/ISH), com recurso a um sistema de deteção multimérico indireto conjugado com biotina, livre de biotina (Optiview DAB IHC Detection Kit, Ventana Medical Systems), com temperatura otimizada a 36°C.

A tabela 2 indica os respetivos anticorpos utilizados.

Tabela 2 – Anticorpos utilizados na caracterização imunocitoquímica.

Antígeno	Clone	Diluição	Recuperação antigénica	Fonte
CK5/6	D5/16B4	1:200	Ultra CCI	Dako
CK7	OV-TL12/30	1:150	Ultra CCI	Dako
Napsina A	IP 64	1:100	Ultra CCI	Novocastra
Ki67	MIB-1	1:50	Ultra CCI	Dako
TTF1	SP141	Pronto a usar	Ultra CCI	Ventana
PD-L1	22C3	1:40	Ultra CCI	Dako

2.3 Avaliação da Citotoxicidade

2.3.1 Ensaio de Exclusão do Azul de Tripano

O método de exclusão do azul de tripano é usado como um método padrão para a quantificação de células vivas. Este método baseia-se principalmente na integridade das membranas celulares. As células vivas são caracterizadas por possuir membranas celulares intactas, desta forma o corante azul de tripano não atravessa as membranas, enquanto as células que apresentam um comprometimento na membrana, aparecem coradas de azul quando observadas ao microscópio (Lamego, 2015).

As linhas celulares utilizadas são aderentes, portanto necessitam de ser destacadas do frasco de cultura, recorrendo a métodos enzimáticos, com o intuito de preparar as suspensões celulares. Assim, inicialmente descartou-se o meio de cultura e procedeu-se à lavagem das culturas celulares com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*¹, e incubaram-se a 37 °C (temperatura ótima para a atuação da solução enzimática) com 2 mL de uma solução de TrypLE Express™ (Gibco, 12605-028). Após inativação da solução enzimática adicionando-se 4 mL de meio de cultura, procedeu-se à determinação da concentração da suspensão celular. Para tal, recorreu-se ao método de exclusão do azul tripano (0,02%), com a finalidade de obter a concentração de células vivas da suspensão celular. Procedeu-se então da seguinte forma: diluíram-se 20 µL da suspensão celular obtida inicialmente em igual volume de azul tripano e realizou-se a contagem num microscópio invertido (Motic, AE31) com a ampliação ocular de 10 vezes, utilizando um hemocitómetro (Figura 18). Após efetuar os cálculos segundo a Equação 1, determinou-se o número de células

¹ PBS: 137 mM de NaCl (Sigma, S7653), 2,7 mM de KCl (Sigma, P9333), 10 mM de NaH₂PO₄ (Sigma, S5011) e 1,8 mM de KH₂PO₄ (Sigma, P0662), pH 7,4.

por mL. Por último, adicionou-se meio de cultura à suspensão celular de forma a obter a concentração celular pretendida, de acordo com o estudo a realizar.

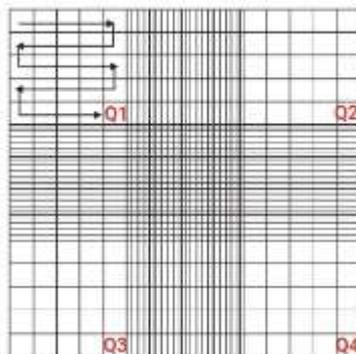


Figura 18 – Representação ilustrativa da câmara de Neubauer. Para determinar a concentração da suspensão celular é necessária uma câmara de Neubauer na qual se faz a contagem de células viáveis recorrendo ao método de exclusão do azul tripano. A contagem faz-se como indicado pelas setas pretas, procedendo do mesmo modo em todos os quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4) e por fim calcula-se a média.

$$[\text{Celular}] = x \times 2 \times 10000$$

Equação 1 – Cálculo da concentração celular (n° cell/mL), em que x é a média das células contadas nos 4 quadrantes do hemocitómetro.

2.3.1.2 Tratamento das Culturas

Neste tópico, será abordado o procedimento relativamente à exposição das células aos fármacos, com o objetivo de traçar curvas de proliferação. Primeiramente, avaliou-se o efeito dos fármacos isoladamente e, por último, testaram-se as combinações que normalmente se usam na prática clínica para o tratamento do cancro do pulmão. A carboplatina (Carboplatina Accord 10 mg/mL) e a cisplatina (Cisplatina Accord 1mg/mL) são fármacos usados isoladamente ou em combinação, por outro lado, o pemetrexede (ALIMTA® 25 mg/mL) e a gemcitabina (Gemcitabina Hikma 40 mg/mL) são fármacos que se usam apenas em associação com outros fármacos.

Os fármacos utilizados no procedimento experimental desta dissertação foram cedidos pela Farmácia do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra.

2.3.1.2.1 Monoterapia

Para as experiências de exposição a um fármaco, semearam-se 5×10^4 células por mL de A549 ou H1299 em placas de 48 poços. Após esperar 24 horas para a adesão das células, os ensaios foram iniciados, adicionando um volume conhecido de fármaco de forma a obter as concentrações descritas na Tabela 3. Em monoterapia, para obter as diversas

concentrações, variou-se o volume da solução stock, consoante o tipo de linha celular. Na Tabela 3 estão apresentadas as gamas de concentrações de fármacos testadas em monoterapia, com o objetivo de traçar as respetivas curvas de dose-resposta e, posteriormente, determinar os valores de IC₅₀ e IC₂₀ que é definida como a concentração necessária para matar ou inibir o crescimento celular em 20%.

Tabela 3 – Gamas de concentração dos fármacos utilizadas em regime de monoterapia.

Fármacos/Linha Celular	A549	H1299
Carboplatina	10 µM– 1200 µM	10 µM – 1400 µM
Cisplatina	1 µM- 400 µM	10 µM – 500 µM

2.3.1.2.2 Terapia Combinada

De igual forma para ensaios em regime de terapia combinada, também se semearam 5×10^4 células por mL das respetivas linhas celulares em placas de 48 poços. Após esperar 24 horas para a adesão das células, os ensaios foram iniciados. Variou-se apenas a concentração dos fármacos cisplatina e carboplatina, fixando-se uma concentração dos fármacos pemetrexede e gemcitabina, visto que estes dois últimos são usados frequentemente em associação e nunca isoladamente, de acordo com as *guidelines* de tratamento (Besse *et al.*, 2014).

O pemetrexede e a gemcitabina foram previamente sujeitos em contexto de laboratório a diluições em NaCl a 0,9% de modo a obter as concentrações de 0,1 µM e 1 µM para o pemetrexede e 0,5 µM e 5 µM para a gemcitabina. Para a cisplatina e carboplatina, tal como referido anteriormente, apenas se variou o volume retirando diretamente da solução stock. As escolhas das concentrações referidas anteriormente têm por base ao que se usa na prática clínica.

Na Tabela 4 estão apresentadas as gamas de concentrações usadas em combinação. Variaram-se as concentrações da cisplatina e da carboplatina e fixou-se a concentração dos fármacos pemetrexede e gemcitabina.

É de realçar que não se testou a gemcitabina na linha celular A549, pelo facto desta linha celular ser representativa de adenocarcinoma e, segundo as *guidelines* da ESMO para o tratamento deste tipo de carcinoma, este fármaco não é uma opção (Besse *et al.*, 2014; Planchard *et al.*, 2018).

Tabela 4 – Concentrações ou gama de concentrações dos fármacos usados em regime de combinação.

Fármacos/Linhas Celulares	A549	H1299
Cisplatina + Pemetrexede	10 µM – 400 µM + 0,1 µM ou 1 µM	10 µM – 400 µM + 0,1 µM ou 1 µM
Cisplatina + Gemcitabina	***	10 µM – 400 µM + 0,5 µM ou 5 µM
Carboplatina + Pemetrexede	50 µM – 1200 µM + 0,1 µM e 1 µM	100 µM – 1400 µM + 0,1 µM e 1 µM
Carboplatina + Gemcitabina	***	100 µM – 1400 µM + 0,5 µM e 5 µM

2.3.1.2.3 Tratamento para o RMN e para os Estudos de Viabilidade Celular

Para os estudos de viabilidade celular e para a quantificação dos metabolitos pela técnica de RMN, as células foram tratadas com concentrações correspondentes ao IC₂₀ dos diferentes fármacos e as respetivas combinações, ou seja, uma condição controlo (ausência de fármaco), os fármacos administrados isoladamente (carboplatina ou cisplatina) e as combinações (cisplatina e pemetrexede; cisplatina e gemcitabina; carboplatina e pemetrexede ou carboplatina e gemcitabina) como referido na Tabela 5.

Tabela 5 – Concentrações utilizadas para a Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear.

Condições/ Linha celular	H1299
Cisplatina	7,28 µM
Cisplatina + Gemcitabina	7,28 µM + 5 µM
Cisplatina	30,2 µM
Cisplatina + Pemetrexede	30,2 µM + 1 µM
Carboplatina	141,46 µM
Carboplatina + Gemcitabina	141,46 µM + 5 µM
Carboplatina	616,35 µM
Carboplatina + Pemetrexede	616,35 µM + 0,1 µM

2.3.2 Avaliação da Proliferação Celular pelo Ensaio de MTT

A avaliação da proliferação celular foi realizada através do estudo da atividade metabólica, por espectrofotometria, através do ensaio MTT. Este ensaio, possibilita calcular a percentagem de células metabolicamente ativas, através da quantificação de cristais de formazano produzidos (Stockert, Blázquez-Castro, Cañete, Horobin, & Villanueva, 2012).

Para garantir que o efeito citotóxico é apenas proveniente dos fármacos, e não de qualquer fator externo que possa condicionar esses resultados, também se utilizou um controlo negativo, no qual as células não foram expostas a fármaco.

O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, de cor amarela, utilizado na avaliação da viabilidade e da função mitocondrial em culturas celulares. Este tem como função principal detetar a atividade da enzima desidrogenase, que tem a capacidade de protonar o anel tetrazólio do MTT e formar cristais de formazano de cor azul-escura (Figura 19). Estes cristais podem ser solubilizados e quantificados por meios espectrofotométricos. Assim, a quantidade de cristais obtidos é diretamente proporcional à quantidade de células metabolicamente ativas (Batista, 2015).

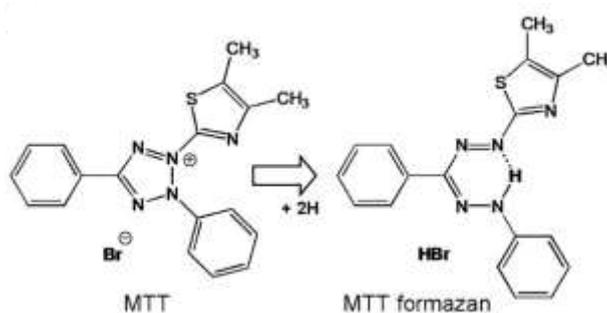


Figura 19 – Conversão do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] em em formazano. Retirado de (Stockert et al., 2012).

Este ensaio foi utilizado para estimar os valores de IC₅₀, ou seja, a concentração necessária para inibir ou matar 50% das células e o IC₂₀, que é a concentração necessária para inibir ou matar 20% das células, para a carboplatina e cisplatina isoladamente e para as respetivas combinações com o pemetrexede e com a gemcitabina.

Após a incubação das células com os diferentes fármacos durante 48h, descartaram-se os meios de cultura e adicionou-se PBS com o intuito de lavar as células removendo restos de meio, e descartou-se o PBS. Em cada poço adicionou-se 150 µL de MTT (0,5 mg/mL: Sigma, M2128) e foram incubadas durante 3h. Passado o tempo de incubação, adicionaram-se 150 µL de uma solução de 0,04 M de ácido clorídrico (Sigma-Aldrich, 435570) em isopropanol (Sigma-Aldrich, I9516) com o propósito de dissolver os cristais de formazano formados

anteriormente, com ajuda de um agitador de placas. Depois de dissolvidos os cristais, transferiram-se 200 μL desse conteúdo para uma placa de 96 poços (Sarstedt, Alemanha). Finalizando-se, recorreu-se a um espectrofotômetro (ELISA (Biotek[®], Synergy HT)) onde foram colocadas as placas para medição das absorvâncias, usando comprimentos de onda de 570 nm e de 620 nm (Figura 20).

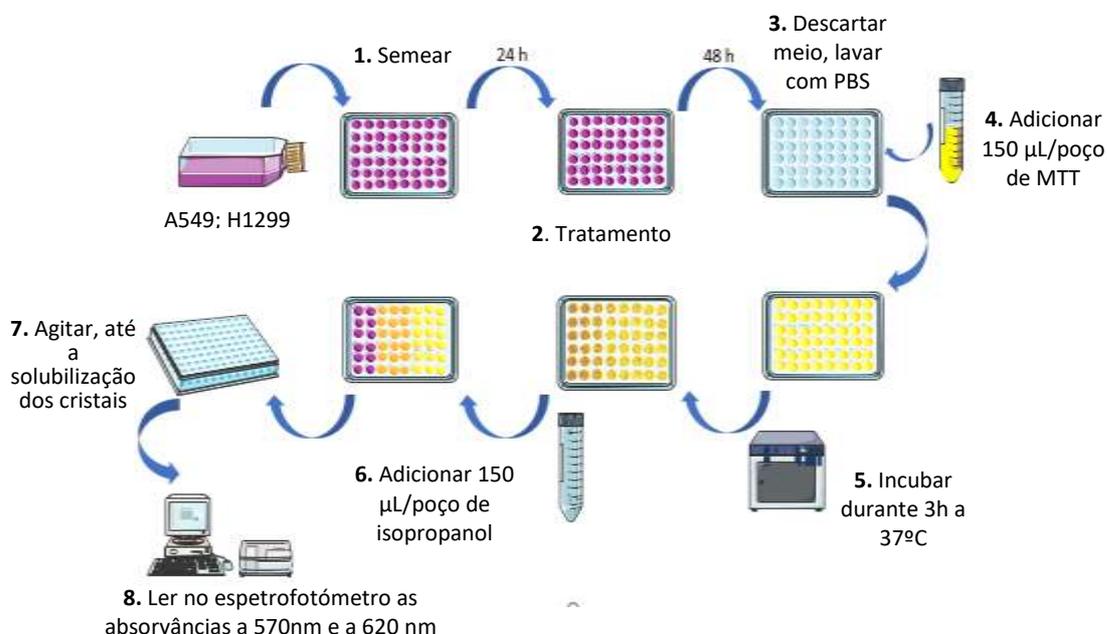


Figura 20 – Protocolo do ensaio do MTT. 1: semearam-se $5 \times 10^4/\text{mL}$ de células numa placa de 48 poços. 2: após 24h, as células foram expostas às diferentes concentrações dos fármacos. 3: após 48 h, iniciou-se o ensaio do MTT, em que se descartou o meio e se lavaram as células com PBS. : adicionaram-se 150 μL de MTT em cada poço. : incubaram-se as respectivas placas entre 2h-4h a 37°C, formando-se os cristais de formazano. 6: adicionaram-se 150 μL de isopropanol com HCl em cada poço, para dissolver os cristais de formazano e colocaram-se as placas num agitador de placas. 8: procedeu-se à leitura das mesmas num espectrofotômetro com os comprimentos de onda de 570 nm e de 620nm.

Sendo assim, este ensaio possibilitou a quantificação da atividade metabólica como medida da proliferação celular, expressa em percentagem, relativamente às culturas celulares não tratadas. Os resultados foram expressos em percentagem de atividade metabólica das células tratadas com os fármacos em relação às células não tratadas de acordo com a Equação 2.

$$\% \text{ atividade metabólica} = \frac{(\text{Abs } 570 \text{ nm} - \text{Abs } 620 \text{ nm})(\text{células tratadas com os fármacos})}{(\text{Abs } 570 \text{ nm} - \text{Abs } 620 \text{ nm})(\text{células sem tratamento})} \times 100$$

Equação 2 – Cálculo da percentagem de atividade metabólica de células tratadas com os diferentes fármacos relativamente a células sem tratamento.

Após a determinação das curvas de proliferação, com o intuito de obter os valores de IC_{50} e IC_{20} , através do programa graphpad, recorrendo a uma regressão não linear, procedeu-se aos estudos metabólicos por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.

A razão da escolha do IC₂₀ e a sua posterior utilização prendem-se com o facto de perceber se a viabilidade celular justifica o avanço para a análise metabolómica.

2.4 Avaliação da Viabilidade Celular

Paralelamente aos estudos de metabolómica, a viabilidade e o perfil de morte celular foram avaliados. Esta análise foi feita com o objetivo de confirmar qual o efeito das concentrações de fármaco(s) testadas na viabilidade das células, informação importante para a interpretação dos resultados obtidos na análise do perfil metabolómico. Desta forma, as concentrações usadas nos ensaios de citometria de fluxo foram as mesmas que foram usadas nos estudos de metabolómica (Tabela 5 da secção 2.3.1.2.3 – Terapia usada para a Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear). Assim, 1×10^6 de células por condição foram tratadas com o(s) fármaco(s) durante 48h.

Para estudar o efeito citotóxico dos diferentes regimes terapêuticos na viabilidade celular recorreu-se à técnica de citometria de fluxo.

Esta técnica é utilizada com a finalidade de analisar vários parâmetros simultaneamente, através de um aparelho de deteção ótico-eletrónico (citómetro de fluxo), o que permite caracterizar quantitativa e qualitativamente um conjunto de células em suspensão, medindo os sinais de dispersão de luz (frontal e lateral) e fluorescência emitidos por cada amostra. Um citómetro de fluxo pode fornecer informações de características celulares a nível extrínseco ou intrínseco. As características intrínsecas incluem o tamanho, a forma, a densidade e a granulosidade da célula. Por outro lado, as características extrínsecas incluem medidas em que é necessário adicionar sondas fluorescentes que permitem avaliar a composição ou a síntese do DNA, modificações estruturais da membrana celular, processos de morte por apoptose e/ou por necrose, parâmetros fisiológicos como o fluxo de cálcio, alterações de pH, o potencial de membrana mitocondrial, entre outros (Amaral, 2014; Moo-Young *et al.*, 1986).

Neste trabalho foi utilizado um citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado com um laser de argon que emite um feixe de luz com um comprimento de onda de 488 nm.

O citómetro de fluxo (Figura 21) emite um feixe de luz de comprimento de onda único que é direcionado para um sistema em fluxo onde é colocada a amostra. Cada partícula suspensa intersesta o feixe e dispersa a luz de uma determinada forma. Os compostos químicos, utilizados para marcação da amostra, podem ser excitados emitindo luz de menor frequência; essa combinação de luz dispersa pelas células/partículas com a fluorescência emitida pelos fluoróforos é direcionada por espelhos/filtros dicróicos para detetores apropriados.

Analisando as flutuações de brilho é possível então explorar vários tipos de informação sobre a estrutura química e física de cada partícula individualmente (Tavares & Tavares, 2009).

Após o tratamento e o respetivo tempo de incubação, as células foram destacadas dos frascos recorrendo-se a métodos enzimáticos (descritos anteriormente: secção 2.3.1) de modo a obter uma suspensão celular. Para todos os ensaios de citometria de fluxo efetuados neste trabalho, começou-se por colocar a suspensão celular num tubo de *falcon*, centrifugou-se a 1000xG durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Posteriormente adicionou-se PBS e distribuiu-se pelos respetivos tubos de citometria assegurando que em cada tubo são colocadas 1×10^6 células para marcação e análise.

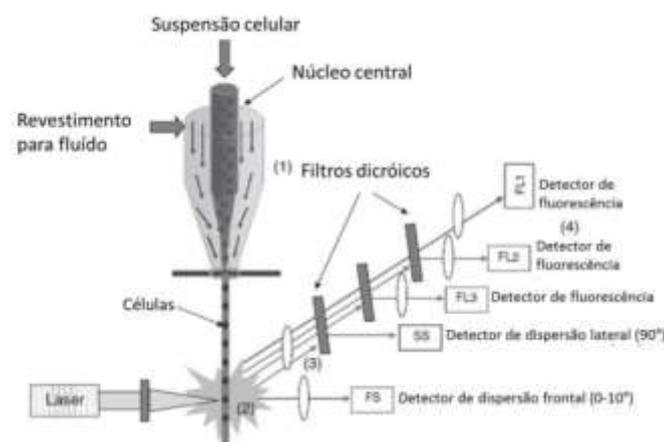


Figura 21 – Esquema de um citómetro de fluxo Fonte: (Moo-Young et al., 1986)

A avaliação da integridade da membrana é essencial para a avaliação da viabilidade celular. Esta pode ser avaliada de várias formas, nomeadamente através de ensaios capazes de evidenciar o dano que ocorre nas células, quer por apoptose quer por necrose.

Estes dois tipos de morte podem ser distinguidos através de características morfológicas ou bioquímicas como, por exemplo, compactação e fragmentação da cromatina nuclear, perda da assimetria membranar, contração do citoplasma, entre outros (Amaral, 2014).

As sondas fluorescentes utilizadas na citometria de fluxo para a análise da viabilidade celular, foram a AnV (do inglês, *Annexin V*) acoplada ao FITC (do inglês, *fluorescein-5-isothiocyanate*) e o PI (do inglês, *propidium iodide*). A AnV é uma proteína anticoagulante que se liga com elevada afinidade a fosfolípidos aniónicos, tais como a fosfatidilserina. O PI é um corante com a capacidade de se intercalar no DNA e no RNA (de cadeia dupla), permitindo avaliar a integridade da membrana (Tavares & Tavares, 2009).

Em células viáveis, a fosfatidilserina encontra-se no folheto interno da bicamada lipídica. Quando se ativa a apoptose, a fosfatidilserina move-se para o folheto externo, podendo ser identificada através da incubação das células com AnV-FITC. Este evento ocorre quando a

membrana celular ainda está íntata, sendo característico de estados apoptóticos iniciais (Figura 22) (Kamentsky, 2001; Peng, Jiang, & Bradley, 2001). Por outro lado, em células viáveis, o PI não consegue atravessar a bicamada lipídica, sendo capaz de intercalar DNA ou RNA de cadeia dupla apenas quando a membrana da célula está danificada, o que se verifica quando as células se encontram em necrose (Kamentsky, 2001; Peng *et al.*, 2001).

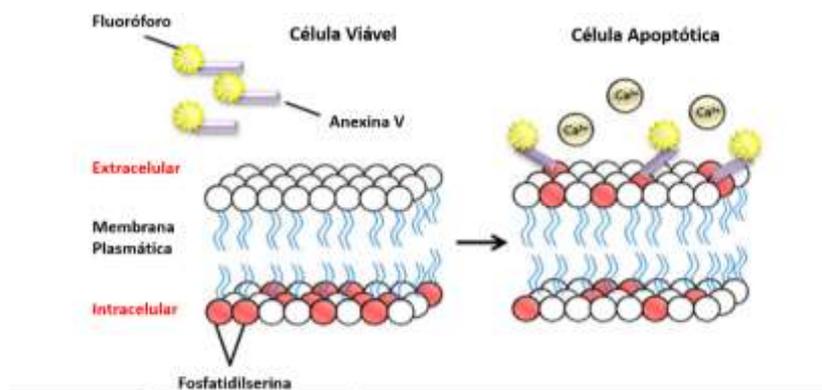


Figura 22 – Marcação da fosfatidilserina pela anexina V adaptado de_(Sarmiento, 2016).

Assim, a dupla marcação com AnV e PI permite distinguir quatro populações de células: as células viáveis (negativo para ambas as marcações), as células em apoptose inicial (marcação positiva para AnV-FITC, mas negativa para a marcação com PI), as células que estão em apoptose tardia/necrose (positivas para ambas as marcações) e as células que estão em necrose (marcação negativa para AnV-FITC e positiva para PI) (Tabela 6).

Tabela 6 – Classificação das células de acordo com a intensidade de marcação com AnV e PI

Células	AnV (Anexina V)	PI (Iodeto de propídeo)
Viáveis	-	-
Apoptose inicial	+	-
Apoptose tardia/necrose	+	+
Necrose	-	+

A cada tubo com aproximadamente 1×10^6 células adicionaram-se 100 μ L de tampão de ligação frio² (Sigma, C4901), 2,5 μ L de AnV (Immunostep, ANXVF) e 1 μ L de PI (DY634, Kit Immunostep). Incubaram-se as suspensões celulares durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente e, por fim, adicionaram-se 400 μ L de tampão de ligação frio e agitou-se suavemente com o auxílio do vórtex. A detecção foi posteriormente realizada com os comprimentos de onda de emissão de 525 nm para a AnV e de 640 nm para o PI.

² 0,01 de HEPES (Sigma, H7523), 0,14M de NaCl, 0,25 mM de Ca Cl₂ (Sigma, C4901)

Os resultados são apresentados em percentagem de células de cada subpopulação.

2.5 Quantificação Metabolómica por RMN

A escolha da técnica analítica depende dos objetivos da análise, do tipo de metabolitos que se pretende analisar e da amostra biológica.

A espectroscopia de RMN surgiu nos anos 40 e, desde então, esta técnica tem sofrido melhorias, apresentando-se, atualmente, com um papel de liderança na área científica. Esta técnica é utilizada para caracterizar perfis metabólicos, quer *in vivo* como *in vitro*, beneficiando ainda de apresentar um perfil não destrutivo e altamente reprodutível. Baseia-se, principalmente, na exploração das propriedades físicas ou químicas das moléculas, fornecendo-nos informações detalhadas sobre a sua estrutura, dinâmica, estado de reação e o ambiente químico, permitindo-nos estudar as vias metabólicas específicas (Malloy, Sherry, & Jeffrey, 1988; Nicolas *et al.*, 2008). Posto isto, esta curiosidade não só por estudar as vias metabólicas, como também os metabolitos extracelulares e intracelulares produzidos, possibilita a descoberta de novos biomarcadores, que possam ser fundamentais para a oncologia quer ao nível do tratamento, como também no diagnóstico precoce e prognóstico das neoplasias (Markley *et al.*, 2017).

A espectroscopia por ^1H -RMN de alta resolução, é capaz de identificar qualquer molécula orgânica, já que possui prótons (núcleos de hidrogénio). A posição espectral ocupada por cada um desses núcleos depende do ambiente eletrónico, assim torna-se possível distinguir diferentes grupos químicos quer intramoleculares ou intermoleculares e assim identificar e quantificar os inúmeros metabolitos presentes em extratos ou fluidos biológicos. Resumindo, um espectro RMN é capaz de mimetizar uma impressão digital química da amostra biológica, mostrando possíveis alterações que ocorrem nos perfis metabólicos indicando uma potencial fonte de biomarcadores fisiológicos (Griffin & Shockcor, 2004).

Esta técnica, quando associada à marcação isotópica, ou seja, ao uso de substratos enriquecidos com marcadores isotópicos, surge como uma ferramenta poderosa para a elucidação de mecanismos bioquímicos, tornando possível quantificar os diversos intermediários metabólicos mais abundantes, nomeadamente a glicose, o glutamato e o lactato, com a finalidade de analisar os fluxos metabólicos gerados (Abrantes, 2013). Para estudos *in vitro*, o substrato enriquecido mais comumente utilizado é a glicose marcada com carbono-13, em que o átomo ^{13}C se localiza em diferentes posições na molécula de glicose, ou seja a glicose pode estar marcada na posição 1 ($[1-^{13}\text{C}]$ glicose), nas posições 1 e 6 ($[1,6-^{13}\text{C}_2]$ glicose), ou em todas as posições, ou seja glicose uniformemente marcada ($[U^{13}\text{C}]$ glicose). A utilização de glicose marcada com carbono-13 permite a análise da via glicolítica, do ciclo de Krebs e da

interação entre estas duas vias metabólicas de acordo com a análise das taxas de enriquecimento de metabolitos intermediários das duas vias (Abrantes, 2013).

Como dito anteriormente, a glicólise tem por base a conversão da glicose em duas moléculas de piruvato. Ao utilizarmos a glicose marcada com ^{13}C , o piruvato produzido será por sua vez um resultado da marcação feita inicialmente; outro exemplo está relacionado com a enzima LDH, esta vai converter o piruvato previamente formado em lactato que também terá a mesma marcação. Posto isto, é então possível determinar, através da quantificação do lactato, o consumo de glicose uniformemente marcada por via indireta e entender a intensidade da via da glicólise nas células em estudo consoante as diferentes terapias (Gonçalves, 2014).

Uma mais valia deste tipo de marcação, é que nos permite distinguir o lactato proveniente de metabolitos que não foram marcados, endógenos ou presentes no meio de cultura. Deste modo, ao analisar o meio de cultura em função do tempo de incubação permite quantificar o lactato produzido, de forma indireta, ou seja, o fluxo glicolítico (Abrantes, 2013).

É importante realçar que o piruvato não é apenas convertido em lactato, participando em 4 vias distintas: este pode seguir para a mitocôndria e ser convertido em acetil-CoA por ação da enzima PDH (do inglês, *pyruvate dehydrogenase*), onde por oxidação no ciclo de *Krebs* resulta na produção de CO_2 e de redutores que participam na cadeia transportadora de eletrões; quanto maior a quantidade de NADH citosólica resultante do processo glicolítico, a LDH torna-se mais ativa na conversão de piruvato em lactato; por outro lado, quando os níveis de NADH são reduzidos, o piruvato, pela ação da ALT (do inglês, *alanine aminotransferase*), é convertido em alanina e por último, forma-se o oxaloacetato, um intermediário do ciclo de *Krebs*, reação de carboxilação catalisada pela PC (do inglês, *pyruvate carboxylase*) (Gonçalves, 2014).

O piruvato ao apresentar marcação nos seus carbonos, por consequência os seus intermediários resultantes também serão marcados. Para se poder avaliar esta integração recorre-se ao glutamato, que é caracterizado como sendo um dos aminoácidos mais abundantes no nosso organismo. Este, apesar de não fazer parte do ciclo de *Krebs*, encontra-se em equilíbrio com um intermediário, o α -cetoglutarato. Deste modo, a quantificação de glutamato, ainda que seja uma avaliação indireta da incorporação da marcação, torna-se imprescindível, uma vez que, devido à sua maior concentração intracelular, a deteção pela técnica de RMN, torna-se facilitada. Logo é possível inferir que com o aumento do número de voltas do ciclo, maior é a incorporação de carbono-13 nos intermediários e, conseqüentemente, de glutamato. Com a continuação da atividade do ciclo, cada vez surgem mais intermediários multi-enriquecidos e, assim, uma medição da razão entre os

intermediários multi-enriquecidos e duplamente enriquecidos permite uma avaliação da velocidade do ciclo (Abrantes, 2013; Gonçalves, 2014; Pereira et al., 2011).

À medida que o ciclo de *Krebs* avança, o glutamato vai apresentando os carbonos marcados. Recorrendo ao espectro de ^{13}C -RMN dos extratos de metanol/clorofórmio das células é possível quantificar a abundância destas marcações no glutamato. A ressonância do carbono 4 do glutamato, possui um duplete (D45) que reflete as moléculas com marcação simultânea nos carbonos 4 e 5, e um quarteto/pseudoquarteto (Q), que reflete a marcação simultânea nos carbonos 3, 4 e 5 (Pereira et al., 2011). Posto isto, quanto maior for a razão Q/D45 dos multipletos, maior a velocidade do ciclo, maior a oxidação da $[\text{U}^{13}\text{C}]$ glicose nas células e maior o recurso ao ciclo de *Krebs* para a obtenção de equivalentes redutores que irão produzir energia pela cadeia respiratória mitocondrial (Pereira et al., 2011). Também a partir do glutamato marcado é possível determinar outra razão importante, que nos indicará o envolvimento dos intermediários do ciclo de *Krebs*, noutras vias biossintéticas, ou seja, denominado anaplerose. Tal como dito anteriormente, o piruvato pode ser convertido em oxaloacetato, portanto a marcação de glutamato será mais intensa nos carbonos 2 e 3 devido ao resultado do *turnover* único do ciclo de *Krebs*. Assim para avaliar a intensidade de anaplerose recorreu-se à razão c3-Glu/c4-glu, cujo o aumento indicará também o aumento deste fluxo (Abrantes, 2013).

Outra razão que é importante determinar consiste na razão entre a marcação do carbono 3 do lactato e a do carbono 4 do glutamato, a qual mede o acoplamento entre a glicólise e o ciclo de *Krebs*, permitindo-nos inferir que quanto menor for esta razão, maior será o acoplamento e menor será a dependência das células do processo glicolítico para a obtenção de energia (Pereira et al., 2011).

Por último, a partir da marcação do carbono 3 do lactato com a marcação do carbono 3 da alanina, é possível determinar outra razão que permite avaliar os diferentes estados redox no citosol (Pereira et al., 2011).

Em suma, todas as razões referidas servem para comparar o efeito da quimioterapia e da imunoterapia nas mesmas, comparando-se assim as razões nas células incubadas com os diferentes fármacos relativamente às das células controlo, com o intuito de determinar o efeito dos mesmos na atividade metabólica das células de cancro de pulmão.

2.4.1 Procedimento para a realização dos Extratos para Avaliação

Para este trabalho experimental, prepararam-se placas de petri onde foram semeadas 2,5 milhões de células. Também foram preparados meios, de acordo com a linha celular usada,

sendo que DMEM (Gibco, I1966-025) para a linha celular HI299 e RPMI-1640 (Sigma, R6504) para a linha celular A549. Após 24h, ou seja, o tempo necessário para que estas adiram às placas, preparam-se meios DMEM (Sigma D5030-10L) e RPMI (Sigma, R1383) sem glucose, em que a estes se adicionou glucose uniformemente marcada com ^{13}C [$\text{U}^{13}\text{C}6$] (Cambridge Isotope Laboratories, CLM-1396-10). Antes da adição do meio com glucose marcada, aspirou-se o meio das placas de petri previamente preparadas e adicionou-se 10 mL do novo meio. De seguida as células foram tratadas com concentrações indicadas na tabela 5 da secção 2.3.1.2.3 - Tratamento para o RMN e para os Estudos de Viabilidade Celular, havendo uma condição controlo (ausência de fármaco), os fármacos administrados isoladamente (carboplatina ou cisplatina) e as combinações. Aos 30 minutos, às 1, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas retiraram-se amostras de 600 μL de meio para *ependorfs* devidamente identificados, as quais foram de seguida conservadas a -80°C .

A medição do fluxo glicolítico é feita de forma indireta mediante a quantificação do aparecimento de lactato no meio de cultura. A metabolização da [U^{13}C] glucose conduz ao aparecimento de [U^{13}C] lactato no meio de cultura que é, como referimos anteriormente, distinguível do lactato não marcado.

Após as 48 horas procedeu-se à extração celular. Para isso, descartou-se o meio e seguiram-se 2 lavagens com 2 mL de PBS. Em seguida, adicionou-se PBS e raspou-se gentilmente com um raspador de células, transferindo-se seguidamente a suspensão celular para um *falcon*. Lavou-se por centrifugação a $1000\times\text{G}$ durante 5 minutos, descartando o PBS e mantendo o *pellet*. Adicionou-se 1,5 mL de uma solução fria previamente preparada de metanol e clorofórmio na proporção 2:1, e procedeu-se a homogeneização em vórtex. Posteriormente, as amostras foram sonicadas durante 15 minutos, com o intuito de romper todas as membranas. Por fim, adicionou-se 500 μL de clorofórmio e 500 μL de água ultrapura, centrifugando-se novamente a $1000\times\text{G}$ durante 15 minutos. Esta centrifugação permitiu a separação das amostras em 3 frações: a fase aquosa, sobrenadante onde se encontram todos os metabolitos solúveis em água, ou seja os metabolitos polares; a fase orgânica, onde se encontram os metabolitos apolares; e o *pellet* que é constituído por componentes membranares. As frações são posteriormente colocadas separadamente em *ependorfs* e conservadas a -80°C . De seguida as amostras de meio recolhidas ao longo de vários tempos foram analisadas a 14.1 Tesla por ^1H -RMN com uma sonda de banda larga de 3 mm. Para a preparação das amostras para análise, adicionaram-se 160 μL das amostras de meio a 40 μL de uma solução de fumarato de sódio na concentração de 10 mM em D_2O (99,9%), usada como padrão interno para efeitos quantitativos.

Devido aos constrangimentos existentes relacionados com a pandemia da COVID-19 e devido às questões técnicas associadas a uma avaria no equipamento de ressonância magnética nuclear, no qual seriam analisadas as amostras acima indicadas, não foi possível a obtenção dos resultados da metabolómica.

3. Análise Estatística

A determinação dos valores de IC_{50} e IC_{20} , bem como a análise estatística dos valores experimentais da proliferação celular, foi realizada usando o software GraphPad 6.0. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio-padrão de, pelo menos, três experiências independentes realizadas em triplicado. Para determinar os valores de IC_{50} e IC_{20} foi feito um ajuste das curvas dose-resposta segundo uma regressão não linear³, segundo a equação $Y=(100-0)/(1+10^{((\text{Log}IC_{50}-X)*\text{HillSlope}))}$.

A significância das diferenças dos valores experimentais da proliferação celular foi analisada comparando os intervalos de confiança das condições, com nível de significância de 0,05. Diferenças significativas foram consideradas quando os intervalos de confiança não se cruzam.

A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do software IBM® SPSS® 23.0 (IBM Corporation, Armonk, Nova Iorque, EUA). Os resultados foram apresentados sob a forma de média \pm desvio-padrão, sendo a sua representação gráfica efetuada recorrendo ao software GraphPad Prism 6.0. A análise das variáveis quantitativas, nomeadamente a normalidade de distribuição foi realizada segundo o teste de *Shapiro-Wilk*, sendo avaliada a homogeneidade de variâncias segundo o teste de *Levene*. No caso de uma distribuição normal das variáveis quantitativas utilizaram-se testes paramétricos e testes não paramétricos na ausência de normalidade na distribuição destas variáveis. Para a comparação entre o controlo e as diferentes condições em cada um dos tratamentos em estudo recorreu-se ao teste ANOVA quando se observou uma distribuição normal e homogeneidade de variâncias ou, em caso contrário, usou-se o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*. As comparações múltiplas entre condições foram realizadas com recurso ao teste de *Games-Howell*, na presença de variâncias não presumidas, ou pela correção de *Bonferroni*, em caso contrário.

³ IC_{50} é a concentração do fármaco para o qual a resposta é 50% do efeito entre o limite máximo e mínimo; o *hillSlope* indica a inclinação das curvas; *Top e Bottom* referem-se aos valores mínimo e máximo no eixo dos y; o valor de *Y* é o valor de percentagem do efeito e o valor de *X* é o logaritmo da concentração do fármaco para a percentagem correspondente.

Capítulo IV. Resultados e Discussão⁴

I. Caracterização das Linhas Celulares

Com o intuito de confirmar o subtipo histológico das linhas celulares utilizadas ao longo desta dissertação, recorreu-se à utilização de um conjunto de anticorpos específicos para proteínas do citoesqueleto (Tabela 7). Esta tarefa foi realizada com o apoio do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra.

Tabela 7 – Caracterização das linhas celulares de cancro do pulmão de não pequenas células, A549 e H1299.

Linha celular	CK7	TTF1	Napsina A	CK5/CK6	PD-L1 (clone 22C3)	Ki67
A549	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	80%
H1299	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo para 5% das células tumorais	90%

Quanto à histopatologia foi possível confirmar que a linha celular A549 é representativa de adenocarcinoma devido à expressão do marcador molecular CK7 e devido à ausência da expressão do CK5/6, pois este é um marcador que permite distinguir os adenocarcinomas dos carcinomas escamosos. Por outro lado, a linha celular H1299 não expressa nenhum dos marcadores moleculares e apresenta um índice proliferativo (KI67) de 90%, o que indica que esta linha apresenta uma taxa de proliferação elevada, indicativa do subtipo histológico carcinoma de células grandes (Iyoda *et al.*, 2001; Travis, 2011; J. Wang *et al.*, 2020).

Quanto à expressão do clone 22C3 do recetor PD-L1, a linha celular A549 apresenta uma expressão negativa, enquanto a linha celular H1299 apresenta uma expressão positiva em 5% das células tumorais. Os estudos de imunoterapia previstos incluíam o uso de nivolumab e pembrolizumab, cujo mecanismo de ação se baseia na inibição do recetor PD-1, impedindo a ligação do recetor PD-1 das células T com os seus ligandos PD-L1/PD-L2 e evitando a inativação das células T (Bunney *et al.*, 2017a; Guo *et al.*, 2017). A expressão nula ou reduzida do recetor PD-L1 nas linhas celulares A549 e H1299, respetivamente, não justifica o uso da imunoterapia como tratamento de primeira linha, pelo que também não justifica a prossecução dos estudos com os fármacos ICPs. Por essa razão, os estudos apresentados nesta dissertação incluíram apenas a cisplatina, a carboplatina, a gemcitabina e o pemetrexede.

⁴ Os resultados apresentados ao longo deste capítulo foram obtidos em co-autoria com a Mestre Daniela Madama

2. Avaliação da Proliferação Celular

Lidar com diferentes fármacos, que apresentam atividade citotóxica distinta, requer ensaios preliminares para determinar a concentração capaz de induzir danos celulares, quer seja por morte celular (atividade citotóxica), ou apenas por inibição do crescimento celular (efeito citostático). Estes estudos permitem traçar curvas dose-resposta e, por conseguinte, determinar as concentrações inibitórias de interesse, ou seja, os valores de IC_{20} ou IC_{50} , que representam a concentração de fármaco que inibe em 20% ou 50%, respetivamente, inferindo indiretamente a proliferação celular, para um determinado período de exposição ao respetivo fármaco (Brito *et al.*, 2012).

No contexto do presente trabalho, a determinação da proliferação celular teve dois objetivos principais. O primeiro foi a avaliação do efeito dos fármacos nas linhas celulares de NSCLC. Esta análise permitirá uma melhor interpretação dos dados da metabolómica e a sua translação para a clínica. Em segundo, a determinação das curvas dose-resposta foi imprescindível para a determinação dos valores de IC_{50} e IC_{20} , com o intuito de selecionar as concentrações adequadas aos estudos subsequentes para a análise por RMN.

A avaliação da proliferação celular foi realizada através do estudo da atividade metabólica, por espectrofotometria, pelo ensaio MTT. Este ensaio possibilitou a obtenção de valores de proliferação celular, em percentagem, relativamente às culturas celulares controlo. Com os valores obtidos, foi possível traçar as respetivas curvas dose-resposta correspondentes a cada linha celular, recorrendo ao software GraphPad. Assim, foi possível determinar os valores de IC_{50} e de IC_{20} , ou seja, a concentração de composto necessária para inibir 20% da proliferação celular. Inicialmente, as culturas celulares de cancro do pulmão foram tratadas com concentrações crescentes dos diferentes fármacos e respetivas combinações durante 48h.

A Figura 23 apresenta as curvas dose-resposta correspondentes à linha celular H1299 em resposta à incubação com a cisplatina ou carboplatina e respetivas combinações, durante 48 horas e a Tabela 8 apresenta os valores de IC_{20} e IC_{50} , os intervalos de confiança a 95% referentes ao IC_{50} e os coeficientes de determinação das curvas de ajuste (r^2). Sendo importante enfatizar que a atividade metabólica é uma medida indireta de proliferação.

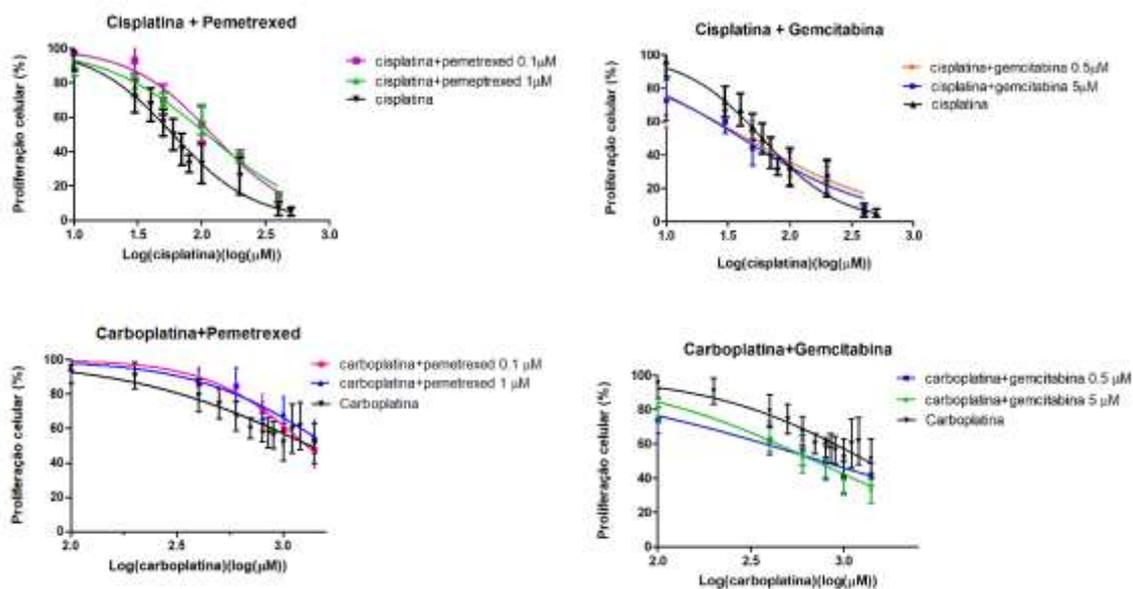


Figura 23 – Curvas de dose-resposta correspondentes à atividade metabólica (em percentagem de proliferação) da linha celular tumoral H1299 após a incubação de 48h com a cisplatina ou carboplatina e as respectivas combinações terapêuticas. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio-padrão de, pelo menos, três experiências independentes realizadas em triplicado ($n \geq 9$).

Com os valores percentuais obtidos foram traçadas as curvas dose-resposta que foram ajustadas a uma função considerando o melhor ajuste relativamente aos resultados experimentais. Através destas curvas, foi possível calcular a concentração do composto necessária para inibir 20% e 50% da proliferação celular, ou seja, os valores de IC_{20} e IC_{50} , respetivamente, apresentados na Tabela 8.

Dos fármacos e combinações testadas, na linha H1299 a cisplatina administrada em combinação com a gemcitabina é a que apresenta uma maior inibição da proliferação, sendo visível pelas curvas dose-resposta que apresenta. É também possível verificar que quando a cisplatina é administrada em combinação com a gemcitabina tem um efeito citotóxico muito mais evidenciado do que comparativamente à sua administração isolada. Em comparação com a sua combinação com o pemetrexede, para concentrações mais baixas, observa-se que a combinação cisplatina com gemcitabina induz um efeito proliferativo mais acentuado. Assim, a cisplatina em combinação com a gemcitabina torna-se a combinação de eleição, visto que apresentou o efeito anti-proliferativo mais notório. Relativamente à carboplatina é possível verificar que quando administrada em combinação com a gemcitabina é muito mais eficaz do que quando associada ao pemetrexede.

Tabela 8 – Valores de IC_{20} e IC_{50} dos fármacos e as combinações testadas na linha celular H1299, após 48h de incubação, assim como os valores de r^2 e intervalos de confiança a 95% (IC 95%) referentes ao IC_{50} .

Fármacos/Parâmetros	IC_{20} (μM)	IC_{50} (μM)	IC 95% (μM)	R^2
Cisplatina	21,4	59,8	53,2 – 67,4	0,98
Cisplatina + Gemcitabina 0,5 μM	6,6	44,7	22,8-87,3	0,88
Cisplatina + Gemcitabina 5 μM	7,3	41,0	29,1-57,7	0,97
Cisplatina + Pemetrexede 0,1 μM	43,7	120,6	94,1-154,6	0,98
Cisplatina + Pemetrexede 1 μM	30,2	109,8	83,1-145,0	0,98
Carboplatina	329,4	1337	1099-1627	0,93
Carboplatina + Gemcitabina 0,5 μM	69,1	759,5	559,7-1031	0,94
Carboplatina + Gemcitabina 5 μM	141,5	699,1	591,5-826,2	0,98
Carboplatina + Pemetrexede 0,1 μM	616,4	1291	1047-1593	0,96
Carboplatina + Pemetrexede 1 μM	597,1	1628	1094-2423	0,92

Analisando os parâmetros estatísticos obtidos dos ajustes à curva dose-resposta (tabela 8), verifica-se que o IC_{50} da cisplatina quando presente em combinação com a gemcitabina é inferior ao IC_{50} obtido quando a cisplatina é administrada em monoterapia, contudo, não apresentando diferenças estatisticamente significativas. O IC_{50} da cisplatina em monoterapia é de 59,8 μM (IC95% = 53,2; 67,4), sendo superior ao obtido quando presente em combinação com 0,5 μM de gemcitabina (44,7 μM ; IC95% = 22,8; 87,3) e com 5 μM de gemcitabina (41,0 μM , IC95% = 29,1; 57,7) não havendo diferenças estatisticamente significativa. Por outro lado, quando a cisplatina é combinada com o pemetrexede o valor do IC_{50} é superior, ou seja, para o pemetrexede na concentração de 0,1 μM , o IC_{50} da cisplatina é de 120,6 μM (IC95% = 94,1; 154,6) e para o pemetrexede a uma concentração de 1 μM , o IC_{50} é de 109,8 μM (IC95% = 83,1; 145,0), o que demonstra que *in vitro* a presença do pemetrexede não aumenta a eficácia anti-proliferativa da cisplatina.

Relativamente à carboplatina, o IC_{50} obtido em regime de monoterapia foi 1337 μM (IC95% = 1099; 1627), sendo 20 vezes superior ao IC_{50} da cisplatina quando esta é administrada no mesmo regime de monoterapia (59,8 μM ; IC95% = 53,2; 67,4). Quando a carboplatina é administrada em combinação com a gemcitabina, o seu valor de IC_{50} é estatisticamente inferior ao obtido em monoterapia, apresentando valores de 759,5 μM (IC95% = 559,7; 1031) e 699,1 μM (IC95% = 591,5; 826,2) quando a gemcitabina está presente a uma concentração de 0,5 μM e 5 μM , respetivamente.

Estes resultados mostram que a gemcitabina é um fármaco bastante vantajoso quando usado em associação com outros fármacos. No que diz respeito ao pemetrexede, a sobreposição dos intervalos de confiança dos IC_{50} da carboplatina em monoterapia (1337 μM , IC95% = 1099; 1627) e em associação com pemetrexede a 0,1 μM (1291 μM ; IC95% =

1047;1593) e a 1 μM (1628 μM ; IC95% = 1094; 2423) indica que, *in vitro*, o regime terapêutico em associação não aumenta o efeito anti-proliferativo da carboplatina.

Concluindo, para a linha celular H1299, a combinação de eleição é a cisplatina com a gemcitabina. Contudo, a associação de carboplatina com gemcitabina, apesar de não ter um efeito anti-proliferativo tão notório, constitui uma opção terapêutica de extrema importância, visto que na clínica há um número elevado de doentes que não toleram os tratamentos à base de cisplatina, pelo que a combinação de carboplatina com gemcitabina é uma possível opção nestes doentes.

Os valores do IC₂₀, como já foi mencionado, têm como objetivo principal perceber se a viabilidade celular obtida justifica o avanço para os estudos de quantificação metabolómica. Contudo, a cisplatina é administrada numa massa de 75 mg/m² na clínica o que equivale a 0,0237 μM , comparando com o IC₂₀ obtido no ensaio (21,4 μM), é possível dizer que a massa administrada *in vitro* foi superior à ue é usualmente administrada na clínica. O mesmo se pode dizer em relação à carboplatina que é administrada numa massa de 240 mg/m² e que equivale a 0,0614 μM , o valor de IC₂₀ (329,4 μM) também foi superior comparativamente ao que se usa na clínica. Este resultado pode ser explicado pelo facto de a linha celular em questão testada ser representativa do subtipo histológico células grandes (Iyoda *et al.*, 2001; Phelps *et al.*, 1996; Planchard *et al.*, 2018; Travis, 2011; J. Wang *et al.*, 2020).

A Figura 24 apresenta as curvas dose-resposta correspondentes à linha celular A549 em resposta à incubação com a cisplatina ou a carboplatina e respetivas combinações, durante 48h, e a Tabela 9 apresenta os valores de IC₂₀ e IC₅₀, os intervalos de confiança a 95% referentes ao IC₅₀ e os coeficientes de determinação das curvas de ajuste (r^2), após o tratamento durante 48 h.

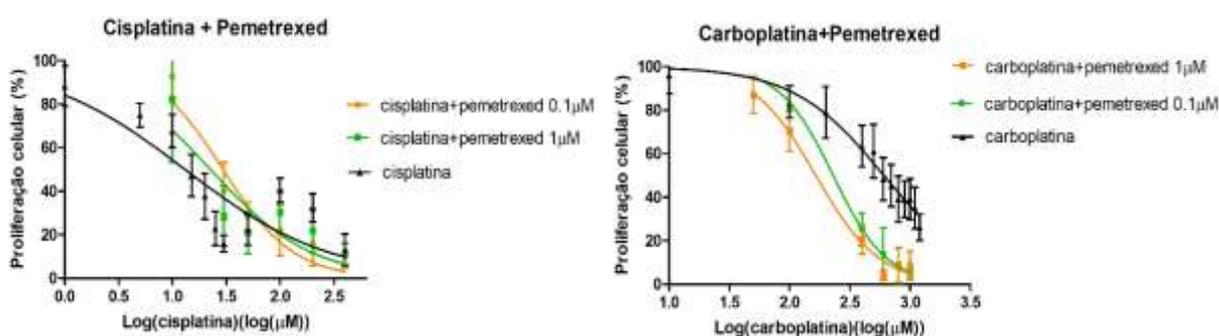


Figura 24 – Curvas de dose-resposta correspondentes à atividade metabólica (em percentagem de proliferação celular) da linha celular tumoral A549 após a incubação de 48h com cisplatina ou carboplatina e as combinações. Os resultados são apresentados como a \pm desvio-padrão de, pelo menos, três experiências independentes realizadas em triplicado ($n \geq 9$).

Na linha A549, através da interpretação dos gráficos representados na Figura 24, verifica-se que a cisplatina administrada isoladamente obteve o resultado mais notório em termos de inibição da proliferação celular. Relativamente à carboplatina, quando esta é associada ao pemetrexede verifica-se uma diminuição bastante acentuada da proliferação celular de modo dependente da concentração de pemetrexede usada. Este resultado é bastante válido numa perspetiva clínica, uma vez que a carboplatina é um fármaco de opção para doentes que não são tolerantes ao tratamento com a cisplatina. É importante realçar que nesta linha celular não se testou a gemcitabina, uma vez que este fármaco não é de eleição para o adenocarcinoma, de acordo com as *guidelines* da ESMO (Planchard *et al.*, 2018).

Analisando os parâmetros estatísticos obtidos dos ajustes à curva dose-resposta (Tabela 9) verifica-se que todos os regimes terapêuticos estudados induzem uma diminuição da proliferação celular. Quando a cisplatina é administrada em combinação com o pemetrexede, em qualquer das concentrações (para 0,1 μM IC_{50} =29,6 μM , $\text{IC}_{95\%}$ = 17,1;51,3); para 1 μM IC_{50} =22,5 μM , $\text{IC}_{95\%}$ = 7,8; 64,8) o efeito anti-proliferativo é semelhante ao obtido quando esta é administrada isoladamente (IC_{50} =13,1 μM , $\text{IC}_{95\%}$ = 6,1; 28,4), tendo em conta que os intervalos de confiança dos respetivos valores de IC_{50} se sobrepõem. Relativamente à carboplatina, quando associada com o pemetrexede a 0,1 μM e a 1 μM , o IC_{50} é de 230,7 μM ($\text{IC}_{95\%}$ = 197,6; 269,3) e 165,7 μM ($\text{IC}_{95\%}$ = 133,1; 206,2) respetivamente, sendo estes valores estatisticamente inferiores ao da carboplatina isoladamente, o qual é de 608,0 μM ($\text{IC}_{95\%}$ = 554,3;666,9). Estes resultados indicam que as combinações se tornam mais eficazes do que quando a carboplatina é administrada isoladamente.

Posto isto, a cisplatina continua a ser o fármaco de eleição, contudo quando esta é associada com o pemetrexede o seu efeito *in vitro* não mostrou potenciar o seu efeito. Por outro lado, quando o pemetrexede está associado com a carboplatina, efetivamente há uma redução que torna esta combinação mais eficaz na inibição da proliferação celular.

Relativamente aos valores do IC_{20} , a cisplatina clinicamente é administrada numa massa de 75 mg/m^2 , o que corresponde a 0,0237 μM , comparando com o IC_{20} obtido no ensaio (1,6 μM), é possível dizer que a massa administrada *in vitro* foi superior à que é usualmente administrada na clínica. O mesmo se pode dizer em relação à carboplatina que é administrada numa massa de 240 mg/m^2 e que equivale a 0,0614 μM , o valor de IC_{20} (182,1 μM) foi também superior comparativamente ao que se usa na clínica. Apesar de o valor de IC_{20} da cisplatina ser ligeiramente superior ao administrado na clínica, está bastante mais próximo, visto que este fármaco é usado comumente em monoterapia para tratar doentes com adenocarcinoma. Relativamente à carboplatina, o valor de IC_{20} é superior ao administrado na clínica, o que pode ser explicado pelo facto de a carboplatina não ser tão eficaz quando comparada com a

cisplatina. Assim, é possível concluir que os resultados obtidos *in vitro* estão em concordância com os valores da clínica; contudo, é importante realçar que existem fatores, nomeadamente ao nível da biodisponibilidade do fármaco administrado, que podem influenciar esses resultados (Planchard *et al.*, 2018; Shaito *et al.*, 2020).

Tabela 9 – Valores de IC_{20} e IC_{50} dos fármacos e as combinações testadas na linha celular A549, após 48h de incubação, os intervalos de confiança a 95% (IC 95%) referentes ao IC_{50} e os valores de r^2 .

Fármacos/Parâmetros	IC_{20} (μ M)	IC_{50} (μ M)	IC 95%	R^2
Cisplatina	1,6	13,1	6,1 – 28,4	0,71
Cisplatina + Pemetrexed 0,1 μ M	10,4	29,6	17,1 -51,3	0,91
Cisplatina + Pemetrexed 1 μ M	5,0	22,5	7,8 - 64,8	0,75
Carboplatina	182,1	608,0	554,3 – 666,9	0,98
Carboplatina + Pemetrexed 0,1 μ M	113,4	230,7	197,6-269,3	0,99
Carboplatina + Pemetrexed 1 μ M	71,5	165,7	133,1-206,2	0,99

Comparando as duas linhas celulares, podemos concluir que para a linha celular A549, a cisplatina administrada isoladamente apresentou maior eficácia, visto que o seu IC_{50} é de 13,1 μ M ($IC_{95\%}$ = 6,1;28,4), e o obtido para a linha celular H1299 foi estatisticamente superior 59,8 μ M ($IC_{95\%}$ = 53,2; 67,4). Contudo, a carboplatina associada ao pemetrexed poderá ser uma opção, visto que nesta linha esta associação apresenta um efeito mais notório. Já para doentes que apresentem o tipo histológico representativo da linha H1299, o tratamento de eleição é a cisplatina associada à gemcitabina.

De uma maneira geral, e com base nos resultados obtidos, podemos inferir que a linha celular H1299 apresenta valores de IC_{50} superiores aos valores obtidos na linha A549, pelo que é mais resistente, sendo esta representativa do subtipo histológico carcinoma de grandes células. Posto isto, podemos afirmar que a inibição da proliferação celular não só depende da dose de fármaco administrada como também do tipo histológico, pelo que cada tipo de tratamento deverá ser adequado ao perfil de cada doente.

O cancro do pulmão é um dos tumores malignos com maior incidência global e taxa de mortalidade, sendo que cerca de 85% dos diagnósticos são NSCLC (Y. Li, Wang, Chen, Lou, & Zhang, 2014). A quimioterapia no tratamento do cancro do pulmão tornou-se um alvo de investigação ao longo de décadas. Recentemente, a quimioterapia recorrendo à combinação da cisplatina com outros agentes quimioterapêuticos tem demonstrado um benefício na qualidade de vida dos doentes, como por exemplo na melhoria dos sintomas, já que a cisplatina quando administrada isoladamente está associada a efeitos secundários severos, tais como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, náuseas e vômitos (Kang *et al.*, 2015). Posto

isto, a gemcitabina é vista como um excelente candidato à terapia combinada, pois está associada a efeitos colaterais moderados e a toxicidade é dependente da massa administrada.

Segundo os autores Tang, Wang and Teng, de acordo com os resultados obtidos *in vitro*, foi possível demonstrar que a quimioterapia com gemcitabina associada à cisplatina exerce efeitos sinérgicos, sendo muito mais eficaz relativamente à administração isolada da cisplatina, o que demonstra ser consistente com vários estudos *in vitro* já realizados; além disso, estes dois fármacos exibem mecanismos complementares e efeitos colaterais não sobrepostos (Tang, Wang, & Teng, 2013).

O mecanismo de ação da gemcitabina baseia-se no bloqueio da síntese dos ácidos nucleicos e das enzimas envolvidas na biossíntese dos nucleótidos, inibindo a síntese de DNA e o seu processo de reparação (Mey *et al.*, 2006; Moorsel *et al.*, 1999). Atualmente este fármaco é considerado um dos agentes quimioterapêuticos mais eficientes pois inibe a proliferação celular impedindo a progressão das células da fase G1 para a fase S, sendo a terapia de eleição para este tipo de cancro (Tang *et al.*, 2013). Contudo, estudos clínicos revelaram uma grande disparidade na eficácia da quimioterapia com a gemcitabina, onde apenas para um pequeno número de doentes é vantajoso, sendo que apenas em 20% a 40%, a duração média da sobrevida é de 8 a 10 meses e a taxa de sobrevida em cinco anos é inferior a 15% (Y. Li *et al.*, 2014). Assim, com base nestes estudos é importante não só investigar os efeitos dependentes da sequência do tratamento, como também de uma possível prática de medicina personalizada, já que este tipo de cancro está relacionado com o desenvolvimento de resistência aos fármacos. Outro fator importante realçado por outros autores é o facto de tratamentos com cisplatina associada à gemcitabina apresentarem resultados muito mais relevantes do que quando associada ao pemetrexede (Hu *et al.*, 2016).

O pemetrexede também tem sido amplamente usado para tratar o NSCLC. Como já foi mencionado, este fármaco é um antagonista dos folatos. Os folatos contribuem para a biossíntese de purinas, timidina e, portanto, do DNA. Assim, ao administrar pemetrexede este interrompe o metabolismo dos folatos, inibindo a síntese de DNA e, por conseguinte, impedindo o crescimento das células tumorais. No entanto, apesar da sua eficácia, este está associado a uma elevada quimiorresistência, o que prejudica a eficácia clínica após o uso a longo prazo. Essa resistência poderá ocorrer a diferentes níveis, ou seja, ao nível da reparação do DNA, na própria replicação e síntese de DNA, nas alterações bioquímicas do tumor. Contudo, o pemetrexede não foi testado como um agente único, pelo que as características de resistência podem estar associadas à própria combinação do pemetrexede com os outros agentes quimioterapêuticos (Liang, Lu, Chen, Zhan, & Wang, 2019).

Portanto, para compreender melhor os mecanismos associados aos agentes quimioterapêuticos e às respectivas combinações é necessário recorrer à medicina personalizada, já que cada doente apresenta características diferentes o que nos pode fornecer informações mais precisas acerca do tipo de tratamento.

Também é importante realçar que estes fármacos não são usados apenas no cancro do pulmão, sendo também administrados noutros tipo de cancro, pelo que o uso de biomarcadores específicos para cada tipo de cancro também facilita na escolha do tipo de tratamento a utilizar (Liang *et al.*, 2019).

Relativamente à carboplatina que é um agente alquilante, esta mata as células principalmente por meio da indução de aductos de DNA e a gemcitabina especificamente no ciclo celular, matando principalmente as células em síntese de DNA na fase S; esta associação é uma mais valia, contudo serão sempre necessárias doses mais elevadas destes fármacos, o que poderá induzir maior toxicidade. (S. Wang, Zhang, Cheng, Evans, & Pan, 2010).

O uso concomitante de medicamentos quimioterapêuticos como a gemcitabina e o pemetrexede com fármacos quimioterapêuticos de primeira linha, onde se inclui a cisplatina e a carboplatina, pode prolongar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida destes doentes. A deteção de genes, proteínas e outros indicadores biológicos pode facilitar a seleção de indivíduos ou grupos para cada tipo de tratamento. Esta triagem facilitará uma terapia individualizada e melhorará os resultados individuais, reduzindo os efeitos colaterais e a toxicidade (Hu *et al.*, 2016).

3. Avaliação da Viabilidade Celular

Com base nos resultados obtidos e discutidos anteriormente, as condições escolhidas para proceder com os estudos de viabilidade celular foram as representadas na Tabela 5. A avaliação da viabilidade e tipos de morte celular induzida foi efetuada através de citometria de fluxo, recorrendo-se a uma dupla marcação com AnV e IP, permitindo a distinção de quatro populações de células: células viáveis (V), células em apoptose inicial (AI), células em apoptose tardia (AT) e por fim, células em necrose (N).

Na Figura 25 estão apresentados os resultados da viabilidade celular obtidos após exposição das células H1299 à cisplatina e respetivas combinações.

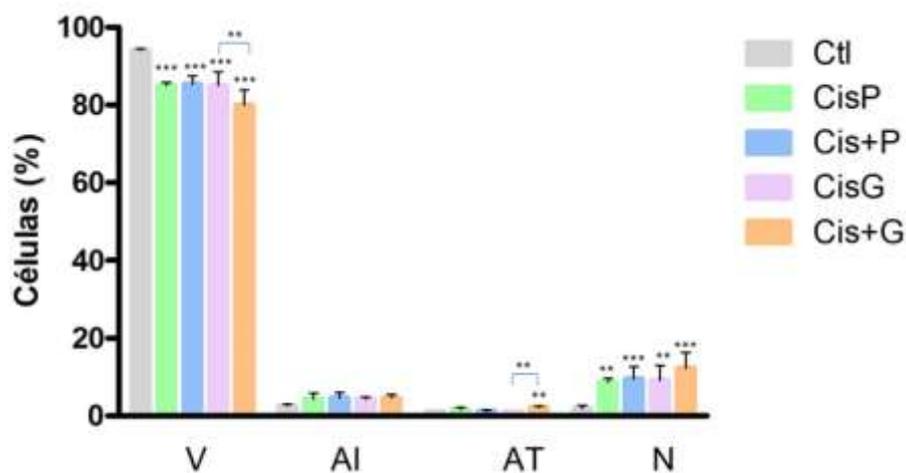


Figura 25 – Viabilidade celular apresentada em percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia (AT) e necrose (N) na linha celular H1299. As células foram incubadas durante 48h, sob quatro condições: um controlo (Ctl); cisplatina isoladamente, na concentração igual à utilizada quando em combinação com o pemetrexede (CisP); cisplatina em combinação com o pemetrexede (Cis+P); cisplatina isoladamente, na concentração igual à utilizada quando em combinação com a gemcitabina (CisG); cisplatina em combinação com a gemcitabina (Cis+G). Os resultados estão apresentados sob a forma de média \pm erro-padrão de, pelo menos, três experiências independentes realizados em duplicado ($n \geq 6$). As diferenças estatisticamente significativas estão apresentadas por: ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

Na linha celular H1299, a população de células viáveis do controlo é de $94,16 \pm 0,41\%$, condição que apresenta uma diminuição de aproximadamente 10% desta população em relação a todas as restantes condições de cisplatina, havendo diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$).

Apesar da diminuição da viabilidade celular de todas as condições em relação ao controlo ser de apenas aproximadamente 10%, esta foi acompanhada de uma forma geral por um aumento da população de células em necrose. Este aumento foi estatisticamente significativo para todas as condições em relação ao controlo ($p < 0,01$), contudo não ultrapassou os 15%. A percentagem de células em apoptose inicial é bastante reduzida (<5%) não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as condições. Na população de células em apoptose tardia, para qualquer condição, a percentagem de células foi inferior a 3%, havendo significado estatístico entre as células de controlo e as células tratadas com $7,28 \mu\text{M}$ de cisplatina e $5 \mu\text{M}$ de gemcitabina ($p < 0,01$).

A Figura 26 representa os resultados da viabilidade celular respetivamente à carboplatina e às suas combinações, revelando o tipo de morte celular mais predominante de acordo com as diferentes combinações na linha celular H1299.

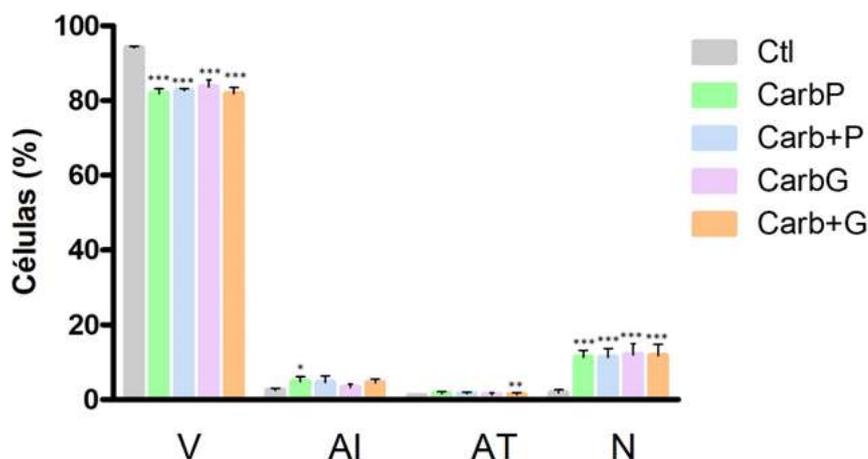


Figura 26 – Viabilidade celular apresentada em percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia (AT) e necrose (N) na linha celular H1299. As células foram incubadas durante 48h, sob quatro condições: um controlo (Ctl), concentrações de IC₂₀ nomeadamente o valor da carboplatina quando associada ao pemetrexede, só que a carboplatina isoladamente (CarbP); a carboplatina associada ao pemetrexede (Carb+P); o valor da carboplatina quando associada à Gemcitabina, só que a carboplatina isoladamente (CarbG); a cisplatina associada à Gemcitabina (Carb+G); Os resultados estão apresentados sob a forma de média ± erro-padrão de, pelo menos, três experiências independentes realizados em duplicado (n≥6). As diferenças estatisticamente significativas estão apresentadas por: * para p<0,05, ** para p<0,01 e *** para p<0,001.

Após exposição das células H1299 às combinações com base na carboplatina, verificou-se uma diminuição de 15% na população de células viáveis relativamente ao controlo, havendo diferenças significativas em relação a todas as condições (p<0,001). Relativamente à população de células em apoptose inicial verificou-se uma diminuição de aproximadamente 5% em todas as condições, apenas sendo estaticamente significativo a condição da carboplatina relativamente ao pemetrexede (p<0,05). Para a população de células em apoptose tardia verificou-se uma diminuição de 2%, havendo apenas diferenças estatisticamente significativas para a condição da carboplatina em combinação com a gemcitabina (p<0,01).

No geral, a diminuição da viabilidade celular foi acompanhada por um perfil de morte celular por necrose, a qual se explica pelo próprio mecanismo de ação da cisplatina e da carboplatina. A necrose é um tipo de morte celular que está normalmente associado à exposição a um determinado estímulo que pode ter sido desencadeado pela produção de espécies reativas, assim como danos no DNA (Peres & da Cunha, 2013).

Como já foi referido a cisplatina exerce a sua atividade citotóxica pela formação de ligações cruzadas no DNA. Estas ligações ativam diversas respostas celulares, que impedem a normal replicação e transcrição, resultando na paragem do ciclo celular e, eventualmente, apoptose. O alvo da apoptose causando dano ao DNA é mediado pelo gene supressor tumoral, TP53, que ativa genes pró-apoptóticos e reprime genes antiapoptóticos. A linha celular H1299 não expressa este gene, permitindo concluir que, como os mecanismos

inerentes à apoptose não são ativados, a necrose passa a ser o tipo de morte mais acentuado. Além do DNA nuclear, a cisplatina interage com DNA mitocondrial e outros componentes celulares, tais como RNA, proteínas e fosfolípidos e várias evidências científicas indicam que a cisplatina está principalmente associada à produção de ROS geradas na mitocôndria (Peres & da Cunha, 2013).

Paralelamente, e como já foi mencionado anteriormente, a carboplatina tem menos efeitos secundários em comparação com a cisplatina; contudo, o seu mecanismo de ação é semelhante, o que poderá igualmente explicar o aumento da população de células em necrose. (Sousa *et al.*, 2014).

Em termos globais, este tudo permitiu-nos verificar que a diminuição da viabilidade celular não comprometerá a análise metabolómica, possibilitando a quantificação dos metabolitos celulares.

4. Análise Metabolómica

Com o intuito de avaliar o fluxo glicolítico das linhas celulares em estudo e a atividade metabólica, iria recorrer-se à espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear. Porém, face às limitações já mencionadas previamente, não foi possível revelar os resultados relativamente a este tópico.

Contudo, de acordo com a literatura, o metabolismo em doentes com cancro de pulmão é caracterizado pelo aumento dos níveis de glicose e diminuição dos níveis de lactato (Louis *et al.*, 2016). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por Chen e seus colaboradores, estudo no qual avaliaram o metaboloma sérico de doentes com cancro de pulmão, referindo que houve um aumento da gliconeogénese nas células cancerígenas (Y. Chen *et al.*, 2015). Para além disso, outro estudo, no qual se incubaram células de cancro de pulmão com ^{13}C -lactato, com o intuito de avaliar a conversão de metabolitos ao longo da via gliconeogénica, confirma os mesmos resultados obtidos pelo autores mencionados previamente (Leithner *et al.*, 2015). Mais especificamente, os autores demonstraram que o lactato atua como um precursor da gliconeogénese e que a fosfoenolpiruvato carboxinase, a enzima gluconeogénica que converte o oxaloacetato em fosfoenolpiruvato, é ativa em células de cancro de pulmão. Estes resultados indicam que as células de cancro do pulmão utilizam, pelo menos, algumas etapas desta via com a finalidade de se adaptarem às condições de baixa glicose, como resultado do fluxo sanguíneo insuficiente (Louis *et al.*, 2016). Um estudo da autoria de Bamji-Stocke e colaboradores sugere que doentes com este tipo de cancro também

apresentam níveis elevados de glutamina. A glutamina pode ser convertida em glutamato, cuja desaminação leva à produção de α -cetoglutarato, um intermediário do ciclo de *Krebs*. Para além disso, esta também pode ser convertida em aspartato, que forma o oxaloacetato, malato, e piruvato por meio do TCA; interessa ainda ressaltar que a glutamina está envolvida na síntese de nucleótidos. Por estas razões, a glutamina é essencial para a proliferação e crescimento das células cancerígenas (Bamji-Stocke, van Berkel, Miller, & Frieboes, 2018).

As alterações da glutamina e do glutamato podem ser interpretadas de acordo com o seu mecanismo metabólico. A glutamina é um metabolito essencial no metabolismo anabólico nas células tumorais, o que a torna um metabolito indispensável para a sobrevivência das células cancerígenas. As células cancerígenas usam a enzima glutaminase para converter a glutamina em glutamato e formar precursores para os processos de anaplerose, síntese de glutatona e produção de ácidos gordos que favorecem a tumorigénese. A própria glutamina também é uma importante fonte de energia para as células tumorais quando a glicose é limitada. Além disso, os níveis elevados de glutamina são uma mais valia para as células tumorais, uma vez que esta é considerada como uma fonte de carbono e nitrogénio, que sustentará a biossíntese e a homeostase celular e, conseqüentemente, o crescimento celular tumoral (Berker *et al.*, 2019).

Da mesma forma, para o aminoácido essencial valina, estudos mostram que tumores de cancro de pulmão apresentam um aumento na sua captação, visto que este aminoácido é essencial para a biossíntese de proteínas (Berker *et al.*, 2019).

Outro aminoácido importante é a glicina. Tal como a glutamina, a glicina também é uma fonte de carbonos que abastece o metabolismo para a síntese de proteínas, lípidos e ácidos nucleicos; assim, o consumo deste aminoácido também se encontra elevado em doentes com carcinoma do pulmão (Berker *et al.*, 2019).

Embora em níveis mais reduzidos, a histidina e a treonina são outros metabolitos utilizados nas vias da glicina, serina e treonina. A treonina é essencial para a produção de colagénio e elastina que são os principais constituintes da matriz extracelular e a histidina é um fator importante na diferenciação celular, estando presente em muitos tipos de cancro, nomeadamente no cancro do pulmão (Bamji-Stocke *et al.*, 2018).

Os níveis séricos de colina são comumente reduzidos nestes doentes, contudo este é um precursor dos fosfolípidos, os quais são o principal constituinte das membranas e são sintetizados em grande quantidade pelos tumores em proliferação, o que torna a colina um possível biomarcador que permitirá a distinção entre os diferentes subtipos de cancro de pulmão, já que alguns subtipos, tais como os carcinomas de células grandes, são mais proliferativos que outros, como os adenocarcinomas. Posto isto, um aumento subsequente

nas fosfatidilcolinas é um bom indicativo de proliferação tumoral, visto serem essenciais na constituição das membranas celulares (Bamji-Stocke *et al.*, 2018).

É importante realçar que devido às elevadas taxas de incidência e mortalidade, o cancro do pulmão constitui um dos principais desafios na área da Oncologia. Contudo, apesar das melhorias no diagnóstico e tratamento deste tipo de cancro, a taxa de sobrevivência em 5 anos continua relativamente baixa, sendo de 16%. Assim, a identificação de marcadores tumorais com recurso à análise metabolómica pode melhorar potencialmente o diagnóstico, o prognóstico e a terapia neste tipo de cancro.

Embora tenham ocorrido grandes avanços no tratamento do cancro do pulmão nos últimos 10 anos, novas estratégias de tratamento são urgentemente necessárias, considerando ainda que uma elevada percentagem de doentes apresentam recidivas após o tratamento. Essas estatísticas fornecem forte motivação para a procura de biomarcadores que possam auxiliar na deteção precoce do cancro de pulmão. Até ao momento, esses biomarcadores não são clinicamente utilizados (Haznadar *et al.*, 2016c). Outra questão, importante e que suporta o motivo desta investigação é que, apesar de tudo o que já se sabe em termos de metabolómica e cancro de pulmão, a distinção entre os doentes em diferentes estádios ainda não está bem estudada, sendo especificamente o que se pretende investigar e aprofundar com a continuidade deste trabalho.

Perante o enorme desafio que é tratar o doente, e tendo em linha de conta todos os constrangimentos assinalados, consideramos imperioso procurar resposta na investigação de fatores de natureza biológica e clínica, suscetíveis de identificar alvos moleculares passíveis de intervenção terapêutica tanto a montante, em termos de prevenção e prognóstico, como de uma terapêutica dirigida com um carácter curativo e, claramente personalizada. Estes são em linha gerais os resultados e a aplicabilidade prática que pretendemos alcançar com este projeto de investigação.

Capítulo V. Conclusão e Perspetivas Futuras

Esta dissertação tinha como objetivo principal, destacar potenciais biomarcadores associados ao metabolismo em linhas celulares representativas de cancro de pulmão que permitissem distinguir diferentes tipos de tumor, estádios e prever a progressão da doença.

Para alcançar esse objetivo, numa fase inicial caracterizaram-se as linhas celulares e demonstrou-se que a linha celular HI299 constitui um modelo representativo do carcinoma de grandes células, enquanto a linha celular A549 do subtipo adenocarcinoma. Verificou-se, ainda, que ambas as linhas celulares não expressam o recetor PD-L1, pelo que não se prosseguiu com os estudos recorrendo aos ICPIs, nomeadamente o nivolumab e o pembrolizumab, já que o seu mecanismo de ação depende deste recetor.

Os fármacos e as combinações, que revelaram maior atividade anti-proliferativa na linha celular HI299, foi a cisplatina associada à gemcitabina na concentração de 5 μM , apresentando um valor de IC_{50} de 40,96 μM . Porém, na linha celular A549, a cisplatina administrada isoladamente foi a que demonstrou maior atividade anti-proliferativa, apresentando um valor de IC_{50} de 13,12 μM . Os valores de IC_{20} obtidos nos ensaios *in vitro* foram superiores aos valores que são administrados na clínica; contudo, foi possível concluir que essas diferenças se podem justificar devido ao subtipo histológico das linhas celulares. Interessa, contudo, ressaltar que existem diversos fatores que diferem entre a clínica e os ensaios *in vitro*, nomeadamente eventos relacionados com a absorção e biodisponibilidade dos fármacos.

O estudo da viabilidade celular permitiu-nos verificar que a diminuição da viabilidade celular não compromete futuras análises metabolómicas, já que esta diminuição é bastante reduzida.

Face às limitações e contratempos previamente mencionados, os objetivos propostos para este projeto de investigação não foram concluídos na totalidade. No entanto, assim que seja possível, os estudos de metabolómica e a identificação de potenciais biomarcadores serão retomados. De facto, pretendemos realizar a curto prazo os estudos de metabolómica nas condições experimentais identificadas nesta dissertação, uma vez que a metabolómica se tornou numa das ferramentas mais poderosas nas áreas da biologia e da medicina, representando uma potencial mais valia no diagnóstico e tratamento do cancro do pulmão.

Como perspetivas futuras, pretende-se então proceder com os estudos de metabolómica e a posterior identificação de alvos moleculares recorrendo à técnica de RMN.

Com base na combinação de espectroscopia de ^1H -RMN com métodos de reconhecimento de padrão de análise de dados multivariada, a metabolómica pode fornecer

características abrangentes das principais vias metabólicas para avaliar o estado do tumor com mais precisão. No contexto deste trabalho, o principal objetivo do recurso à metabolómica é a identificação de biomarcadores que possam ajudar no diagnóstico destas neoplasias, assim como, na distinção entre os diferentes estádios de cancro de pulmão. Assim, a aplicação de RMN na análise metabolómica em oncologia pode ter um grande potencial para fornecer informações valiosas sobre o diagnóstico precoce, opções de tratamento, processos e estimativa de prognóstico de cancro e outras doenças consideradas graves.

Potenciais metabolitos envolvidos na glicólise, ciclo de *krebs*, biossíntese e degradação de lípidos de membrana poderão ajudar a distinguir os diferentes estádios da doença.

Mudanças metabólicas também podem ser facilmente rastreadas antes, durante e depois da quimioterapia, o que poderá indicar a progressão do tumor. Assim, o conhecimento dos diferentes metabolitos que mudam especificamente em diferentes tipos de tumores poderá não só ajudar no diagnóstico clínico, mas também fornecer alvos moleculares adequados para o desenvolvimento de novos fármacos que poderão melhorar a sobrevivência geral do doente.

Metabolitos pertencentes a vias associadas a maiores demandas de energia e aumento do crescimento de células tumorais, como aminoácidos e lactato poderão ajudar a distinguir os diversos tumores, quer sejam malignos ou benignos. Estes metabolitos também podem ser indicativos de progressão subsequente para cancro.

O conhecimento de que as células cancerígenas têm um fenótipo metabólico diferente, juntamente com avanços em especificidade e sensibilidade de técnicas como a RMN, permitiram, na última década, que o estudo da metabolómica em oncologia se tornasse imprescindível. No entanto, ainda permanecem diferentes desafios, uma vez que a metabolómica varia de acordo com a idade, género, raça, hábitos alimentares e fatores ambientais.

A identificação de metabolitos específicos do tecido tumoral poderá ainda ajudar no estudo das diferentes vias metabólicas afetadas em tumores e no desenvolvimento de estratégias de tratamento eficazes. Esses metabolitos também podem diferenciar o tipo de tumor fornecendo soluções fáceis e económicas de métodos de diagnóstico de primeira linha.

Considerando que os metabolitos libertados pelas células tumorais são encontrados no soro do doente, como o lactato, ou aqueles que podem ser absorvidos pelas células tumorais do sangue, como a glutamina e as lipoproteínas de baixa densidade, o uso de biofluidos também se torna uma ferramenta de diagnóstico inicial, além de ser um indicador do ambiente tumoral. Substâncias como o lactato, glutamato, alanina, leucina, glicose e histidina

podem ser úteis no desenvolvimento de um painel de potenciais biomarcadores associados ao metabolismo para a deteção e tratamento eficaz.

Poderemos também, direcionar estudos com o intuito de comparar os metabolitos em tecidos tumorais e biofluidos como sangue e urina, que permitam facilitar a identificação de potenciais biomarcadores específicos para os estádios do tumor com elevada sensibilidade e especificidade.

Estudos de possíveis diferenças entre os metabolitos em pré-terapia, durante a terapia e pós-terapia, podem fornecer marcadores confiáveis para a avaliação das respostas ao tratamento, sem recurso a biopsias ou radiografias. Comparar perfis metabólicos de diferentes tipos de cancro também poderá ser uma mais valia na deteção de biomarcadores que possam ser específicos para o cancro de pulmão.

É importante referir que estes estudos devem ser realizados de maneira relativamente consistente com métodos comparáveis de colheita de amostras, deteção e análise de metabolitos e interpretação de dados. Idealmente, a combinação de marcadores metabólicos com marcadores genómicos, proteómicos e microbiomas podem fornecer um painel ideal de informações para diagnosticar e tratar com maior precisão e sucesso o cancro de pulmão.

Capítulo VI. Referências

- Abrantes, A. M. (2013). *Hipoxia Tumoral: Metabonomica e Imagem Estudo Experimental*. Universidade de Coimbra.
- Alberg, A. J., Brock, M. V., Ford, J. G., Samet, J. M., & Spivack, S. D. (2013). Epidemiology of Lung Cancer. *Chest*, 143(5), e1S–e29S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2345>
- Amaral, R. (2014). *Butirato E Irinotecano : Uma Nova Abordagem Terapêutica Para O Cancro Colo-Rectal*.
- Amorim, M. O., Vieira, M. M., Gonçalves, I. V., Rhana, P., & Rodrigues, A. L. P. (2018). Breast Cancer: tumoral metabolism reprogramming. *Revista Médica de Minas Gerais*, 28. <https://doi.org/10.5935/2238-3182.20180078>
- Ashton, T. M., McKenna, W. G., Kunz-Schughart, L. A., & Higgins, G. S. (2018). Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 24(11), 2482–2490. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3070>
- Avendaño, C., & Menéndes, C. (2008). Antimetabolites. Retrieved November 18, 2019, from <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/antimetabolites>
- Bamji-Stocke, S., van Berkel, V., Miller, D. M., & Frieboes, H. B. (2018). A review of metabolism-associated biomarkers in lung cancer diagnosis and treatment. *Metabolomics : Official Journal of the Metabolomic Society*, 14(6), 81. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1376-2>
- Batista, J. (2015). *Síntese de complexos metálicos de salens e salans para estudos de citotoxicidade*.
- Beloribi-Djefafia, S., Vasseur, S., & Guillaumond, F. (2016). Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*, 5(1), e189–e189. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.49>
- Benson, A., & Agarwala, S. (2018). Rationale for PD-L1 Expression as a Biomarker in Immuno-Oncology. *Journal of Oncology Navigation & Survivorship*, (Part 2 of a 4-Part Series). Retrieved from <http://www.personalizedmedonc.com/publications/faculty-perspectives/faculty-perspectives-rationale-for-pd-l1-expression-as-a-biomarker-in-immuno-oncology/as-a-biomarker-in-immuno-oncology/>

- Bepler, G., Blum, M. G., Chang, A., Cheney, R. T., Chirieac, L. R., Amico, T. A. D., ... Yang, S. C. (2010). Non – Small Cell Lung Cancer Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Oncologist, The*, 8(7), 740–801.
- Berardi, R., Mazzanti, P., Caramanti, M., Santoni, M., De Lisa, M., Morgese, F., ... Savini, A. (2015). Squamous cell carcinoma of the lung: clinical criteria for treatment strategy. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 1(2), 90. <https://doi.org/10.4103/2394-4722.157974>
- Berker, Y., Vandergrift, L. A., Wagner, I., Su, L., Kurth, J., Schuler, A., ... Cheng, L. L. (2019). Magnetic Resonance Spectroscopy-based Metabolomic Biomarkers for Typing, Staging, and Survival Estimation of Early-Stage Human Lung Cancer. *Scientific Reports*, 9(1), 10319. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46643-5>
- Berndt, H. (1966). [On the epidemiology of lung cancer]. *Archiv Fur Geschwulstforschung*, 28(1), 28–42. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.05.06>
- BéruBé, K., Prytherch, Z., Job, C., & Hughes, T. (2010). Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. *Toxicology*, 278(3), 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.04.004>
- Besse, B., Adjei, A., Baas, P., Meldgaard, P., Nicolson, M., Paz-Ares, L., ... ESMO. (2014). 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: non-small-cell lung cancer first-line/second and further lines of treatment in advanced disease. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 25(8), 1475–1484. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu123>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brennan, L. (2014). NMR-based metabolomics: From sample preparation to applications in nutrition research. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 83, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2014.09.001>
- Brito, A. F., Abrantes, A. M., Pinto-Costa, C., Gomes, A. R., Mamede, A. C., Casalta-Lopes,

- J., ... Botelho, M. F. (2012). Hepatocellular carcinoma and chemotherapy: the role of p53. *Chemotherapy*, 58(5), 381–386. <https://doi.org/10.1159/000343656>
- Bunney, P. E., Zink, A. N., Holm, A. A., Billington, C. J., & Kotz, C. M. (2017a). Orexin activation counteracts decreases in nonexercise activity thermogenesis (NEAT) caused by high-fat diet. *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Bunney, P. E., Zink, A. N., Holm, A. A., Billington, C. J., & Kotz, C. M. (2017b). Orexin activation counteracts decreases in nonexercise activity thermogenesis (NEAT) caused by high-fat diet. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Cancer, I. A. for R. on. (2019). Cancer Tomorrow. Retrieved March 18, 2020, from <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>
- Chen, R., Tao, Y., Xu, X., Shan, L., Jiang, H., Yin, Q., ... Yu, Y. (2018). The efficacy and safety of nivolumab, pembrolizumab, and atezolizumab in treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Discovery Medicine*, 26(143), 155–166. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30586539>
- Chen, Y., Ma, Z., Li, A., Li, H., Wang, B., Zhong, J., ... Dai, L. (2015). Metabolomic profiling of human serum in lung cancer patients using liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(4), 705–718. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1846-5>
- Cheng, M.-L., Lin, J.-F., Huang, C.-Y., Li, G.-J., Shih, L.-M., Chiu, D. T.-Y., & Ho, H.-Y. (2019). Sedoheptulose-1,7-bisphosphate Accumulation and Metabolic Anomalies in Hepatoma Cells Exposed to Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2019/5913635>
- Cho, E. S., Cha, Y. H., Kim, H. S., Kim, N. H., & Yook, J. I. (2018). The Pentose Phosphate Pathway as a Potential Target for Cancer Therapy. *Biomolecules & Therapeutics*, 26(1), 29–38. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.179>
- Coelho, R. G., Fortunato, R. S., & Carvalho, D. P. (2018). Metabolic Reprogramming in

Thyroid Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 8(MAR).

<https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00082>

Corps, C. (2011). UK Renal Registry 13th Annual Report (December 2010): Chapter 16: memories of changes in renal care over three decades--the human perspective on registry statistics. *Nephron. Clinical Practice*, 119 Suppl, c269-74.

<https://doi.org/10.1159/000331784>

Dang, C. V. (2012). Links between metabolism and cancer. *Genes & Development*, 26(9), 877–890. <https://doi.org/10.1101/gad.189365.112>

Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>

DeBerardinis, R. J., & Cheng, T. (2010). Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*, 29(3), 313–324.

<https://doi.org/10.1038/onc.2009.358>

Diaz-Ruiz, R., Rigoulet, M., & Devin, A. (2011). The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(6), 568–576.

<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.08.010>

Fiehn, O. (2002). Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48(1–2), 155–171. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860207>

Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2007). Glycolysis in cancer: A potential target for therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(7–8), 1358–1366.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.03.021>

Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., & Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1417–1423.

<https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417>

Globocan Observatory, W. (2019a). Cancer Today - World. *International Agency for Research*

- on *Cancer*, 876, 2018–2019. Retrieved from
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>
- Globocan Observatory, W. (2019b). Globocan 2018 - Portugal. *International Agency for Research on Cancer*, 270, 2018–2019. Retrieved from
<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/620-portugal-fact-sheets.pdf>
- Gonçalves, T. (2014). *Efeito do Butirato no Metabolismo do Cancro Colorretal*.
- Griffin, J. L., & Shockcor, J. P. (2004). Metabolic profiles of cancer cells. *Nature Reviews. Cancer*, 4(7), 551–561. <https://doi.org/10.1038/nrc1390>
- Guo, L., Zhang, H., & Chen, B. (2017). Nivolumab as Programmed Death-1 (PD-1) Inhibitor for Targeted Immunotherapy in Tumor. *Journal of Cancer*, 8(3), 410–416.
<https://doi.org/10.7150/jca.17144>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., & Francisco, S. (2000). The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco, 100, 57–70.
- Hayashi, H., Kurata, T., & Nakagawa, K. (2011). Gemcitabine: Efficacy in the Treatment of Advanced Stage Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 5, CMO.S6252. <https://doi.org/10.4137/CMO.S6252>
- Haznadar, M., Cai, Q., Krausz, K. W., Bowman, E. D., Margono, E., Noro, R., ... Harris, C. C. (2016a). Urinary Metabolite Risk Biomarkers of Lung Cancer: A Prospective Cohort Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 25(6), 978–986. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-1191>
- Haznadar, M., Cai, Q., Krausz, K. W., Bowman, E. D., Margono, E., Noro, R., ... Harris, C. C. (2016b). Urinary Metabolite Risk Biomarkers of Lung Cancer: A Prospective Cohort Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 25(6), 978–986.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-1191>
- Haznadar, M., Cai, Q., Krausz, K. W., Bowman, E. D., Margono, E., Noro, R., ... Harris, C.

C. (2016c). Urinary Metabolite Risk Biomarkers of Lung Cancer: A Prospective Cohort Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 25(6), 978–986.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-1191>

Hodge, C. J., & Apkarian, A. V. (1990). The spinothalamic tract. *Critical Reviews in Neurobiology*, 5(4), 363–397. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>. Understanding

Hollenhorst, M. I., Richter, K., & Fronius, M. (2011). Ion Transport by Pulmonary Epithelia. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2011/174306>

Hu, X., Pu, K., Feng, X., Wen, S., Fu, X., Guo, C., & He, W. (2016). Role of Gemcitabine and Pemetrexed as Maintenance Therapy in Advanced NSCLC: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PloS One*, 11(3), e0149247.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149247>

Huang, C.-Y., Ju, D.-T., Chang, C.-F., Muralidhar Reddy, P., & Velmurugan, B. K. (2017). A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non–small cell lung cancer. *BioMedicine*, 7(4), 23.
<https://doi.org/10.1051/bmdcn/2017070423>

Huang, L., Wang, L., Hu, X., Chen, S., Tao, Y., Su, H., ... Qian, K. (2020). Machine learning of serum metabolic patterns encodes early-stage lung adenocarcinoma. *Nature Communications*, 11(1), 3556. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17347-6>

Iyoda, A., Hiroshima, K., Toyozaki, T., Haga, Y., Fujisawa, T., & Ohwada, H. (2001). Clinical characterization of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma and large cell carcinoma with neuroendocrine morphology. *Cancer*, 91(11), 1992–2000.
[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20010601\)91:11<1992::AID-CNCR1224>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20010601)91:11<1992::AID-CNCR1224>3.0.CO;2-5)

Jin, L., & Zhou, Y. (2019). Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors (Review). *Oncology Letters*, 17(5), 4213–4221.
<https://doi.org/10.3892/ol.2019.10112>

Kaelin, W. G., & Thompson, C. B. (2010). Clues from cell metabolism. *Nature*, 465(7298), 562–564. <https://doi.org/10.1038/465562a>

Kamentsky, L. A. (2001). Laser scanning cytometry. *Methods in Cell Biology*, 32(63), 51–87.
[https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(01\)63007-3](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(01)63007-3)

- Kang, X., Xiao, H.-H., Song, H.-Q., Jing, X.-B., Yan, L.-S., & Qi, R.-G. (2015). Advances in drug delivery system for platinum agents based combination therapy. *Cancer Biology & Medicine*, 12(4), 362–374. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0063>
- Kawano, D., Takeo, S., Katsura, M., Tsukamoto, S., Masuyama, E., & Nakaji, Y. (2012). Surgical treatment of stage IV non-small cell lung cancer. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, 14(2), 167–170. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivr036>
- Knight, D. A., & Holgate, S. T. (2003). The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 8(4), 432–446. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1843.2003.00493.x>
- Kruger, S., Ilmer, M., Kobold, S., Cadilha, B. L., Endres, S., Ormanns, S., ... von Bergwelt-Baildon, M. (2019). Advances in cancer immunotherapy 2019 – latest trends. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 268. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1266-0>
- Lababede, O., Meziane, M., & Rice, T. (2011). Seventh Edition of the Cancer Staging Manual and Stage Grouping of Lung Cancer. *Chest*, 139(1), 183–189. <https://doi.org/10.1378/chest.10-1099>
- Lamego, I. (2015). *Evaluation of the metabolomic response of osteosarcoma cells to conventional and new anticancer drugs by NMR metabolomics*. Aveiro.
- Larsen, J. E., & Minna, J. D. (2011). Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications. *Clinics in Chest Medicine*, 32(4), 703–740. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.08.003>
- Leithner, K., Hrzenjak, A., Trötz Müller, M., Moustafa, T., Köfeler, H. C., Wohlkoenig, C., ... Olschewski, H. (2015). PCK2 activation mediates an adaptive response to glucose depletion in lung cancer. *Oncogene*, 34(8), 1044–1050. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.47>
- Levine, A. J., & Puzio-Kuter, A. M. (2010). The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Science*, 330(6009), 1340–1344. <https://doi.org/10.1126/science.1193494>
- Li, X., Gu, J., & Zhou, Q. (2015). Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy. *Thoracic Cancer*, 6(1), 17–24.

<https://doi.org/10.1111/1759-7714.12148>

- Li, Y., Wang, L. R., Chen, J., Lou, Y., & Zhang, G. B. (2014). First-line gemcitabine plus cisplatin in nonsmall cell lung cancer patients. *Disease Markers*, 2014, 960458. <https://doi.org/10.1155/2014/960458>
- Liang, J., Lu, T., Chen, Z., Zhan, C., & Wang, Q. (2019). Mechanisms of resistance to pemetrexed in non-small cell lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 8(6), 1107–1118. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2019.10.14>
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Louis, E., Adriaensens, P., Guedens, W., Bigirumurame, T., Baeten, K., Vanhove, K., ... Thomeer, M. (2016). Detection of Lung Cancer through Metabolic Changes Measured in Blood Plasma. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(4), 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.01.011>
- Malloy, C. R., Sherry, A. D., & Jeffrey, F. M. H. (1988). Evaluation of carbon flux and substrate selection through alternate pathways involving the citric acid cycle of the heart by ¹³C NMR spectroscopy. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(15), 6964–6971. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)68590-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)68590-4)
- Markley, J. L., Brüschweiler, R., Edison, A. S., Eghbalnia, H. R., Powers, R., Raftery, D., & Wishart, D. S. (2017). The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 43, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.08.001>
- Mehrmohamadi, M., Jeong, S. H., & Locasale, J. W. (2017). Molecular features that predict the response to antimetabolite chemotherapies. *Cancer & Metabolism*, 5(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s40170-017-0170-3>
- Merz, A. L., & Serkova, N. J. (2009). Use of nuclear magnetic resonance-based metabolomics in detecting drug resistance in cancer. *Biomarkers in Medicine*, 3(3), 289–306. <https://doi.org/10.2217/bmm.09.15>
- Mey, V., Giovannetti, E., Braud, F. De, Nannizzi, S., Curigliano, G., Verweij, F., ... Danesi, R. (2006). In vitro synergistic cytotoxicity of gemcitabine and pemetrexed and

- pharmacogenetic evaluation of response to gemcitabine in bladder cancer patients. *British Journal of Cancer*, 95(3), 289–297. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603242>
- Miranda-Gonçalves, V., Lameirinhas, A., Henrique, R., & Jerónimo, C. (2018). Metabolism and Epigenetic Interplay in Cancer: Regulation and Putative Therapeutic Targets. *Frontiers in Genetics*, 9(OCT). <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00427>
- Mirsadraee, S. (2012). The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications. *World Journal of Radiology*, 4(4), 0. <https://doi.org/10.4329/wjr.v4.i4.128>
- Miyamoto, S., Taylor, S., Barupal, D., Taguchi, A., Wohlgemuth, G., Wikoff, W., ... Fiehn, O. (2015). Systemic Metabolomic Changes in Blood Samples of Lung Cancer Patients Identified by Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Metabolites*, 5(2), 192–210. <https://doi.org/10.3390/metabo5020192>
- Moo-Young, M., Bull, A. T., Dalton, H., Cooney, C. L., Humphrey, A. E., Blanch, H. W., ... Bram, J. (1986). Comprehensive biotechnology. *Annales de l'Institut Pasteur / Virologie*, 137, 344–345. [https://doi.org/10.1016/S0769-2617\(86\)80233-7](https://doi.org/10.1016/S0769-2617(86)80233-7)
- Moorsel, C. J., Pinedo, H. M., Veerman, G., Bergman, A. M., Kuiper, C. M., Vermorken, J. B., ... Peters, G. J. (1999). Mechanisms of synergism between cisplatin and gemcitabine in ovarian and non-small-cell lung cancer cell lines. *British Journal of Cancer*, 80(7), 981–990. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690452>
- Muñoz-Pinedo, C., El Mjiyad, N., & Ricci, J.-E. (2012). Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell Death & Disease*, 3(1), e248–e248. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.123>
- Muro, E., Atilla-Gokcumen, G. E., & Eggert, U. S. (2014). Lipids in cell biology: how can we understand them better? *Molecular Biology of the Cell*, 25(12), 1819–1823. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-09-0516>
- Nagy, M. (2011). HIF-1 is the Commander of Gateways to Cancer. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 03(02), 35–40. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000054>
- Nasim, F., Sabath, B. F., & Eapen, G. A. (2019). Lung Cancer. *Medical Clinics of North America*, 103(3), 463–473. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.12.006>

- Nicholson, J. K., Lindon, J. C., & Holmes, E. (1999). "Metabonomics": understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29(11), 1181–1189. <https://doi.org/10.1080/004982599238047>
- Nicolas, C., Becker, J., Sanchou, L., Letisse, F., Wittmann, C., Portais, J.-C., & Massou, S. (2008). Measurement of isotopic enrichments in ¹³C-labelled molecules by 1D selective Zero-Quantum Filtered TOCSY NMR experiments. *Comptes Rendus Chimie*, 11(4–5), 480–485. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2007.06.018>
- Noreldeen, H. A. A., Liu, X., & Xu, G. (2020). Metabolomics of lung cancer: Analytical platforms and their applications. *Journal of Separation Science*, 43(1), 120–133. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900736>
- Oronsky, B. T., Reid, T., Knox, S. J., & Scicinski, J. J. (2012). The Scarlet Letter of Alkylation: A Mini Review of Selective Alkylating Agents. *Translational Oncology*, 5(4), 226–229. <https://doi.org/10.1593/tlo.12187>
- Peng, L., Jiang, H., & Bradley, C. (2001). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on lymphoma cells undergoing apoptosis. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao = Journal of West China University of Medical Sciences = Huaxi Yike Daxue Xuebao / [Bian Ji Zhe, Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao Bian Wei Hui]*, 32(4), 602–604, 620. <https://doi.org/10.1182/blood.v84.5.1415.bloodjournal8451415>
- Pereira, S. L., Ramalho-Santos, J., Branco, A. F., Sardão, V. A., Oliveira, P. J., & Carvalho, R. A. (2011). Metabolic remodeling during H9c2 myoblast differentiation: relevance for in vitro toxicity studies. *Cardiovascular Toxicology*, 11(2), 180–190. <https://doi.org/10.1007/s12012-011-9112-4>
- Peres, L. A. Ibert. B., & da Cunha, A. D. anta. (2013). Acute nephrotoxicity of cisplatin: molecular mechanisms. *Jornal Brasileiro de Nefrologia : 'orgao Oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia*, 35(4), 332–340. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20130052>
- Phelps, R. M., Johnson, B. E., Ihde, D. C., Gazdar, A. F., Carbone, D. P., McClintock, P. R., ... Mulshine, J. L. (1996). NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line data base. *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement*, 24(S24), 32–91. <https://doi.org/10.1002/jcb.240630505>

- Pitot, H. C. (1993). The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*, 72(3 Suppl), 962–970.
[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19930801\)72:3+<962::aid-cncr2820721303>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930801)72:3+<962::aid-cncr2820721303>3.0.co;2-h)
- Planchard, D., Popat, S., Kerr, K., Novello, S., Smit, E. F., Faivre-Finn, C., ... Peters, S. (2018). Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 29(September), iv192-iv237.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdy275>
- Quintas, A., Freire, A. P., & Halpern, M. J. (2008). *Bioquímica - Organização Molecular da Vida*. (Lidel, Ed.) (2ª edição). Lisboa.
- Riley, R. S., June, C. H., Langer, R., & Mitchell, M. J. (2019). Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(3), 175–196.
<https://doi.org/10.1038/s41573-018-0006-z>
- Rocha, C. M., Carrola, J., Barros, A. S., Gil, A. M., Goodfellow, B. J., Carreira, I. M., ... Duarte, I. F. (2011). Metabolic Signatures of Lung Cancer in Biofluids: NMR-Based Metabonomics of Blood Plasma. *Journal of Proteome Research*, 10(9), 4314–4324.
<https://doi.org/10.1021/pr200550p>
- Ruiying, C., Zeyun, L., Yongliang, Y., Zijia, Z., Ji, Z., Xin, T., & Xiaojian, Z. (2020). A comprehensive analysis of metabolomics and transcriptomics in non-small cell lung cancer. *PLOS ONE*, 15(5), e0232272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232272>
- Ryan, D. G., Murphy, M. P., Frezza, C., Prag, H. A., Chouchani, E. T., O'Neill, L. A., & Mills, E. L. (2019). Coupling Krebs cycle metabolites to signalling in immunity and cancer. *Nature Metabolism*, 1(1), 16–33. <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0014-7>
- Saeed, S., Khan, J. A., Iqbal, N., Irfan, S., Shafique, A., & Awan, S. (2019). Cancer and how the patients see it; prevalence and perception of risk factors: a cross-sectional survey from a tertiary care centre of Karachi, Pakistan. *BMC Public Health*, 19(1), 360.
<https://doi.org/10.1186/s12889-019-6667-7>
- Sak, K. (2012). Chemotherapy and Dietary Phytochemical Agents. *Chemotherapy Research and Practice*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/282570>
- Santos, C. R., & Schulze, A. (2012). Lipid metabolism in cancer. *FEBS Journal*, 279(15), 2610–

2623. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x>

Sarmiento, R. (2016). *UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Efeitos citoprotetor e citotóxico de Annona glabra (Annonaceae)*
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Efeitos citoprotetor e citotóxico de Annona glabra (Ann.

Shaito, A., Posadino, A. M., Younes, N., Hasan, H., Halabi, S., Alhababi, D., ... Pintus, G. (2020). Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/ijms21062084>

Sierra, H., Cordova, M., Chen, C.-S. J., & Rajadhyaksha, M. (2015). Confocal Imaging–Guided Laser Ablation of Basal Cell Carcinomas: An Ex Vivo Study. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(2), 612–615. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

Soleas, J. P., Paz, A., Marcus, P., McGuigan, A., & Waddell, T. K. (2012). Engineering Airway Epithelium. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/982971>

Sousa, G. F. de, Wlodarczyk, S. R., & Monteiro, G. (2014). Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(4), 693–701. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502014000400004>

Sreedhar, A., & Zhao, Y. (2017). Dysregulated metabolic enzymes and metabolic reprogramming in cancer cells (Review). *Biomedical Reports*, 8(1), 3–10. <https://doi.org/10.3892/br.2017.1022>

Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, A. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114(8), 785–796. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>

Stubbs, M., & Griffiths, J. R. (2010). The altered metabolism of tumors: HIF-1 and its role in the Warburg effect. *Advances in Enzyme Regulation*, 50(1), 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2009.10.027>

Sundar, R., Cho, B.-C., Brahmer, J. R., & Soo, R. A. (2015). Nivolumab in NSCLC: latest

- evidence and clinical potential. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 7(2), 85–96. <https://doi.org/10.1177/1758834014567470>
- Suzanne Klimberg, V., & McClellan, J. L. (1996). Glutamine, cancer, and its therapy. *The American Journal of Surgery*, 172(5), 418–424. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(96\)00217-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(96)00217-6)
- Tang, Y., Wang, Y., & Teng, X. (2013). Sequence-dependent effect of gemcitabine and cisplatin on A549 non-small-cell lung cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 8(1), 221–226. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1495>
- Tavares, A., & Tavares, J. (2009). *Princípios gerais de culturas de células e citometria de fluxo para avaliação dos efeitos da radiação ionizante - Relatório Interno. Universidade do Porto.*
- Terasaki, H., Niki, T., Matsuno, Y., Yamada, T., Maeshima, A., Asamura, H., ... Hirohashi, S. (2003). Lung Adenocarcinoma With Mixed Bronchioloalveolar and Invasive Components. *The American Journal of Surgical Pathology*, 27(7), 937–951. <https://doi.org/10.1097/00000478-200307000-00009>
- Thatcher, N., Hirsch, F. R., Luft, A. V., Szczesna, A., Ciuleanu, T. E., Dediu, M., ... SQUIRE Investigators. (2015). Nectin-4 antibody plus gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line therapy in patients with stage IV squamous non-small-cell lung cancer (SQUIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 16(7), 763–774. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00021-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00021-2)
- Torgovnick, A., & Schumacher, B. (2015). DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Frontiers in Genetics*, 6(APR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00157>
- Toschi, L., Finocchiaro, G., Bartolini, S., Gioia, V., & Cappuzzo, F. (2005). Role of gemcitabine in cancer therapy. *Future Oncology*, 1(1), 7–17. <https://doi.org/10.1517/14796694.1.1.7>
- Travis, W. D. (2011). Pathology of Lung Cancer. *Clinics in Chest Medicine*, 32(4), 669–692. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.08.005>
- UyBico, S. J., Wu, C. C., Suh, R. D., Le, N. H., Brown, K., & Krishnam, M. S. (2010). Lung Cancer Staging Essentials: The New TNM Staging System and Potential Imaging Pitfalls. *RadioGraphics*, 30(5), 1163–1181. <https://doi.org/10.1148/rg.305095166>

- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Vansteenkiste, J., De Ruyscher, D., Eberhardt, W. E. E., Lim, E., Senan, S., Felip, E., ... ESMO Guidelines Working Group. (2013). Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 24 Suppl 6(July), vi89-98. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt241>
- Wang, J., Wang, X., Xu, X., Li, S., & Liu, X. (2020). Expression and Significance of CK5/6, P63, P40, CK7, TTF-1, NapsinA, CD56, Syn and CgA in Biopsy Specimen of Squamous Cell Carcinoma, Adenocarcinoma and Small Cell Lung Carcinoma. *International Journal of Morphology*, 38(2), 247–251. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022020000200247>
- Wang, S., Zhang, H., Cheng, L., Evans, C., & Pan, C.-X. (2010). Analysis of the cytotoxic activity of carboplatin and gemcitabine combination. *Anticancer Research*, 30(11), 4573–4578. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115908>
- Wistuba, I. I., & Gazdar, A. F. (2006). LUNG CANCER PRENEOPLASIA. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 1(1), 331–348. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100103>
- Yang, T.-Y., Chang, G.-C., Hsu, S.-L., Huang, Y.-R., Chiu, L.-Y., & Sheu, G.-T. (2013). Effect of Folic Acid and Vitamin B12 on Pemetrexed Antifolate Chemotherapy in Nutrient Lung Cancer Cells. *BioMed Research International*, 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/389046>
- Yu, L., Li, K., & Zhang, X. (2017). Next-generation metabolomics in lung cancer diagnosis, treatment and precision medicine: mini review. *Oncotarget*, 8(70), 115774–115786. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22404>
- Zhang, J., Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2017). Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. *The EMBO Journal*, 36(10), 1302–1315. <https://doi.org/10.15252/embj.201696151>
- Zheng, M. (2016). Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 25(3), 447–468. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.003>