

Ana Cláudia Batista Jordão Ribeiro

NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA PARA O COLANGIOCARCINOMA

Do NIS à Radioterapia Metabólica

Dissertação de Mestrado em Investigação Biomédica, orientada pela Professora Doutora Maria Filomena Botelho e pelo Professor Doutor José Guilherme Tralhão, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Maio de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

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

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

*“Cada um cumpre o destino que lhe cumpre,
E deseja o destino que deseja;
Nem cumpre o que deseja,
Nem deseja o que cumpre.”*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no oceano. Mas o oceano seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Início os meus agradecimentos com esta frase de Madre Teresa de Calcutá, porque foi para mim uma grande honra fazer parte deste oceano, poder contribuir para este trabalho de pesquisa e ter podido contar com todos vós, que tornaram possível ultrapassar mais uma etapa na minha formação académica. Assim, não poderia deixar de apresentar os meus sentidos e profundos agradecimentos.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, diretora da Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, por me ter dado a honra e oportunidade de fazer parte da sua equipa e deste projeto em particular. Pela disponibilidade, incentivo e partilha de conhecimentos científicos, o meu muito obrigada.

Ao Professor Doutor José Guilherme Tralhão, por ter aceite coorientar este trabalho, pela disponibilidade e simpatia sempre demonstradas.

À Mestre Alexandra Fernandes, pela ideia deste projeto, fundamental para a execução deste trabalho de investigação.

À Sociedade Portuguesa de Gastrenterologia, por ter cedido as verbas necessárias para que se pudesse seguir em frente. Bem hajam.

À Doutora Ana Margarida Abrantes, agradeço todas as críticas e também o modo como me fez pensar, aclarar e transmitir as minhas ideias. A disponibilidade e sugestões preciosas para levar a bom termo esta dissertação.

À Mestre Ana Filipa Brito, meu principal apoio neste projeto, agradeço toda a confiança que depositou em mim, todo o trabalho que me deu, conselhos, opiniões, partilha de conhecimentos e a aceitação pronta das minhas ideias e o esforço para que estas pudessem ser postas em prática, enfim, um sem número de coisas que me permitiram crescer, pensar, pensar mais à frente e querer ir mais à frente. Obrigada Ana.

À Mestre Mafalda Laranjo, pela disponibilidade e prontidão na ajuda com os ensaios de imunofluorescência, pelos conselhos precisos de otimização da técnica e sobretudo pelo incentivo que me deu ao longo deste trabalho.

À Mestre Kathleen Santos, colega, colaboradora e amiga, pela simpatia e companheirismo, pelo apoio diário e total disponibilidade sempre demonstrados durante este longo ano, e também pelas boleias...

Ao Mestre Ricardo Teixo, colega sempre pronto a ajudar, pela disponibilidade para acompanhar o trabalho laboratorial sempre que necessário, mas sobretudo pela sua amizade.

À Mestre Ana Cristina Gonçalves pela disponibilidade, colaboração e empenho na realização dos estudos de citometria de fluxo.

Ao Mestre João Casalta, agradeço a paciência com que sempre me ouviu e me esclareceu dúvidas, as horas de trabalho despendidas para ajudar na análise estatística dos resultados deste trabalho, a sua disponibilidade, amizade e simpatia, sempre demonstrados.

Aos Mestres Ana Salomé Pires, Ana Catarina Mamede, Sara Ferreira e Fernando Mendes, pela sua disponibilidade constante, cooperação, simpatia e incentivos sempre demonstrados.

À Ana Ferreira, amiga, colega e companheira já de um outro ciclo de estudos, agradeço o apoio e alegria constantes. Agradeço também os incentivos, partilha de conhecimentos e discussão de ideias, que mantivemos ao longo deste ano de trabalho.

Aos meus colegas de Mestrado Tânia Costa, Telmo Gonçalves, Sara Guerra, Tiago Sales, Susann Schugk, João Encarnação, Denise Aniceto e Ana Moço um agradecimento especial pelos bons momentos que passamos juntos, pelo companheirismo e espírito de entre ajuda sempre demonstrados, quer nos momentos bons quer nos menos bons.

A todos os outros colegas que foram passando ao longo deste ano pelo laboratório e que de alguma forma contribuíram também para o meu crescimento, em especial ao Marco Ferreira, pela ajuda preciosa nas últimas semanas de trabalho laboratorial.

À Ana Cláudia Caridade por toda a simpatia e disponibilidade sempre demonstradas.

Ao Professor Doutor Cláudio Maia, pela disponibilidade, conselhos e sugestões que me permitiram abrir horizontes e abraçar este projeto, e sobretudo pela sua amizade. Também à Sandra e ao Rodrigo, com quem partilhei bons momentos de descontração, tão precisos no decorrer deste ciclo de estudos.

Não poderia deixar de agradecer sobretudo aos meus pais, pelo apoio e ajuda incansáveis, incentivo incessante, preocupação constante e os sacrifícios que fizeram para que eu pudesse alcançar esta meta a que me propus dois anos atrás. Também ao meu irmão e cunhada, pelo amor que nos une e nos torna mais fortes e capazes de enfrentar a vida.

À Camila, Mimi, Clarinha, Maria, Manel e Alice, pela companhia e momentos de relaxamento que me obrigaram a usufruir.

Às minhas colegas de casa Patrícia Santos, Lílíana Geraldés e Lorena Ríos por estarem sempre lá, para me ouvirem, aturarem o mau humor e sempre prontas para ajudar a ultrapassar as dificuldades, pelo apoio e horas passadas comigo no hospital, pelas consultas grátis e por todos os bons momentos que passamos juntas.

Por fim, resta-me pedir desculpa se por lapso me faltou referir alguém a quem certamente também estou agradecida. Mais pessoas me apoiaram e encorajaram durante este longo ano de trabalho mas não seria possível agradecer devidamente a todos. Assim, deixo apenas um agradecimento profundo aos que acreditaram em mim desde o início.

ÍNDICE

RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
ABREVIATURAS	XV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Colangiocarcinoma	3
1.1.1 Abordagem Terapêutica.....	7
1.1.1.1 Quimioterapia	9
1.1.1.2 Radioterapia	10
1.2 Bomba de Sódio e Iodo	11
1.3 NIS em Colangiocarcinoma	14
1.4 Efeitos da Radiação	18
1.4.1 Espécies Reativas de Oxigênio	21
1.4.2 Proteína P53	23
1.4.3 Morte Celular.....	25
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Cultura Celular	39
3.2 Avaliação da Expressão de NIS	40
3.3 Estudos de Captação e Retenção de Iodo-131	42
3.4 Irradiação com Iodo-131	45
3.5 Avaliação da Sobrevivência Celular	46
3.6 Determinação de Danos causados no DNA	48
3.7 Citometria de Fluxo	50
3.7.1 Avaliação da Viabilidade Celular e Tipos de Morte Celular Induzidos.....	51
3.7.2 Avaliação da Expressão de BAX, BCL-2 e Citocromo c.....	53
3.7.3 Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial	54
3.7.4 Avaliação do Ciclo Celular	55

3.7.5 Avaliação da Produção Intracelular de Espécies Reativas de Oxigénio e de Defesas Antioxidantes	56
3.7.5.1 Avaliação da Produção Intracelular de Peróxidos	56
3.7.5.2 Avaliação da Produção Intracelular de Radical Superóxido	57
3.7.5.3 Avaliação da Expressão Intracelular de Glutathione Reduzida	57
3.8 Avaliação da Expressão Intracelular de Superóxido Dismutase	58
3.9 Análise Estatística	61
4. RESULTADOS	63
4.1 Expressão de NIS	65
4.2 Captação e Retenção de Iodo-131	67
4.3 Efeitos celulares do Iodo-131	69
4.3.1 Sobrevivência Celular	69
4.3.2 Vias de Morte Celular.....	70
4.3.2.1 Viabilidade Celular e Tipos de Morte Celular Induzidos	70
4.3.2.2 Expressão de BAX, BCL-2 e Citocromo c.....	72
4.3.2.3 Potencial de Membrana Mitocondrial	75
4.3.3 Ciclo Celular.....	76
4.3.4 Danos causados no DNA.....	77
4.3.5 Stresse Oxidativo	81
4.3.5.1 Produção Intracelular de Peróxidos	81
4.3.5.2 Produção Intracelular de Radical Superóxido	83
4.3.5.3 Expressão Intracelular de Glutathione Reduzida.....	84
4.3.5.4 Expressão Intracelular de Superóxido Dismutase	86
5. DISCUSSÃO.....	89
6. CONCLUSÕES.....	103
7. PERSPETIVAS FUTURAS.....	107
BIBLIOGRAFIA	113

RESUMO

O colangiocarcinoma (CC) é uma neoplasia com mau prognóstico que possui uma taxa de sobrevivência diminuta, tornando-se crucial investigar novas opções terapêuticas para este tipo de tumor altamente agressivo. Recentemente foi demonstrado que o CC apresenta expressão aumentada de NIS (do inglês *sodium iodide symporter*), uma molécula que medeia a captação de iodo. É sabido que o NIS possui um papel preponderante na radioterapia metabólica com iodo-131 para o tratamento de tumores da tireóide, sendo também atualmente alvo de investigação ativa para o tratamento de tumores extra-tiroideus. Assim, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o potencial terapêutico da radioterapia metabólica com iodo-131 numa linha celular de CC.

Para tal, foi utilizada uma linha celular humana de CC extrahepático, a linha TFK-1. Os estudos foram iniciados pela determinação da expressão de NIS na linha celular, e para além disso realizaram-se estudos de captação e de retenção de iodo-131. Posteriormente as células foram sujeitas a doses de radiação entre 0,35 e 60 Gy com este radioisótopo, para avaliar e caracterizar os efeitos da radioterapia metabólica ao nível da sobrevivência celular, danos no DNA, tipos e mecanismos de morte celular induzidos e alterações no ciclo celular.

Verificou-se que as células TFK-1 expressam NIS, aumentando a captação após irradiação. Em concordância, o iodo-131 é captado e retido por esta linha celular. Observou-se que o tratamento com iodo-131 induziu danos severos no DNA e um decréscimo da sobrevivência celular, dependentes da dose de radiação. O tipo de morte celular predominantemente induzido foi a apoptose, seguida por uma tendência para o aumento da razão BAX/BCL-2, despolarização da membrana mitocondrial e libertação de citocromo c. Após a irradiação, verificou-se um aumento da produção de radical superóxido e de peróxidos intracelulares. Observou-se também uma tendência para o

aumento da expressão de superóxido dismutase e de glutathione reduzida. No que se refere à análise do ciclo celular, não se verificaram diferenças relativamente ao controlo.

Desta forma foi possível concluir que as células TFK-1 expressam NIS, o que permite a captação de iodo-131. Consequentemente, a irradiação com iodo-131 induz danos no DNA, resultando numa diminuição da sobrevivência e da viabilidade celular bem como um aumento da morte celular principalmente por apoptose, através da via mitocondrial. O radical superóxido e os peróxidos intracelulares parecem estar envolvidos neste processo. Pelo exposto, a radioterapia metabólica com iodo-131 poderá ser uma opção promissora para o tratamento do CC.

ABSTRACT

Cholangiocarcinoma (CC) is a malignancy that has poor prognosis and low survival rate, being crucial to investigate new therapeutic options for this highly aggressive type of tumour. Recently, it was shown that CC has increased expression of sodium iodide symporter (NIS), a molecule that mediates the iodine uptake. It is already known that NIS has a key role in metabolic radiotherapy, using iodine-131, in the treatment of thyroid tumours, being also currently under active investigation for the treatment of extra thyroidal tumours. Thus, the aim of this study was to evaluate the therapeutic efficacy of metabolic radiotherapy with iodine-131 in a CC cell line.

To this end, a human extrahepatic CC cell line was used, the TFK-1 cell line. Studies were started by determining the expression of NIS, in this cell line, and furthermore, iodine-131 influx and efflux studies were performed. Subsequently, the cells were irradiated with doses of this radioisotope from 0.35 to 60 Gy, in order to evaluate and characterize the effects of metabolic radiotherapy on cell survival, DNA damages, type and mechanisms of induced cell death, and cell cycle changes.

It was found that TFK-1 cells express NIS that increases after irradiation. Accordingly to this result, the iodine-131 is captured and retained by this cell line. It was observed that the treatment with iodine-131 induces severe DNA damages and a decrease in cell survival, dependent on the dose. The predominant type of induced cell death was apoptosis, followed by a tendency to increase of the BAX/BCL-2 ratio, mitochondrial membrane depolarization, and release of cytochrome c. After irradiation, it was observed an increase on superoxide anion and intracellular peroxides production. It was also observed a tendency to increase of superoxide dismutase and glutathione expression. Regarding the cell cycle, there were no differences compared to the control.

Thus, it was possible to conclude that TFK-1 cells express NIS, which allows iodine-131 uptake. Consequently, irradiation with iodine-131 induced severe DNA

damage and caused a decrease in cells survival and viability as well as cell death mainly by apoptosis, through mitochondrial pathway. Superoxide anion and intracellular peroxides seem to be involved in this process. So, metabolic radiotherapy with iodine-131 could be a promising option for the treatment of CC.

ABREVIATURAS

ABPF	Agarose de baixo ponto de fusão
AIFs	<i>Apoptosis inducing factors</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APFN	Agarose de ponto de fusão normal
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
ATR	ATM e Rad3 relacionada
AV	Anexina V
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-W	<i>Bcl-2-like protein 2</i>
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BFL-1	<i>Bcl-2-related protein A1</i>
BID	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
BIM	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
BMF	<i>Bcl-2-modifying factor</i>
BOK	<i>Bcl-2-related ovarian killer</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CA 19-9	<i>Carbohydrate antigen 19-9</i>
Caspase	<i>cysteine-aspartic proteases</i>

CC	Colangiocarcinoma
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A gene</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CHK	<i>Csk homologous kinase</i>
CO₂	Dióxido de Carbono
CPM	Contagens por minuto
CTNNB1	<i>Catenin (cadherin-associated protein), beta 1 gene</i>
DCF	2'-7'-diclorodihidrofluoresceína
DCFH₂-DA	2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DDR	<i>DNA damage response</i>
DHE	Dihidroetidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
ECC	<i>Extrahepatic cholangiocarcinoma</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GSH	Glutaciona reduzida
HEPES	<i>4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
ICC	<i>Intrahepatic cholangiocarcinoma</i>
IP	Iodeto de propídeo
JC-1	<i>5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol carbocyanine</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog gene</i>

LET	<i>Linear energy transfer</i>
MCL-1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
MIF	Média de intensidade de fluorescência
NIS	<i>Sodium iodide symporter</i>
NOXA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
P21	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
P53	Proteína supressora tumoral P53
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS-AB	PBS com 0,02% de Azida de sódio e 0,02% de BSA
PE	<i>Phycoerythrin</i>
Puma	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuclease
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SF	<i>Surviving Fraction</i>
SOD	Superóxido dismutase
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
T_{1/2}	Período de semi-desintegração
TP53	<i>Tumor protein p53 gene</i>
WST	<i>Water-soluble tetrazolium</i>

1. INTRODUÇÃO

O cancro é a principal causa de morte em países desenvolvidos e a segunda causa de morte em países em desenvolvimento (1). Em 2012, surgiram cerca de 14,1 milhões de novos casos e ocorreram cerca de 8,2 milhões de mortes em todo mundo, dos quais 57% dos novos casos e 65% das mortes foram verificadas nas regiões menos desenvolvidas. Estes números tendem a subir, prevendo-se um aumento do número de novos casos para cerca de 22 milhões nas duas próximas décadas (2).

1.1 COLANGIOCARCINOMA

O colangiocarcinoma (CC) é um tumor raro, com mau prognóstico, que resulta da transformação maligna de colangiócitos, células que constituem a parede da árvore biliar (3–6). De forma semelhante ao que acontece com outros tumores, o CC desenvolve-se como um processo de transformação celular em várias etapas (7). Mais especificamente e como se pode verificar na Figura 1, a transformação maligna de colangiócitos desenvolve-se geralmente no contexto de inflamação crónica dos ductos biliares, independentemente da existência de fatores de risco associados, com consequente dano celular associado com a obstrução do fluxo biliar (5–7). De facto, durante este processo de inflamação crónica, são libertadas citocinas para o microambiente biliar e ao ativarem sinais proliferativos autónomos, estas moléculas promovem e mantêm o processo de colangiocarcinogénese (7). Se por um lado, as citocinas levam à aceleração do ciclo celular, favorecendo a acumulação de mutações somáticas, por outro, é induzido dano em proteínas e genes de reparação de *mismatch* de DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*), proto-oncogenes e genes supressores tumorais (envolvidos no crescimento celular, apoptose, neoangiogénese e capacidade de invasão), sendo que os principais genes alterados durante o desenvolvimento do CC são o *KRAS*, o *TP53*, o *CDKN2A* e o *CTNNB1* (5–8). Assim, este processo é caracterizado pela acumulação progressiva de

alterações cromossómicas, genéticas e epigenéticas (7). Como resultado final, ocorre sobreprodução de citocinas, fatores de crescimento e hormonas que conduzem os colangiócitos a alterações irreversíveis na sua fisiologia celular, como o crescimento celular descontrolado, elevada capacidade de invasão e capacidade de metastização (5,7) (Figura 1).

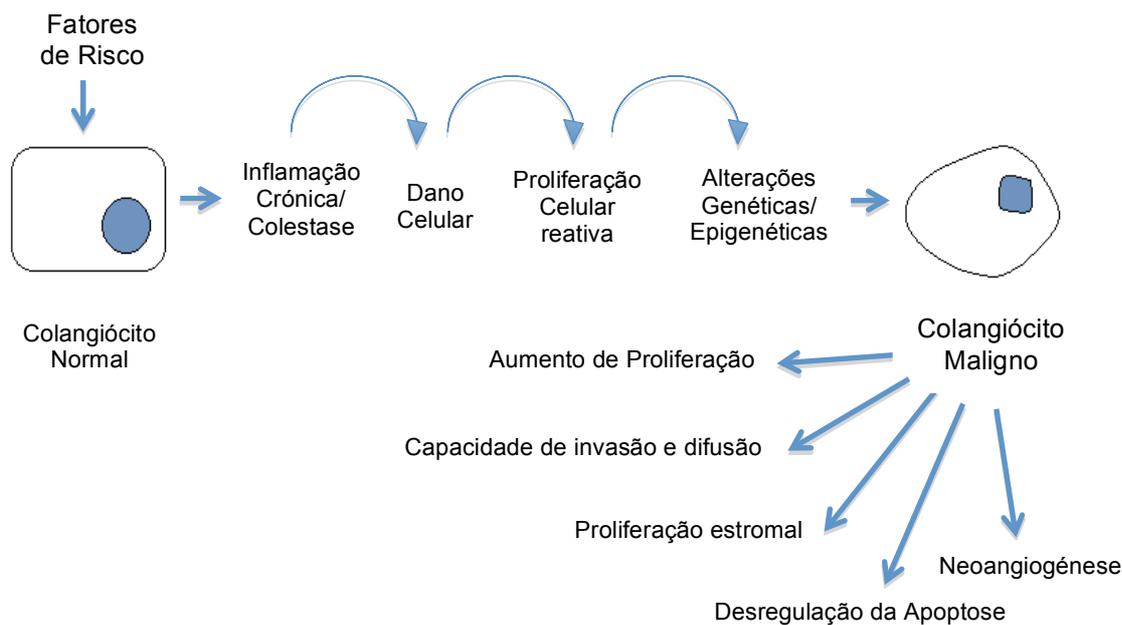


Figura 1 Modelo de colangiocarcinogénese. Adaptado de Fava e colaboradores (7).

Sabe-se que o CC é ligeiramente mais comum no sexo masculino e que o risco de desenvolver esta doença aumenta progressivamente com a idade, sendo que a maioria dos doentes tem mais de 40 anos e que o pico de incidência ocorre na septuagésima década de vida (9–11). Contudo, dados de incidência para o CC são escassos, uma vez que a maioria dos registos de cancro combina os casos de CC com outras neoplasias hepatobiliares, como o carcinoma hepatocelular e o tumor da vesícula biliar (11). Tal deve-se não só ao facto de o CC ser um tumor raro mas também, em parte, por representar um grupo heterogéneo de tumores, tendo em conta a sua localização anatómica. De facto, como demonstrado na Figura 2, o CC pode classificar-

se como intrahepático (ICC, do inglês *intrahepatic cholangiocarcinoma* ou CC periférico) e extrahepático (ECC, do inglês *extrahepatic cholangiocarcinoma*), podendo este último subdividir-se ainda em peri-hilar (ou tumor de Klatskin) e distal (3,10–13). Aproximadamente 10% dos CCs tem origem no interior dos ductos biliares do parênquima hepático (ICC), 50–60% têm origem na bifurcação dos ductos hepáticos (CC peri-hilar) e 20–30% desenvolve-se no ducto biliar distal comum (CC distal), sendo que mais de 90% dos CCs são adenocarcinomas bem diferenciados (8,14). Por outro lado, o ICC é o segundo tumor primário do fígado mais comum, representando cerca de 10 a 20% das neoplasias hepáticas primitivas, pelo que frequentemente, dados estatísticos sobre este tipo de CC aparecem associados aos do carcinoma hepatocelular (3,9,10,12,15,16).

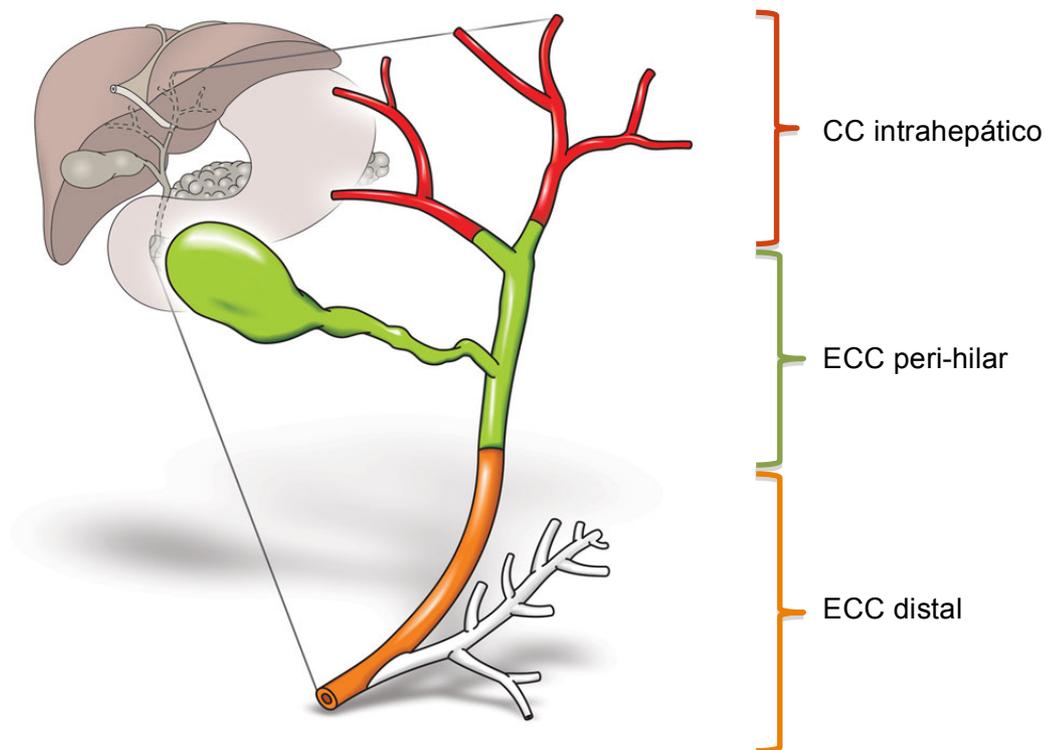


Figura 2 Classificação anatômica do colangiocarcinoma. Adaptado de *Cholangiocarcinoma Defined* (17).

Para 2013, foi estimada a ocorrência de 30 640 novos casos e 21 670 mortes por carcinoma hepatocelular e ICC, nos EUA (10). Já na Europa, segundo os dados da iniciativa *Cancer Incidence in Five Continents*, são diagnosticados por ano, aproximadamente 50 mil novos casos de tumores hepáticos primários, dos quais aproximadamente 20% são ICCs (14). A incidência do CC no geral (e do ICC em particular) varia, principalmente, de acordo com a região geográfica, encontrando-se a mais elevada no sudeste Asiático e a mais baixa na Austrália. De facto, para o ICC, as taxas de incidência são tão elevadas como 96 por cada 100 mil habitantes nos homens e 38 por cada 100 mil habitantes nas mulheres do nordeste da Tailândia, como tão baixas como 0,2 em 100 mil entre homens e 0,1 por 100 mil entre mulheres na Austrália (5,18). Com efeito, embora a maioria dos casos de CC (aproximadamente 90%) seja esporádico e não apresente fatores de risco identificáveis para além da idade, existem alguns fatores de risco que são mais prevalentes em certas regiões geográficas e que estão assim associados à variabilidade na incidência do CC a nível mundial (3,6,11,14,19). Um dos fatores de risco melhor conhecidos para o CC no mundo ocidental é a colangite esclerosante primária, existindo outros fatores de risco estabelecidos para o CC, como parasitas de regiões endémicas da Ásia (*Opisthorchis viverrini* e *Clonorchis sinensis*), quistos nos ductos biliares, hepatolitíase, contaminações com toxinas (incluindo nitrosaminas, dioxina, asbestos, torotraste) e radão (3,5,6,8–11,14,19). Potenciais fatores de risco menos estabelecidos incluem, nos países ocidentais a infeção pelo vírus da hepatite C (associado com o ICC mas não com o ECC), nos países asiáticos a infeção pelo vírus da hepatite B (associado com o ICC), a cirrose hepática, a diabetes *mellitus*, o álcool e alguns polimorfismos genéticos (3,5,9–11). Contudo, como já referido, frequentemente nenhuma destas condições é detetada nos doentes afetados por este tumor altamente agressivo (7).

No que se refere ao prognóstico do CC, este é geralmente mau, uma vez que a taxa de sobrevivência a 5 anos é inferior a 5% e que cerca de 75% dos doentes morrem durante o primeiro ano após o diagnóstico, devido ao estado avançado da doença que

impede a eficácia de uma remoção cirúrgica (14). Por outro lado, quando esta abordagem terapêutica é possível e bem sucedida (isto é, em tumores com margens cirúrgicas negativas), a taxa de sobrevivência a 5 anos varia entre 20 e 35% e a taxa de recorrência, para o mesmo período, varia entre 60 e 90% (4,14). Deste modo, devido ao seu mau prognóstico, as taxas de incidência e mortalidade para o CC tendem a ser semelhantes (11).

De forma geral, podemos dizer que enquanto que a incidência, a prevalência e a mortalidade por ICC têm vindo a aumentar nos EUA, Europa, Ásia e Austrália, os valores referentes ao ECC têm permanecido semelhantes ou até decrescido ligeiramente (5,10,12,16).

1.1.1 Abordagem Terapêutica

Embora os CCs sejam tumores de crescimento lento que metastizam tardiamente, o seu prognóstico é mau, uma vez que a maioria dos casos se encontra em fase avançada aquando do diagnóstico (5,13). Com efeito, os CCs são neoplasias altamente letais devido à não apresentação de sintomas específicos, ausência de marcadores tumorais efetivos e à não existência de estratégias de rastreio o que, em conjunto, conduz frequentemente a um diagnóstico tardio (4,5,9,10,18,19). Além disso, os sinais clínicos e sintomas associados ao CC dependem da localização do tumor. A icterícia sem dor é o sintoma mais frequente (ocorrendo em mais de 90% dos casos) no ECC, sendo menos frequente em doentes com ICC. O CC associado a colangite esclerosante primária tende a ocorrer em doentes mais jovens (30 a 50 anos), é frequentemente multifocal e raramente passível de remoção (14). Relativamente ao ICC, este surge geralmente *de novo*, na ausência de doença hepatobiliar subjacente, apresentando-se usualmente como uma massa solitária, discreta e de margens pouco definidas (3,8,9,18). De facto, os doentes são frequentemente assintomáticos, mesmo em estágio avançado,

ou apresentam sintomas não específicos como dor abdominal, suores noturnos, fadiga, náuseas e anorexia (3,18,20,21). Assim, embora provavelmente a doença já se encontre em fase avançada, os doentes que apresentem colestase, dor abdominal e perda de peso devem ser sujeitos a exames complementares no sentido de excluir o diagnóstico de CC (14).

No que diz respeito ao diagnóstico, baseado em estudos de imagem e/ou avaliação de enzimas hepáticas, é geralmente acidental não existindo testes sanguíneos que permitam o diagnóstico inequívoco do CC (21,22). Contudo, testes de função hepática e marcadores tumorais como o antígeno tumoral 19,9 (CA 19,9, do inglês *carbohydrate antigen 19-9*), o antígeno carcinoembrionário (CEA, do inglês *carcinoembryonic antigen*) e a α -fetoproteína são tipicamente usados como indicadores deste (18,19,21–23). Relativamente aos exames imagiológicos disponíveis, o que apresenta maior utilidade para avaliar o CC é a colangiopancreatografia por ressonância magnética, que permite obter informação sobre a extensão do tumor, a anatomia biliar e a presença ou não de metástases intrahepáticas. Nos casos hipoteticamente operáveis e para uma melhor escolha do tratamento adequado, a tomografia por emissão de positrões com fluordesoxiglicose-flúor 18 co-registada com a tomografia computadorizada (^{18}F -FDG-PET/CT) deverá também ser utilizada, para ajudar no estadiamento, uma vez que apresenta maior sensibilidade e precisão para a pesquisa de metástases ganglionares e à distância. A fim de realizar um diagnóstico histológico, são geralmente recolhidas biopsias ou amostras citológicas do ducto biliar através de colangiografia transhepática percutânea ou por colangiopancreatografia endoscópica, consoante a localização do tumor (intrahepática ou extrahepática, respetivamente) (19,23,24).

Quanto às opções de tratamento para o CC, estas são limitadas e devem ser adaptadas a cada caso de acordo com a sua extensão, com a presença ou não de outras doenças hepáticas conhecidas, com o nível de envolvimento vascular e com a presença ou não de metástases (3). A remoção cirúrgica e a transplantação hepática são as únicas terapias que oferecem hipótese de cura mas, no entanto, apenas cerca de 30% dos CCs

são elegíveis para ressecção cirúrgica aquando do diagnóstico (3,8,10,12,20,23). Não obstante, o prognóstico do CC permanece reservado mesmo após remoção cirúrgica agressiva, devido à elevada taxa de recorrência loco regional e ao aparecimento de metástases à distância (14).

Para os casos de CC não operável, os tipos de tratamento disponíveis incluem a quimioterapia e a radioterapia (5,6). No entanto, de forma geral as células de CC não respondem ou respondem fracamente a estas abordagens, pelo que têm um papel mais paliativo (5). Para os casos de ICC inoperável, a quimioterapia paliativa ou quimioembolização/ablação paliativa são as principais opções, oferecendo uma modesta vantagem de sobrevida sobre os melhores cuidados de suporte (9). Recentemente, foi também equacionada a utilização de terapia fotodinâmica para o tratamento do CC, técnica esta que se baseia na administração intravenosa de agentes fotossensibilizadores que se acumulam preferencialmente nas células tumorais e que são posteriormente ativados com fontes de luz de comprimento de onda adequado. A sua ação como tratamento neo-adjuvante e adjuvante é atualmente alvo de investigação, encontrando-se já demonstrado o seu benefício a nível paliativo (13,20,25).

A mortalidade normalmente acontece sob condições de caquexia como consequência do desenvolvimento tumoral, falência hepática e sepsis recorrente devido a obstrução biliar (14,20).

1.1.1.1 Quimioterapia

A quimioterapia é um tratamento sistémico utilizado geralmente no cancro, em que a administração de fármacos visa a destruição de células tumorais, impedindo o crescimento e aliviando os sintomas causados pelo desenvolvimento do tumor. Relativamente à aplicação de um regime de quimioterapia no CC e de acordo com publicações científicas em que foram revistos mais de sessenta e cinco estudos sobre o seguimento de tumores não operáveis, não foram observados benefícios ao nível da

mortalidade. No entanto e mais recentemente, a ação de fármacos dirigidos a alvos moleculares, isolados ou em associação com fármacos quimioterapêuticos convencionais tem sido investigada, com resultados promissores. Por exemplo, estudos em que foi avaliada a gencitabina em monoterapia ou combinada com outros citostáticos como a cisplatina, a oxaliplatina, o docetaxel, a mitomicina C e o 5-fluorouracilo/leucovorina têm mostrado taxas de resposta superiores a 60% (13).

1.1.1.2 Radioterapia

A radioterapia consiste na utilização de radiação ionizante para fins terapêuticos, principalmente para o tratamento do cancro. Geralmente, tem como objetivo a destruição de células cancerígenas limitando o dano causado ao tecido normal vizinho, permitindo também reduzir o risco de recorrência, controlar o crescimento tumoral e aumentar a sobrevivência dos doentes (26). Na prática, a radiação ionizante possui energia suficiente para interagir com a matéria, ceder-lhe energia e, conseqüentemente, retirar electrões das suas orbitais, originando iões. São estes iões que, por sua vez, dada a sua grande reatividade química, têm a capacidade de produzir alterações biológicas no tecido irradiado. Este tipo de radiação pode ter diferentes formas, tais como ondas electromagnéticas, em que se incluem os raios X e raios gama, ou corpusculares, que incluem as partículas alfa, partículas beta, neutrões e protões (27).

No CC, a radioterapia pode ser utilizada após remoção cirúrgica (terapia adjuvante), como tratamento antes da cirurgia para redução do tamanho do tumor, tornando-o possivelmente removível (terapia neo-adjuvante) ou como abordagem principal, paliativa, no caso de tumores em que a remoção cirúrgica não é uma opção. A radiação pode também ser aplicada em regime de quimioradioterapia (geralmente com 5-fluorouracilo ou capecitabina), mas este geralmente apresenta mais efeitos secundários do que a radioterapia (13,14,20).

Existem três principais formas de proporcionar irradiação celular, com a radioterapia externa, a braquiterapia e a radioterapia metabólica. A radioterapia externa ou telerradioterapia consiste no direcionamento de raios de alta energia (geralmente raios X ou gama) a partir de uma fonte externa (acelerador linear ou fonte de radionuclídeos, como o cobalto-60) para o local do tumor. A braquiterapia consiste na colocação de uma fonte radioativa próxima ou em contacto com o tecido alvo (selada em cateteres ou sementes) (27,28). A radioterapia metabólica tem a ver com a administração de um radionuclídeo ou de uma molécula marcada com um radionuclídeo que vai entrar numa particular via metabólica onde irá atuar de forma terapêutica. A radioterapia externa é a forma mais utilizada no CC, num regime de cinco dias por semana, durante várias semanas, podendo ser aplicada após radioterapia intra-operatória. Contudo, em certos casos é mais indicada a braquiterapia intraluminal (com *stents* de irídio-192 ou de cobalto-60), mas de forma geral, ambas as abordagens têm um papel paliativo (5).

Assim, dado o aumento geral da taxa de incidência e a elevada taxa de mortalidade nestes tumores, torna-se urgente e crucial desenvolver estratégias e técnicas de tratamento mais eficazes para o CC (3,8,20).

1.2 BOMBA DE SÓDIO E IODO

De acordo com artigos publicados recentemente, uma significativa proporção de CCs expressa um transportador de sódio e de iodo (NIS, do inglês *sodium iodide symporter*) ao nível da membrana plasmática, o que poderá representar um alvo fundamental para uma nova abordagem terapêutica para o seu tratamento, através de radioterapia metabólica com iodo-131 (29,30).

O NIS (ou SLC5A5, membro 5 da família de transportadores de solutos 5) é uma proteína plasmática integral membrana glicosilada que medeia o transporte ativo de iodo

para o interior da célula. O NIS (que pertence à família de *symporters* sódio/solutos) possui 13 domínios transmembranares, com um terminal extracelular amina e um terminal intracelular carboxilo (31–35). Como se pode verificar na Figura 3, este transportador é responsável pelo co-transporte de dois íões de sódio juntamente com um íão de iodo, sendo que o gradiente transmembranar de sódio serve de força motriz para a captação de iodo e que o processo é mantido pela ATPase Na^+/K^+ (31–35). Para que o NIS esteja completamente funcional permitindo assim a captação de iodo, a localização desta proteína na membrana plasmática parece ser essencial (31,32,34,36).

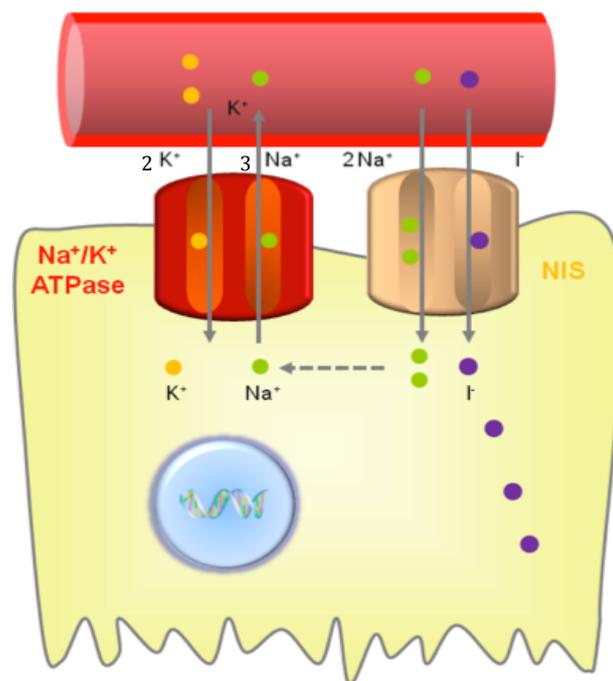


Figura 3 Modelo esquemático da bomba de sódio e de iodo (NIS). Adaptado de Ahn e colaboradores (37).

Sabe-se que as células foliculares da tiróide apresentam expressão constitutiva de NIS (32,35,38,39). A sua capacidade para acumular iodo através do NIS, há muito forneceu a base não apenas para o diagnóstico, através da imagem cintigráfica da tiróide utilizando iodo radioativo, como também passou a ser um meio eficaz de aplicação de doses terapêuticas de iodo-131 para atingir e destruir o tecido tiroideu hiperfuncional,

como são os tumores tiroideus e suas metástases (34). É sabido que o NIS também transporta efetivamente tiocianato e perclorato para o espaço intracelular, sendo estes inibidores competitivos da acumulação de iodo (32).

Anteriormente pensava-se que o NIS era apenas expresso pelas células da tiróide. No entanto, foi já publicada literatura acerca da expressão de NIS em tecidos não-tiroideus, tendo sido reportada imunomarcção para NIS em mais de quinze tipos de tecidos humanos normais, incluindo bexiga, pâncreas e próstata (29,38,40–50). Também já existe informação disponível relativamente à expressão deste transportador em diferentes tipos de tumor, como é possível verificar na Tabela I (29,30,38,40,41,45,47–49,51–53).

Tabela I Expressão de NIS em amostras histológicas de cancro. Adaptado de Wapnir e colaboradores, Liu e colaboradores e Kim e colaboradores (29,30,48)

Órgão	Número de Amostras	NIS positivo (%)
Tiróide*	72	80,5
Bexiga	24	42
Colo uterino	11	100
Cólon	75	63
Esófago	15	47
Rim	41	29
Fígado	20	20
Ductos Biliares	80	98
Ovário	37	73
Pâncreas	11	64
Próstata	34	74
Mama**	17	88
Mama***	91	76
Estômago	27	59
Endométrio	25	56

* Carcinoma Papilar, ** Carcinoma ductal *in situ*, *** Carcinoma ductal invasivo

De acordo com Wapnir e colaboradores, bem como outros estudos mais recentes, o carcinoma papilar da tiróide, o carcinoma ductal *in situ* e invasivo da mama, o adenocarcinoma pulmonar, o carcinoma do colo do útero e o colangiocarcinoma intrahepático são os tumores que apresentam maior expressão de NIS, nos quais este

transportador se encontra presente em mais de 75% dos casos analisados (29,30,41,48).

De acordo com Liu e colaboradores, alguns investigadores verificaram que a expressão endógena de NIS em tecidos epiteliais não-tiroideus é geralmente superior em células proliferativas face a células não proliferativas (29). Assim, uma vez que o NIS permite a captação celular de iodo, a sua expressão funcional em células tumorais de órgãos não-tiroideus, mas não em células normais adjacentes, poderá possibilitar o seu diagnóstico e aplicação terapêutica de substratos radioativos de NIS, como o iodo (iodo-123, iodo-124 e iodo-131) e o tecnécio-99m (31).

1.3 NIS EM COLANGIOCARCINOMA

Até à data, existem poucas publicações referentes à expressão de NIS pelo CC, tendo sido reportado pela primeira vez, em 2007, que os colangiócitos malignos expressam este transportador de iodo. De facto, Liu e colaboradores, que estudaram 20 casos de ICC, verificaram que o NIS se pode localizar no citoplasma (55% dos casos analisados), membrana plasmática (10%) ou em ambos os compartimentos celulares (35%), tendo também verificado que a proteína é expressa pelos colangiócitos normais do epitélio dos ductos biliares (canais biliares e ductulos). No entanto, a expressão de NIS encontrada em canais biliares de fígado normal é muito baixa, contrastando com a elevada expressão exibida por colangiócitos em proliferação, tanto nos tumores como nas áreas não tumorais adjacentes aos CCs (29). Mais recentemente, em 2012, Kim e colaboradores mostraram que mais de 98% dos 60 casos de ICCs por eles estudados expressam NIS, dos quais 33,3% apresentam padrão citoplasmático e membranar e 65% apenas padrão citoplasmático. Os autores sugerem que dada a significativa proporção de CCs humanos que expressa NIS a nível celular e especialmente no caso em que o padrão de expressão é membranar, esta proteína poderá ter alguma função no

desenvolvimento do tumor. Visto que de acordo com os seus resultados não existe associação entre o padrão de expressão de NIS e alguns parâmetros clinicopatológicos analisados, como a idade, o sexo, o grau de diferenciação e o estadiamento do tumor, o NIS deverá ter também uma função importante no desenvolvimento do tumor e não só na progressão e diferenciação (30).

Uma vez que de acordo com os resultados destes dois estudos o NIS é sobreexpresso em ICC, esta molécula poderá ser um alvo para novos métodos de diagnóstico ou modalidades terapêuticas dirigidas a este tumor, baseados na captação e retenção de iodo, como a radioterapia metabólica com iodo-131 (30). No entanto não existem estudos, até à data, sobre a expressão desta molécula em CCs extrahepáticos.

A radioterapia metabólica consiste na administração de radiofármacos que emitem radiação ionizante de elevada energia e se concentram seletivamente nos órgãos-alvo, pelos quais são captados como metabolitos (27,54,55). É, assim, uma terapia especificamente dirigida, de baixo custo, ampla e facilmente disponível, apresentando apenas alguns efeitos colaterais leves e pouco frequentes (34). O iodo-131 é um dos isótopos que pode ser utilizado nesta modalidade terapêutica. Em termos moleculares, ao decair, o núcleo dos seus átomos radioativos emite partículas β^- , verificando-se que posteriormente, o radionuclídeo-filho apresenta mais um próton e menos um neutrão (56,57). Estas partículas β^- (radiação ionizante) interagem com o tecido humano durante a sua trajetória, graças à sua energia cinética. Por um lado, a sua interação com núcleos da matéria levam à emissão de radiação de travagem (fenómeno denominado desaceleração dos eletrões – *bremstrahlung*); por outro e mais importante, é a sua interação com eletrões atômicos da matéria. Se a partícula β^- colide com um eletrão da matéria, estes repelem-se, por terem ambos a mesma carga, sendo que em muitos casos, esta força de repulsão é importante para conduzir o eletrão para fora da sua órbita atômica, ionizando o átomo (58). A penetração de partículas β^- do iodo-131 num tecido depende não só da energia dos seus eletrões mas também da densidade eletrónica do tecido, variando o seu maior alcance entre 0,5 e 1 mm em tecidos moles

(54,58,59). Tal significa que a energia do eletrão é absorvida muito perto do local de penetração da radiação, garantindo uma elevada dose de radiação intracelular após internalização do iodo-131 (58–60). Assim, uma vez que virtualmente todas as partículas β^- ficam retidas nas células tumorais onde o iodo-131 se concentra, elevadas atividades podem ser administradas sem danificar o tecido envolvente (61). Em materiais de baixo número atómico (como é o caso do tecido humano), os eletrões das partículas β^- perdem cerca de 33 keV da sua energia para causar uma única ionização, pelo que eletrões que possuem uma energia de várias centenas de keV, são capazes de causar múltiplas ionizações antes de perderem toda a sua energia (58). Em suma, o facto de o iodo-131 ser um emissor de partículas β^- , que possuem elevada energia, e de ter um tempo de semi-desintegração relativamente longo (8,04 dias) que permite causar danos celulares extremos que levam à morte, aliado ao seu reduzido alcance nos tecidos, que permite a sua acumulação ao nível das células tumorais sem afetar as normais envolventes, fazem deste um bom radioisótopo para utilização em radioterapia metabólica (58).

A radioterapia metabólica com recurso a iodo-131 é já utilizada há mais de cinquenta anos para ablação de tecido tiroideu remanescente ou para tratamento de doença residual, recorrente ou metastática, sendo provavelmente o tipo de tratamento anti-cancerígeno com maior sucesso (54,55,59). De facto, esta forma de terapia é especificamente eficaz na tiróide uma vez que este é, já em condições fisiológicas, o órgão com maior capacidade de retenção de iodo (contendo normalmente 70 a 90% do iodo presente no corpo humano, 9 a 10 mg), sabendo-se que as células foliculares captam aproximadamente 60 μg de iodo por dia da corrente sanguínea, com o objetivo de sintetizar corretamente hormonas tiroideias (31,58). Tendo em conta que para este mecanismo fisiológico é fundamental a expressão de NIS e que a maioria dos tumores tiroideus retém expressão funcional da proteína, substratos radioativos para este transportador, como o iodo-131, podem ser utilizados para o seu tratamento (31,55,60). No entanto, uma vez que o processo de organificação, importante para a retenção de iodo, se encontra reduzido nos tumores, o tempo de semi-vida efetivo do iodo-131 nestes

(0,5 a 3 dias) é significativamente inferior face ao observado na tiróide normal (3 a 7 dias) (31,59). Deste modo, para aplicar uma dose de iodo-131 com potencial de tratamento (superior a 80 Gy), uma elevada atividade (superior a 95 mCi) é frequentemente ingerida, resultando na captação pelo tumor de 0,1 a 27% do iodo-131 administrado (31). Adicionalmente e ainda que em doses de radiação significativamente inferiores, durante a aplicação desta terapia também outros órgãos como o estômago e as glândulas salivares poderão captar iodo-131, devido principalmente à sua rápida excreção pelo trato gastrointestinal (31).

Apesar da especificidade de captação pela tiróide, foi já demonstrado que o iodo-131 se pode concentrar não só noutros tecidos normais não-tiroideus, como também noutros tipos de tumores que apresentem expressão de NIS, incluindo o carcinoma da mama, o do estômago e o do pulmão, nos quais poderá também vir a ser uma opção terapêutica (32,48). Outra área também atualmente alvo de investigação, é a indução da expressão de NIS em tumores que não expressam esta proteína endogenamente, como é o caso dos cancros do cólon, do fígado e da próstata (62–64). De facto, de acordo com Spitzweg e colaboradores, que induziram a expressão de NIS numa linha celular de adenocarcinoma prostático, o tratamento com iodo-131 permite diminuir a sobrevivência celular em 75%, sendo que nas células controlo o iodo-131 reduziu a sobrevivência em apenas 20%. Através de um modelo *in vivo*, estes autores verificaram acumulação de 25 a 30% do iodo-123 administrado, apenas nos tumores NIS positivos, e após aplicação de uma atividade terapêutica de iodo-131 (3 mCi), observaram uma significativa e promissora diminuição no seu tamanho (64). Mais recentemente, em 2011, Barton e colaboradores reportaram pioneiramente a indução de expressão de NIS na próstata de seis doentes com cancro, aos quais aplicaram, posteriormente, radioterapia metabólica com iodo-131. No entanto, em dois dos doentes, apenas foi conseguido induzir a expressão de NIS num dos lados da próstata, pelo que o tratamento apenas com iodo-131 não seria, à partida, totalmente eficaz. Embora não tenham dados inequívocos sobre a sua ação terapêutica, uma vez que apenas em dois dos doentes já tinha sido feito

follow-up a 2 anos, verificaram através de biopsia, que num dos quatro doentes em que a expressão de NIS foi conseguida em todo o órgão, o tumor desapareceu completamente. No doente em que a expressão não foi conseguida em todo o órgão detetaram a presença de doença residual, localizada na zona onde a indução de expressão de NIS não foi bem sucedida (65).

Pelo exposto, o tratamento com recurso a iodo-131, anteriormente benéfico apenas para doenças da tiróide, poderá vir a ser alargado a uma vasta gama de tumores não-tiroideus, mediante expressão de NIS (32). No entanto, é de notar que o iodo-131 não será organificado, resultando em tempos de retenção mais curtos do que os verificados na tiróide. Nestes casos deve simultaneamente prevenir-se a acumulação deste radioisótopo na tiróide, não só para precaver o seu dano, como também para maximizar a quantidade de iodo-131 disponível para atuar especificamente junto do tumor (31).

1.4 EFEITOS DA RADIAÇÃO

Como forma de radiação ionizante que são, as partículas β^- emitidas pelo iodo-131 interagem com o tecido humano, resultando em alterações biológicas, sendo que a eficácia do dano causado se correlaciona positivamente com o valor da transferência linear de energia (LET, do inglês *linear energy transfer*). O LET é uma medida da energia transferida para a matéria quando uma partícula ionizante viaja através dela, tendo o valor aproximado de 0,25 keV/ μm para os eletrões emitidos pelo iodo-131 (58). O dano biológico depende ainda da dose total, rácio de fracionamento e radiosensibilidade das células-alvo ou tecidos-alvo (66).

De facto, a absorção de energia da radiação ionizante pelas células pode induzir danos devastadores a nível celular e, em particular, a nível do DNA, o que em último

caso pode levar à morte celular (56,57,61,66,67). Com efeito, uma dose de 1 Gy causará em cada célula aproximadamente cento e cinco ionizações, mais de mil danos em bases de DNA, cerca de mil quebras em cadeia simples e de vinte a quarenta quebras em duplas cadeias de DNA (68). No entanto, é ainda assim necessária uma elevada dose de radiação para que uma elevada quantidade de células morra levando, eventualmente, à falência funcional do tecido e/ou órgão (56,57).

A radiação ionizante pode atingir diretamente várias moléculas cruciais para a célula, podendo também ter um efeito indireto, através da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), derivadas da radiólise da água (Figura 4).

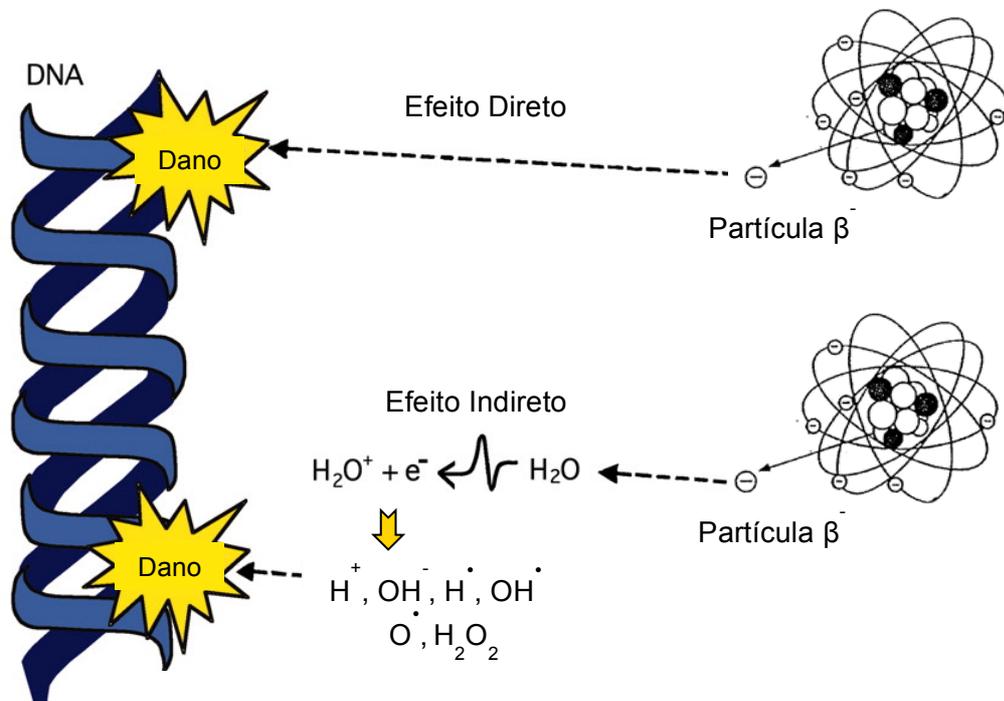


Figura 4 Efeitos diretos e indiretos da radiação sobre a molécula de DNA. Adaptado de Morgan e colaboradores (69).

A interação da radiação ionizante com a matéria viva ocorre em três fases sucessivas: física, química e biológica (58). Durante a fase física, a radiação ao interagir provoca ionização ou excitação de átomos ou moléculas celulares, do que resulta a formação de iões. Estes iões vão iniciar processos físico-químicos que terminam com a

formação de espécies radicalares que vão, por sua vez, iniciar sequências de reações químicas que danificam membranas, lípidos, proteínas e o DNA (58,66). De facto, na fase química, estas espécies interagem com outros componentes da célula, resultando na formação de radicais livres e agentes oxidantes (58). O principal alvo dos efeitos induzidos pela radiação é o DNA, podendo ocorrer diferentes tipos de danos nesta molécula, como quebras em cadeia simples, quebras em cadeia dupla, danos numa única base, ligações cruzadas DNA–proteína e danos múltiplos (56,57,66,67,70). Por último, a fase biológica inclui todos os mecanismos subsequentes, ocorrendo alterações das vias metabólicas da célula (58).

Quando ocorre dano, as células podem ativar os seus próprios mecanismos de controlo e de reparação, que começam por reações enzimáticas, cujo objetivo é reparar o dano químico da célula (58,70). Estas reações podem durar segundos, dias ou semanas, sendo que grande parte das lesões são reparadas com elevada exatidão (56–58). Deste modo, a resposta celular à radioterapia depende não só do tipo e/ou dose de radiação e do estado de proliferação celular mas também da eficácia dos mecanismos de reparação e das defesas antioxidantes (71). No caso concreto do dano no DNA, é desencadeada uma cascata de sinalização denominada resposta ao dano do DNA (DDR, do inglês *DNA damage response*) que, dependendo da extensão do dano, resulta na ativação de vias de reparação, paragem transiente (ou permanente) do ciclo celular e/ou indução de morte celular programada (72–74). A DDR é orquestrada por duas proteínas cinase conservadas, a ataxia telangiectasia mutada (ATM) e a ATM e Rad3 relacionada (ATR) (72,73). Perante uma quebra na cadeia dupla do DNA, a progressão do ciclo celular é interrompida promovendo tempo para que o dano seja reparado, através da ativação dos *checkpoints* do ciclo celular, que atingem complexos promotores da sua progressão. Estes *checkpoints* existem entre as fronteiras G1/S e G2/M, de forma a prevenir a replicação ou a mitose, respetivamente (75). A ATM é responsável pela ativação dos *checkpoints*, iniciando a eliminação da(s) cadeia(s) quebrada(s) e levando assim à obtenção de DNA em cadeia simples, uma reparação de dano de DNA intermédio que,

por sua vez, ativa a ATR (72–74,76). A ATR e a ATM são responsáveis pela fosforilação e ativação de duas cinases de *checkpoint*, denominadas CHK1 e CHK2, respetivamente e, em conjunto, estas quatro proteínas ativam múltiplas vias celulares que culminam na paragem do ciclo celular, reparação do dano no DNA e/ou morte celular (72,76,77). Um alvo crucial da cascata ATM/ATR é a proteína 53 (P53), que pela sua fosforilação é estabilizada e ativada, passando assim a regular positivamente a expressão de P21, uma proteína crucial para a inibição da entrada na fase S do ciclo celular (72,76,77).

Pelo exposto, a ionização e a excitação de moléculas sob a influência da radiação pode resultar em efeitos não-letais ou letais (58). Os efeitos não-letais incluem os danos genéticos (mutações) e a disfunção enzimática, que habitualmente não conduzem à morte celular (58,66,70). Já os efeitos letais são normalmente causados pelo facto de um dano na cadeia dupla de DNA ser incorretamente reparado ou, de todo, não ser reparado (58).

1.4.1 Espécies Reativas de Oxigénio

A radioterapia pode danificar as células através de ionização direta do DNA e outros alvos celulares ou pelos efeitos indiretos mediados por ROS, geradas através da radiólise da água, ou espécies reativas de nitrogénio. Para além do dano provocado no DNA nuclear, por exemplo, através de quebras em cadeia simples ou dupla, a exposição à radiação ionizante também pode danificar severamente o DNA mitocondrial, alterando a expressão de vários genes que codificam proteínas críticas envolvidas no sistema de fosforilação oxidativa, levando à produção de mais ROS e à diminuição de síntese de ATP (71).

As ROS são moléculas derivadas da radiólise da água, da recombinação dos produtos desta reação e do efeito do oxigénio que facilmente podem oxidar outras moléculas. Sabe-se que baixas a moderadas concentrações se encontram envolvidas em

processos celulares fisiológicos, pelo que a célula tem processos que lhe permitem a sua redução. Em elevadas concentrações, as espécies radicalares formadas podem produzir modificações químicas adversas aos componentes celulares (71,78,79). As três ROS mais importantes a nível fisiológico são o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), precursor da maioria das outras ROS, o radical hidroxilo (OH^{\cdot}), a ROS mais reativa, e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (78–81). De acordo com a Figura 5, na presença de oxigénio, a radiação ionizante converte o radical superóxido por dismutação espontânea ou atividade catalítica da superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogénio, que por sua vez origina o radical hidroxilo, na presença de ferro reduzido (Fe^{2+}) ou de cobre reduzido (Cu^+), através da reação de Fenton (78,79).

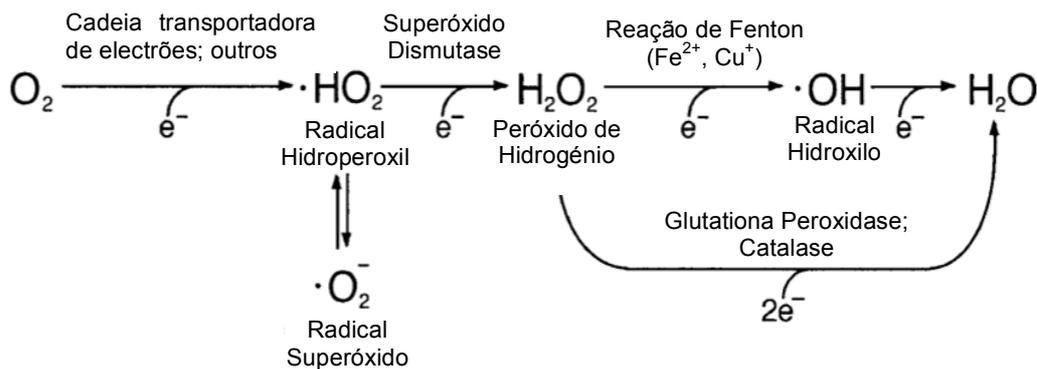


Figura 5 Vias metabólicas das espécies reativas de oxigénio. Adaptado de Mori e colaboradores (82).

No entanto, o dano que as ROS podem causar a uma célula não depende apenas da sua concentração intracelular mas também do equilíbrio entre ROS e defesas antioxidantes endógenas (80). As defesas antioxidantes constituem assim o mecanismo molecular de defesa contra as consequências que advêm das elevadas concentrações de espécies reativas (predominantemente de oxigénio), incluindo moléculas enzimáticas e não enzimáticas (79–81). São exemplos de antioxidantes enzimáticos a SOD, a catalase, a glutaciona peroxidase, as tioredoxinas e as peroxirredoxinas. Já os não enzimáticos incluem algumas vitaminas (A, C, E) e a glutaciona (80). É geralmente aceite

que a glutathiona reduzida (GSH) desempenha um papel central na manutenção da homeostase redox (71).

Quando o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante é perdido (a favor da fracção pró-oxidante), ocorre um processo conhecido como stresse oxidativo, que resulta na alteração e no dano de muitas moléculas intracelulares, incluindo o DNA, o RNA (do inglês *ribonucleic acid*), os lípidos e as proteínas (79,80). As modificações que as ROS induzem no DNA incluem a degradação de bases, as quebras do DNA em cadeia simples ou duplas, as modificações nas bases púricas e pirimidínicas ou nas ligações com as moléculas de açúcar, mutações, deleções ou translocações e ligações cruzadas com proteínas, podendo estas comprometer a viabilidade e as funções celulares, bem como, resultar na iniciação de vias de sinalização de morte celular (71,79–81).

No entanto, se do ponto de vista da terapêutica a indução de stresse oxidativo é desejada, de forma a conseguir induzir morte celular e, assim, regressão da massa tumoral, deve ter-se em conta que o próprio tecido tumoral pode apresentar stresse oxidativo constitutivo. Neste caso, as ROS podem ter um efeito contrário, ao impedir a ativação de sinais pró-apoptóticos e/ou ao atuar como moduladores de sinais de crescimento que, ao ativarem genes específicos, permitem a sua progressão (71).

1.4.2 Proteína P53

A proteína supressora tumoral P53, também denominada como “guardião do genoma”, é uma proteína-chave para a regulação do ciclo celular, o desenvolvimento e a diferenciação, a amplificação de genes, a recombinação de DNA, a segregação cromossomal, a indução da apoptose e a senescência celular (83). Em condições fisiológicas, a P53 é continuamente produzida e na ausência de estímulos de ativação, é degradada de forma a manter níveis basais constantes (84).

Como reguladora da transcrição, a P53 pode ser ativada por uma grande

variedade de sinais de stresse citotóxico, incluindo o dano do DNA, a hipóxia e a ativação de certos oncogenes. Uma vez ativada, liga-se como homotetrâmero a sequências específicas nas regiões reguladoras de vários genes alvo, desencadeando diversas vias efetoras como se pode verificar na Figura 6, podendo ainda estimular a expressão de genes de redução do stresse oxidativo (77,84). Dependendo da fase do ciclo celular e do tipo e extensão do dano no DNA, a P53 poderá modular processos de reparação de danos ou ativar a transcrição de genes envolvidos na paragem do ciclo celular e/ou morte celular (72). Consequentemente, a sua ativação após a irradiação pode levar tanto a um bloqueio na proliferação como à morte celular (68).

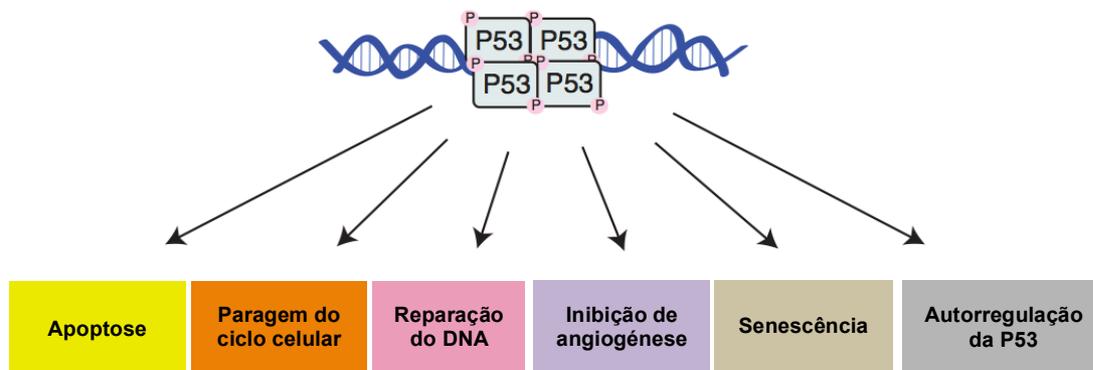


Figura 6 Ativação de diversos processos celulares pela proteína P53. Adaptado de Delbridge e colaboradores (84).

No que diz respeito ao cancro, mais de 50% dos tumores humanos apresentam o gene *TP53* mutado e consequente acumulação de uma P53 mutada a nível nuclear, que não é reconhecida para degradação. Por outro lado, uma vez que a proteína mutada permanece inativa por não ser funcional, deixa de responder a estímulos de regulação, resultando em proliferação descontrolada (83,84). Especificamente em relação ao CC, a expressão de P53 varia de acordo com a localização do tumor, o que poderá dever-se a diferenças nas suas etiologias, e onde o gene se encontra mutado entre 20 a 80% dos casos (6).

1.4.3 Morte Celular

Dependendo da agressividade do tratamento e em resposta ao dano causado no DNA, as células poderão reparar o dano e sobreviver normalmente ou, no caso da reparação ser insuficiente, poderão ainda assim sobreviver (apresentando mutações) ou morrer (85). De facto, o principal objetivo da radioterapia consiste em privar as células tumorais do seu potencial replicativo e, eventualmente, conduzir à sua morte (86). Contudo, a radiação poderá não induzir a morte celular de uma forma rápida (em fase pré-mitótica) mas sim num tempo relativamente longo após a irradiação (fase pós-mitótica), podendo ser necessárias horas, dias ou mesmo semanas de tratamento para que ocorra morte celular o que, por sua vez, poderá acontecer durante semanas a meses depois de o tratamento ter terminado (68,86).

Como se vê na Figura 7, ao induzir danos severos e irreparáveis, a radioterapia pode resultar na indução de senescência, mitose catastrófica e/ou programas de morte celular, como a apoptose e a necrose (72,85,87–89). Também a autofagia poderá estar envolvida na morte celular induzida por radiação (90).

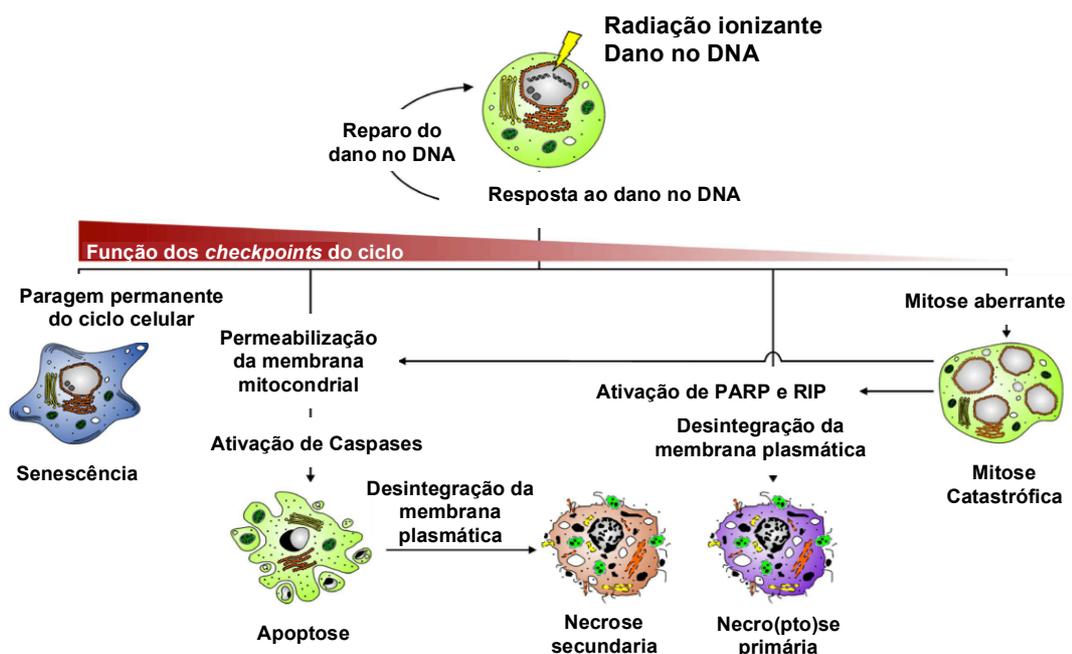


Figura 7 Mecanismos de morte celular induzidos por radiação ionizante. PARP: poli adenosina

difosfato-ribose polimerase; RIP: proteína de interação com receptor. Adaptado de Lauber e colaboradores (72).

A senescência consiste num estado de perda irreversível da capacidade proliferativa. As células senescentes são células viáveis e metabolicamente ativas mas que perderam a sua capacidade de divisão. Podem ou não apresentar alterações funcionais (como deixar de sintetizar DNA), tornam-se maiores e achatadas e apresentam um aumento de granularidade (91,92). A senescência, induzida em resposta à radioterapia, ocorre em células tumorais que morrem *a posteriori* e maioritariamente por apoptose (86).

A mitose catastrófica é uma forma de stresse celular, consequência de uma mitose desregulada/falhada na qual as células com cromossomas mitoticamente condensados são submetidas a apoptose diretamente durante a fase M do ciclo celular ou durante uma divisão aberrante, que resulta em células multinucleadas com micronúcleos, acabando por morrer num ciclo celular subsequente (89,90). Estas células, que apresentam defeitos nos *checkpoints* do ciclo celular e mecanismos de reparação, podem sobreviver durante dias, transitar para um estado senescente ou morrer por apoptose, autofagia ou necrose/necroptose (72,89).

A apoptose é um dos principais mecanismos de morte celular em resposta a radioterapia (86). Durante este processo de morte celular programada e de acordo com a Figura 8, as células sofrem variadas alterações, incluindo retração global e nuclear, agregação e condensação da cromatina, perda de adesão e formação de vesículas (*blebs*). Posteriormente, as *blebs* dão origem aos corpos apoptóticos, englobando pequenos fragmentos citoplasmáticos esféricos (como organelos funcionais e fragmentos de núcleo), envolvidos por membrana celular que se destaca da célula (93,94) (Figura 8). A fosfatidilserina, um fosfolípido presente no folheto interno da membrana plasmática, é exposta no lado exterior dos corpos apoptóticos, sendo que esta localização atua como sinal que atrai macrófagos que, por sua vez, eficientemente fagocitam os fragmentos encontrados (93–95).

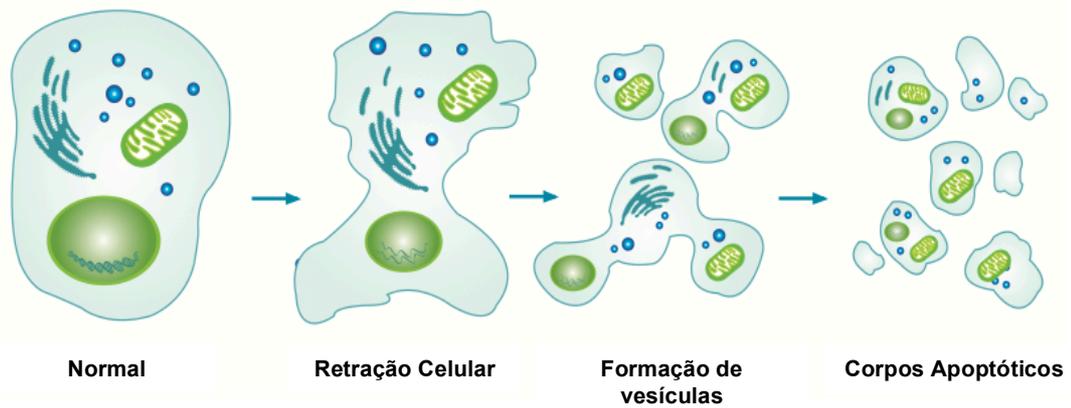


Figura 8 Alterações celulares decorrentes de Apoptose. Adaptado de *Apoptosis, Necrosis & Autophagy* (96).

Os mecanismos de apoptose envolvem uma cascata de eventos moleculares dependentes de energia, existindo duas principais vias para a sua ativação, a via extrínseca na qual fatores extracelulares atuam através de recetores de morte presentes na superfície da célula ou através do sistema granzima/perforina e a via intrínseca, em que determinadas moléculas intracelulares promovem a ativação mitocondrial (93,95).

As principais moléculas envolvidas na ativação da via mitocondrial pertencem à família de proteínas BCL-2. Membros anti-apoptóticos desta família incluem a BCL-2, a BCL-XL, a BCL-W, a BFL-1 e a MCL-1, sendo pró-apoptóticas a BAX, a BAD, a BIM, a BAK, a BMF, a BOK, a PUMA, a NOXA e a BID. Todas estas proteínas exercem os seus efeitos na mitocôndria, induzindo ou inibindo a libertação de citocromo c para o citosol (95,97). De facto e de acordo com a Figura 9, quando estimulada, a proteína pró-apoptótica liga-se à membrana mitocondrial e induz a formação de poros, resultando na perda de permeabilidade seletiva e consequente translocação de citocromo c e de fatores de indução de apoptose (AIFs, do inglês *apoptosis inducing factors*) para o citosol (95). Seguidamente, o citocromo c liga-se e ativa o fator ativador de protease apoptótica 1 (APAF-1, do inglês *apoptotic protease activating factor 1*), formando um complexo denominado apoptossoma. Este complexo leva à ativação da caspase 9 que, por sua

vez, ativa a caspase 3, uma caspase efetora, culminando na execução do processo apoptótico (95,97) (Figura 9). Embora a via intrínseca seja incluída nos mecanismos de apoptose dependentes de caspase, quando o citocromo c é libertado, pode a apoptose também ser iniciada independente de caspases, processo este que envolve AIFs que após saída da mitocôndria, são translocados para o núcleo. Consequentemente, ocorre condensação da cromatina e fragmentação do DNA (95).

Quanto a fatores extracelulares, como se pode verificar na Figura 9, a via extrínseca da apoptose é induzida pela oligomerização e ativação de recetores de morte pelos seus ligandos. Seguidamente, ligam-se proteínas adaptadoras específicas ao recetor, resultando na ativação do sistema de caspases. Com efeito, a ativação da caspase 8 leva à execução do processo apoptótico pela clivagem direta e ativação da caspase 3 ou à clivagem da BID que, ao ser ativada, é translocada do citosol para a mitocôndria, onde induz a libertação de citocromo c (95,97) (Figura 9).

A apoptose, tanto pela via intrínseca como pela extrínseca, pode ser iniciada pela ação de P53 (73,93,95). Deste modo, quando um dano é encontrado no DNA, a P53 (na forma de monómero) impede a progressão do ciclo celular na fase G1, dando tempo à célula para reparar o dano (95). Se a lesão for irreparável, a P53 forma então um pentâmero e induz a apoptose através do aumento da expressão de PUMA, de NOXA, de BID e de BAX, alterando assim o rácio BAX/BCL-2 (73,84,95) (Figura 9).

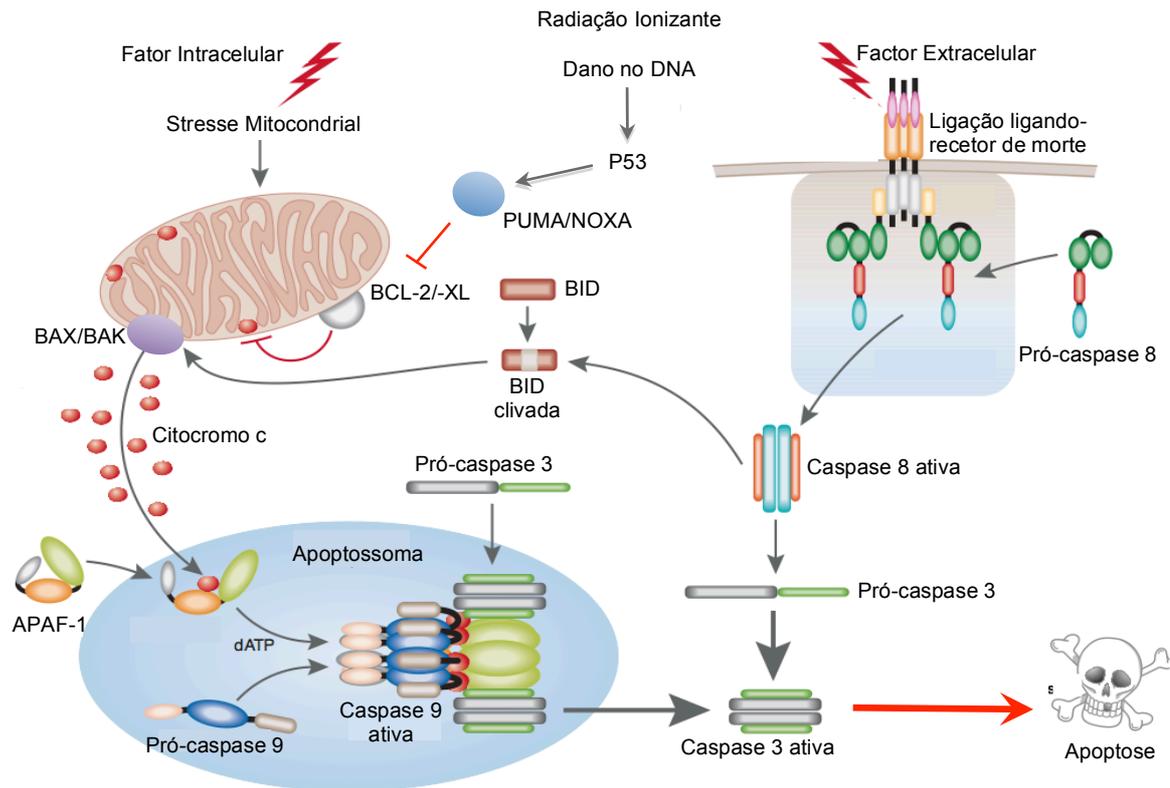


Figura 9 Vias de ativação da Apoptose. Adaptado de MacFarlane e colaboradores (98).

A evasão à apoptose é uma das principais alterações que a célula sofre no processo de transformação maligna, resultando na perda do balanço entre a divisão celular e a morte celular. Esta desregulação do processo apoptótico deve-se principalmente a alterações do balanço entre as proteínas pró e anti-apoptóticas (a favor das anti-apoptóticas), a diminuição da ativação das caspases e a falha nas vias de sinalização através dos recetores de morte. Consequentemente, as células tumorais recebem sinais de morte aos quais não respondem, continuando a proliferar (83). Relativamente ao CC, a evasão ao processo apoptótico deve-se principalmente à sobreexpressão de proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2 (5).

Contrariamente à apoptose, a necrose é geralmente considerada uma forma de morte celular não programada, acidental, incontrolada e causada por dano químico ou físico, sendo frequentemente associada a desintegração da membrana plasmática e

colapso celular (99–101). Como mostrado na Figura 10 ocorrem, neste processo, alterações dramáticas em parâmetros cruciais para o metabolismo e para a estrutura celular, muitas vezes iniciadas após perda de energia. As alterações sofridas pelas células que entram num processo de morte por necrose incluem o aumento de volume celular e dos organelos, ruptura da membrana plasmática com consequente perda do conteúdo intracelular e, finalmente, lise celular. Adicionalmente, são iniciadas reações inflamatórias em resposta à necrose (99,100).

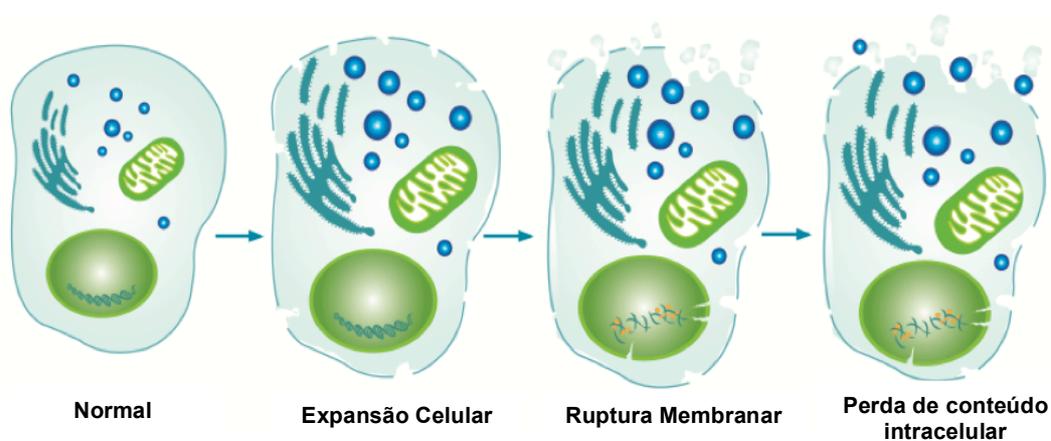


Figura 10 Alterações celulares decorrentes de Necrose. Adaptado de *Apoptosis, Necrosis & Autophagy* (96).

Contudo, a morte celular necrótica pode também ser um processo controlado e programado – a necroptose (100,101). De facto, tem sido demonstrado que a ativação da P53 influencia a permeabilidade da membrana lisossomal que, por sua vez, resulta em acidificação do meio intracelular e libertação de várias enzimas que podem promover a necrose (68). Em células epiteliais tumorais que revelam limitada indução da apoptose em resposta à radioterapia ou quando a irradiação é feita numa elevada e única dose, o dano induzido no DNA poderá estimular também este tipo de morte (100,101).

Por fim, a autofagia é um processo catabólico celular para degradação de proteínas e outros elementos subcelulares, através de proteólise lisossomal, existindo três tipos principais: a macroautofagia, microautofagia e a autofagia mediada por

chaperones (102–104). No entanto, não existe muita evidência de que os últimos dois tipos referidos apresentem uma função na biologia tumoral (104). Como se pode ver esquematizado na Figura 11, na macroautofagia (posteriormente referida como autofagia) são formados autofagossomas, estruturas rodeadas por dupla membrana que envolvem organelos e macromoléculas citoplasmáticas, posteriormente entregues e degradadas em lisossomas (102,103).

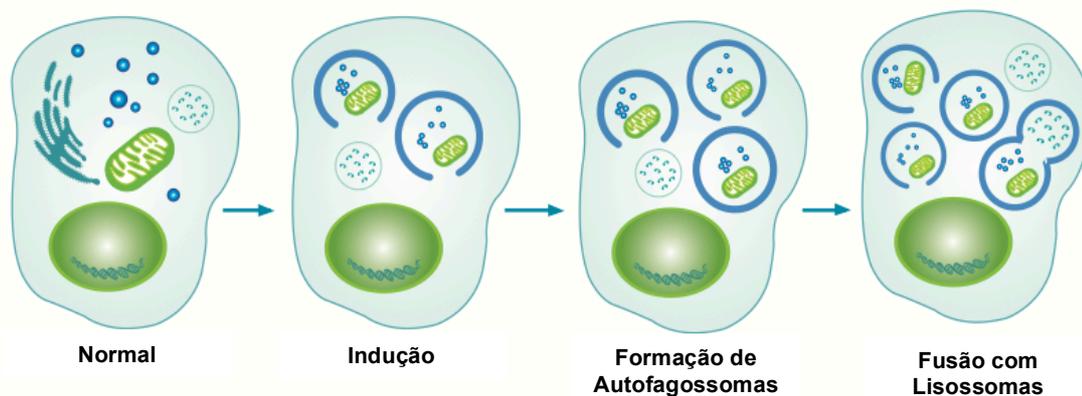


Figura 11 Processo de Autofagia. Adaptado de *Apoptosis, Necrosis & Autophagy* (96).

Para além da sua função basal, a autofagia pode ser induzida em resposta à radiação, resultando na sobrevivência ou na morte celular (103,105,106). Com efeito, a autofagia pode ser vista como um mecanismo de sobrevivência que adapta as células às condições de stresse, fornecendo precursores metabólicos para a renovação e para a manutenção celular através da reciclagem de componentes celulares (105). Por outro lado, a ativação da autofagia quando o material citoplasmático ou organelos são consumidos para além do ponto crítico para a sobrevivência celular, pode resultar em morte, acompanhada de vacuolização maciça do citoplasma (103,105). Na maioria dos casos não é bem claro se a autofagia representa um modo ativo de morte ou de tentativa desesperada de sobrevivência (103).

2. OBJETIVOS

O CC apresenta uma taxa de sobrevivência diminuta, devido à reduzida percentagem de casos em que a sua remoção cirúrgica é uma opção, bem como à baixa eficácia das principais terapias alternativas, como a quimioterapia e radioterapia convencionais. Assim, urge investigar novas opções terapêuticas para este tipo de tumor altamente agressivo. Existem evidências de que o ICC apresenta sobreexpressão de NIS que, por sua vez, medeia a captação celular de iodo. Uma vez que do ponto de vista celular os CCs são semelhantes, independentemente da sua localização, este tumor poderá ser elegível para terapêutica com substratos radioativos para o NIS, como a bem sucedida radioterapia metabólica com iodo-131, muito utilizada para tratamento de tumores da tiróide.

Deste modo, o principal objetivo deste trabalho consiste no estudo do potencial terapêutico da radioterapia metabólica com iodo-131 no colangiocarcinoma, utilizando uma linha celular humana de colangiocarcinoma extrahepático. Para tal serão usadas diferentes metodologias, representando metas para este trabalho:

- Analisar a expressão e localização de NIS na linha celular TFK-1;
- Avaliar o influxo e efluxo celular de iodo-131 na linha celular TFK-1;
- Avaliar o efeito do iodo-131 na sobrevivência celular, na linha celular TFK-1;
- Analisar o tipo de morte celular induzido pelo iodo-131 na linha celular TFK-1;
- Estudar o efeito do iodo-131 na expressão proteica de BAX, BCL-2 e citocromo c, na linha celular TFK-1;
- Analisar alterações no potencial de membrana mitocondrial induzidas pelo iodo-131 na linha celular TFK-1;
- Estudar alterações no ciclo celular induzidas pelo iodo-131 na linha celular TFK-1;

- Estudar alterações ao nível do DNA induzidas pelo iodo-131 na linha celular TFK-1;
- Determinar alterações induzidas pelo iodo-131 ao nível da produção intracelular de espécies reativas de oxigénio e defesas antioxidantes, na linha celular TFK-1.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O NIS, proteína mediadora da captação de iodo, é fundamental para o sucesso da radioterapia metabólica com recurso a iodo-131, utilizada para tratamento de doenças da tireóide. Este transportador é, atualmente, alvo de investigação ativa para o tratamento de tumores não-tiroideus, uma vez que a sua expressão se encontra aumentada em alguns tipos de cancro, tais como o CC. Esta constatação poderá abrir a possibilidade de uma nova abordagem terapêutica para este tipo de tumor altamente agressivo.

Assim, para avaliar o efeito anticancerígeno da radioterapia metabólica com iodo-131 no CC, foram realizados estudos *in vitro*, utilizando culturas celulares e todas as metodologias adequadas a esta técnica.

3.1 CULTURA CELULAR

A cultura celular refere-se ao cultivo de células dispersas, em monocamada ou em suspensão, podendo ter origem a partir de uma linha celular, cultura primária ou tecido. De modo a evitar contaminações por microrganismos, a manutenção celular deve ser feita em ambiente estéril e utilizando técnicas assépticas.

Para a realização dos estudos *in vitro*, foi utilizada uma linha celular humana de colangiocarcinoma extrahepático, designada TFK-1. Após a sua receção, a linha celular foi descongelada e propagada em cultura aderente de acordo com as indicações do fornecedor, a *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ), tendo sido mantida em incubadora Binder a 37°C, numa atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂.

Relativamente ao meio de cultura, utilizou-se o meio *Roswell Park Memorial Institute Medium*, RPMI-1640 (R4130, Sigma Aldrich®), suplementado com 5% de soro bovino fetal (FBS do inglês *Fetal Bovine Serum*; F7524, Sigma Aldrich®), 1% de

antibiótico (15240, Gibco®) e piruvato de sódio (11360, Gibco®) numa concentração de 400 mM, tendo-se acertado o pH para 7,4.

Para as experiências realizadas e tendo em conta que a linha celular referida foi mantida em cultura aderente, foi necessário preparar suspensões celulares. Assim, após remoção do meio de cultura procedeu-se à lavagem das células com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) constituída por 137 mM de cloreto de sódio (S7653, Sigma Aldrich®), 2,7 mM de cloreto de potássio (P9333, Sigma Aldrich®), 10 mM de fosfato monossódico (S5011, Sigma Aldrich®) e 1,8 mM de fosfato monopotássico (P0662, Sigma Aldrich®), com pH 7,4. Posteriormente, removeu-se o PBS e incubou-se com tripsina-EDTA a 0,25% (25200, Gibco®) durante 2 a 3 minutos a 37°C, de modo a destacar as células dos frascos. De seguida, inativou-se a tripsina com meio de cultura. Para a contagem de células em câmara de *neubauer*, diluíram-se 20 µL de suspensão celular em igual volume de azul tripano (T0776, Sigma Aldrich®) e fez-se a contagem num microscópio invertido (Nikon, Eclipse TS 100) com ampliação de 100X. Por fim, adicionou-se meio de cultura à suspensão celular, com o intuito de obter a concentração celular pretendida para cada ensaio.

3.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NIS

Para avaliar a expressão e a localização de NIS a nível celular, recorreu-se à técnica de imunofluorescência. De forma geral, através de técnicas de microscopia de fluorescência é possível visualizar moléculas específicas que se tornam fluorescentes na presença de luz excitatória, o que permite quantificar e localizar macromoléculas, pequenos metabolitos e iões. A imunofluorescência consiste na utilização de anticorpos marcados com fluorocromos, com o intuito de visualizar a distribuição de certas proteínas numa célula ou para tornar visíveis organelos específicos, filamentos ou regiões

membranares bioquimicamente distintas, em células previamente fixadas. Devido à sua grande especificidade e relativa facilidade de utilização, a microscopia de fluorescência é, atualmente, o método de microscopia de luz mais utilizado na investigação biomédica (107).

Para este ensaio foram utilizadas 1×10^5 células TFK-1 em quatro poços de uma placa de 12 poços, nos quais se colocou previamente uma lamela autoclavada. No dia seguinte, em duas das lamelas, fez-se irradiação com iodo-131 com uma dose de 20 Gy. Para tal, em 500 μ L de meio de cultura, adicionou-se a atividade correspondente ($1,036 \times 10^5$ Bq) durante 5 minutos, posteriormente decantou-se o meio, fez-se uma lavagem com PBS e por fim adicionou-se novo meio de cultura sem radiofármaco. Duas horas após a irradiação, removeu-se o meio de cultura de todas as lamelas e adicionaram-se 400 μ L de paraformaldeído (4005, Merck) a 4% em PBS durante 10 minutos. Após a remoção desta solução, fizeram-se três lavagens com 500 μ L de uma solução de PBS-BA (constituída por PBS, 0,02% de BSA (A7906, Sigma Aldrich®) e 0,02% de azida de sódio (71290, Sigma Aldrich®)), durante 5 minutos cada. De seguida e apenas numa das lamelas de cada condição (controlo e 20 Gy), permeabilizaram-se as células com 500 μ L de Triton X-100 (K34979403, Merck) a 1% em PBS-BA durante 10 minutos e fez-se uma nova lavagem com 500 μ L de PBS-BA. Posteriormente, adicionou-se o anticorpo primário anti-NIS (NIS (N-15), sc-48055, Santa Cruz Biotechnology, inc), numa diluição de 1:40 em PBS-BA, tendo incubado em câmara húmida, *overnight* a 4°C. No dia seguinte, realizaram-se três lavagens com 500 μ L de PBS-BA e adicionou-se o anticorpo secundário (Alexa Fluor® 488 *rabbit anti goat* IgG, A-11078, Life Technologies™), numa diluição de 1:250 em PBS-BA, que incubou em câmara húmida durante uma hora e meia, à temperatura ambiente. Após três lavagens com 500 μ L de PBS-BA, incubou-se com Hoechst 33342 (B1153, Sigma Aldrich®) numa diluição de 1:1000 em PBS-BA, durante 10 minutos. Seguiram-se mais três lavagens com 500 μ L de PBS-BA e por fim, colocaram-se as lamelas sobre lâminas, utilizando meio de montagem *ProLong® Gold antifade reagent with DAPI* (P36931, Life Technologies™). Após secagem do meio de

montagem (pelo menos 24 horas) e selagem com verniz, as lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência Leica DM 4000 B, equipado com lâmpada de halogéneo de 100W e sistema de epifluorescência integrado, com filtros de excitação a 480/40 nm (para detecção de fluorescência verde) e 360/40 nm (para detecção de fluorescência azul). Adquiriram-se imagens com ampliação de 400X, com a câmara Leica DFC 480 acoplada ao microscópio com o *software* dedicado Leica Application Suite e, posteriormente, foram analisadas com o *software* ImageJ, de modo a quantificar a expressão de NIS total e membranas.

3.3 ESTUDOS DE CAPTAÇÃO E RETENÇÃO DE IODO-131

O iodo-131 é um isótopo radioativo do iodo, muito utilizado para o tratamento de doenças da tiróide através da bem sucedida radioterapia metabólica, apresentando vantagens que incluem a fácil aplicação, a segurança e a eficácia terapêutica para além do baixo custo (58,59,108). O seu período de semi-desintegração ($T_{1/2}$) físico é de 8,04 dias (58,59,61). No que diz respeito aos organismos vivos, deve ser tido em conta que o $T_{1/2}$ biológico do iodo na tiróide é de cerca de 120 dias, pelo que o $T_{1/2}$ efetivo do iodo no corpo humano é de cerca de 7,6 dias (58). O iodo-131 decai para xénon-131 por emissão de partículas β^- , emitindo também raios gama (γ) de várias energias (37,58,60,61). Como se pode verificar na Tabela II, as partículas β^- são emitidas com várias energias, tendo a mais frequente energia da ordem dos 606 keV, energia máxima para o xénon-131 estável. Os raios γ emitidos pelo iodo-131 possuem, principalmente, energias de 364, 637 e 284 keV, de acordo com a Tabela II (55,59,61).

Tabela II Propriedades físicas do Iodo-131. Adaptado de Wyszomirska e colaboradores (58).

Tipo de Radiação emitida	Energia (KeV)	Porcentagem
Beta menos	248	2,1
	334	7,4
	606	89,3
	812	0,7
Gama	80	2,6
	284	6,1
	364	81,2
	637	7,3
	723	1,8

Para determinar o perfil de captação e retenção de iodo-131 pela linha celular TFK-1, foram realizados estudos de influxo e efluxo com este radioisótopo.

No que diz respeito aos estudos de captação, foram preparados frascos de 25 cm², cada um dos quais com 2 x 10⁶ células por mililitro de meio. Após repouso de 60 minutos a 37°C, para recuperação do stresse induzido pela ação da tripsina, adicionou-se à suspensão celular o radiofármaco em estudo numa atividade igual a 9,25 x 10⁵ Bq por mililitro de suspensão celular. Após 5, 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação com o iodo-131, foram retiradas amostras de 200 µL da suspensão celular para dois microtubos contendo 500 µL de PBS gelado cada, de modo a que cada estudo fosse realizado em duplicado. De seguida, com o intuito de separar o *pellet* do sobrenadante, as amostras foram centrifugadas a 5600 G durante 60 segundos. Recolheu-se o sobrenadante para tubos devidamente identificados, seguindo-se uma lavagem dos *pellets* com 500 µL de PBS gelado e centrifugação, para obter uma completa rentabilização dos sobrenadantes. Através da contagem da radioatividade de ambas as frações (*pellet* e sobrenadante) no contador de poço (Capintec, Inc. CRC, 25W) traduzido em contagens por minuto (CPM), foi possível quantificar a percentagem de captação do iodo-131 pelas células, segundo a equação seguinte, e traçar uma curva de captação ao longo do tempo.

$$\% \text{ Captação} = \frac{CPM_{\text{pellet}}}{CPM_{\text{pellet}} + CPM_{\text{sobrenadante}}} \times 100$$

Equação 1 Cálculo da percentagem de captação.

Relativamente aos estudos de retenção, foram também preparados frascos de 25 cm² com 2 x 10⁶ células por mililitro de meio, cada, aos quais se adicionaram 9,25 x 10⁵ Bq de iodo-131 por cada mililitro de meio. Após uma hora de incubação, as suspensões celulares foram centrifugadas a 470 G durante 5 minutos a 4°C. De seguida, decantou-se o sobrenadante e adicionaram-se 2,5 mL de meio de cultura sem radiofármaco. Após 1, 5, 30, 60, 90 e 120 minutos da adição do novo meio, seguiu-se o protocolo anteriormente descrito para os estudos de captação. Pela contagem da radioatividade de ambas as frações (*pellet* e sobrenadante), foi possível quantificar a percentagem de retenção de iodo-131 pelas células e calcular a percentagem de efluxo do radiofármaco, segundo as equações 2 e 3:

$$\% \text{ Retenção} = \frac{CPM_{\text{pellet}}}{CPM_{\text{pellet}} + CPM_{\text{sobrenadante}}} \times 100$$

Equação 2 Cálculo da percentagem de retenção.

$$\% \text{ Efluxo} = 100 - \% \text{ Retenção}$$

Equação 3 Cálculo da percentagem de efluxo.

3.4 IRRADIAÇÃO COM IODO-131

Para a realização de cada ensaio (excepto para os estudos de imunofluorescência, de captação e de retenção) as células foram submetidas a radiação interna por exposição a iodo-131 (Iba Molecular) 24 horas após a sua contagem e adição aos frascos de cultura, com doses e tempos previamente calculados, através da equação:

$$D = \frac{A_0 T_{1/2} e^{\frac{\ln 2}{T_{1/2}} t} \bar{E}}{\ln 2 M}$$

Equação 4 Dose absorvida pelas células por irradiação interna.

onde D é a dose absorvida (Gy), A_0 a atividade inicial da fonte radioativa (mCi), $T_{1/2}$ o período de semi-desintegração (s), t o tempo de irradiação (s), \bar{E} a energia média por desintegração (eV) e M a massa da amostra submetida a irradiação (Kg). As constantes específicas da radiação utilizadas são valores tabelados.

Assim, mediram-se os valores de atividade no calibrador de dose (Capintec, Inc. CRC – 25W) de acordo com as Tabelas III e IV e pipetou-se o volume correspondente para cada frasco de cultura a irradiar. Após incubação de 5 minutos, decantou-se o meio de cultura e fez-se uma lavagem com PBS, que também se decantou. A cada frasco, adicionou-se o volume de meio necessário à manutenção celular e colocou-se novamente na incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Para cada experiência foram também utilizadas células controlo não sujeitas a irradiação.

Tabela III Condições utilizadas para a irradiação celular em frascos de cultura de 75 cm², contendo 7 mL de meio.

Atividade (Bq)	Dose de Radiação (Gy)	Área (cm ²)
7,4 x 10 ⁴	1	75
1,887 x 10 ⁵	5	
7,4 x 10 ⁵	10	
1,48 x 10 ⁶	20	
4,329 x 10 ⁶	60	

Tabela IV Condições utilizadas para irradiação celular em frascos de cultura de 25 cm², contendo 3 mL de meio.

Atividade (Bq)	Dose de Radiação (Gy)	Área (cm ²)
1,073 x 10 ⁴	0,35	25
5,18 x 10 ⁴	1,7	
1,073 x 10 ⁵	3,5	
2,035 x 10 ⁵	6,6	
3,219 x 10 ⁵	10	
6,29 x 10 ⁵	20	
9,25 x 10 ⁵	30	
1,85 x 10 ⁶	60	

3.5 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA CELULAR

O ensaio clonogénico permite determinar a sobrevivência celular através da capacidade que uma única célula possui de crescer e formar uma colónia, após submissão a um tratamento, como a exposição a radiação ionizante (109,110). Esta técnica é considerada o *gold standard* para a avaliação dos efeitos das radiação (109,111).

Para este ensaio foram utilizadas 1,5 x 10⁶ células da linha celular TFK-1, plaqueadas em frascos de 25 cm², tendo sido posteriormente irradiadas com iodo-131 (com todas as doses da tabela III), excepto os frascos destinados a controlo. Após este procedimento, para cada condição foi feita a distribuição por placas de 6 poços, com um

número conhecido de células, que variou entre as 500 e as 2500 por poço, de modo a otimizar cada condição.

Ao quinto dia, o meio foi mudado e doze dias após a irradiação, procedeu-se à coloração, visualização e contagem das colónias formadas. Para tal, após decantar o meio de cultura, lavaram-se as células com 2 mL de PBS. Seguidamente, foram adicionados 2 mL de metanol (32213, Sigma Aldrich®) a cada poço para fixar as colónias, durante 5 minutos, procedimento que foi repetido uma vez. Após secagem das placas, adicionaram-se 2 mL de corante violeta de cristal (M12128, Sigma Aldrich®) (0,5% dissolvido em metanol), tendo sido removido 5 minutos depois. Por fim, após lavagem em água tépida, as placas foram deixadas a secar. O número de colónias foi posteriormente contado, o que permitiu o cálculo da eficácia de plaqueamento (PE) e do fator de sobrevivência, através das equações 5 e 6:

$$\text{Eficácia de Plaqueamento (\%)} = \frac{\text{número de colónias contadas}}{\text{número de colónias semeadas}} \times 100$$

Equação 5 Cálculo da eficácia de plaqueamento.

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

Equação 6 Cálculo do fator de sobrevivência.

3.6 DETERMINAÇÃO DE DANOS CAUSADOS NO DNA

Uma vez que o DNA é considerado um dos alvos principais da radiação ionizante, a estimativa do dano nele causado pode ser utilizada como marcador de radiosensibilidade (112).

O ensaio cometa é um método simples, sensível, rápido e versátil para a detecção de danos do DNA, que perante condições alcalinas (pH 12,3) permite a detecção de quebras em cadeia simples e dupla, bem como os locais lábeis alcalinos (pH \geq 13) (112–114). O protocolo desta técnica inclui um passo de lise em que é utilizada uma solução de elevada concentração salina, com o objetivo de remover membranas celulares, histonas, citoplasma, nucleoplasma e promover a disrupção dos nucleossomas, permanecendo intacto apenas o nucleoide, que contém o DNA superenrolado. As quebras presentes no DNA resultam em relaxamento local de zonas superenroladas, libertando *loops* de DNA, pelo que durante a eletroforese, o DNA quebrado é arrastado na direção do ânodo formando um “cometa”, com uma cabeça (que corresponde à distribuição do DNA intacto) e uma cauda (que corresponde à distribuição do DNA danificado), visualizados através de fluorescência. Neste ensaio, o tamanho e a forma da cauda refletem a extensão dos danos causados no DNA (113,114).

Para este ensaio foram utilizadas $1,5 \times 10^6$ células da linha TFK-1, plaqueadas em frascos de 25 cm^2 e posteriormente irradiadas com iodo-131 (com doses de 0,35; 3,5; 6,6; 20 e 60 Gy), excepto os frascos destinados a controlo. Quarenta e oito horas após a irradiação, prepararam-se suspensões celulares com 5×10^4 células por mililitro em 2 mL de meio, cada. A partir da suspensão inicial do frasco controlo, foram preparadas duas novas suspensões, uma destinada ao controlo propriamente dito e outra destinada ao controlo positivo da técnica. A suspensão para controlo positivo foi exposta a 20 nM de peróxido de hidrogénio (121076, Panreac) durante 15 minutos à temperatura de 4°C , após os quais se centrifugou a 1300 G durante 5 minutos, e se ressuspendeu num

volume igual ao inicial. Preparou-se posteriormente uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (ABPF) a 1% (A9414, Sigma Aldrich®) e, para cada condição, num microtubo, adicionam-se iguais proporções da suspensão celular e da agarose ABPF, agitou-se e espalhou-se 1 mL sobre lâminas (Star Frost) pré-cobertas com uma fina camada de agarose de ponto de fusão normal (APFN) a 1% (A2790, Sigma Aldrich®) solidificada. De seguida, cobriu-se com uma lamela, deixou-se arrefecer a 4°C e após 20 minutos, retirou-se a lamela da agarose. Posteriormente, as lâminas foram incubadas *overnight* numa solução de lise alcalina a 4°C, preparada de fresco e constituída por 2,5 M de cloreto de sódio (S7653, Sigma Aldrich®), 100 mM de EDTA (E4884, Sigma Aldrich®), 10 mM de trizima base (T1503, Sigma Aldrich®), 10% de DMSO (41640, Sigma Aldrich®) e 1% de Triton X-100 (K34979403, Merck). No dia seguinte, as lâminas foram submergidas em tampão de eletroforese, preparado de fresco e constituído por 300 mM de hidróxido de sódio (C294798, Merck) e 1 mM de EDTA (E4884, Sigma Aldrich®) com pH \geq 13, tendo-se deixado em equilíbrio durante pelo menos uma hora. A eletroforese foi realizada num único passo de 15 minutos, com uma diferença de potencial de 25V e corrente de 1A. Após o seu término, as lâminas foram embebidas em solução de neutralização, 400 mM de trizima base (T1503, Sigma Aldrich®), durante 5 minutos, tendo-se repetido este passo três vezes. De seguida, as lâminas foram submergidas em metanol (32213, Sigma Aldrich®) durante 10 minutos e foram deixadas a secar até a camada de agarose não ter espessura (pelo menos até ao dia seguinte). Posteriormente, dispensaram-se algumas gotas de brometo de etídio (161-0433, Bio-Rad) na concentração de 25 µg/mL sobre as lâminas neutralizadas, ficando abrigadas da luz durante 20 minutos à temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram lavadas em água ultrapura.

A visualização das lâminas e a aquisição de imagens foi feita num microscópio de fluorescência invertido (Motic AE31 equipado com sistema de epifluorescência Motic AE31 EF-INV-II) com ampliação de 100X e com filtro de excitação a 546 nm com uma lâmpada de mercúrio de 100 W, sendo que a emissão de fluorescência foi monitorizada a

580 nm no refletor com um filtro a 590 nm. A captura de imagens foi feita com câmara Moticam 5000 Cooled acoplada a computador dedicado com o *software* Motic Images Advanced v3.2 (Microscope World) e a sua análise foi realizada com recurso ao *software* CometScore™ v1.5, de modo a calcular os parâmetros de área do cometa, comprimento de cauda, percentagem de DNA na cauda e momento da cauda.

3.7 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo permite analisar detalhadamente células individuais ou outras partículas biológicas suspensas em meio líquido. Esta tecnologia multiparamétrica permite analisar simultaneamente várias características físicas e químicas dessas partículas, sendo um método rápido, sensível e reprodutível. Através desta técnica as partículas, acopladas a anticorpos conjugados com diferentes fluorocromos, são direcionadas para atravessarem os feixes de lasers de comprimentos de onda específicos. À medida que milhares de partículas, por segundo, passam pelos feixes dos lasers, as moléculas fluorescentes são excitadas, sendo que a luz gerada viaja através de vários filtros e espelhos, antes de ser recolhida e amplificada por tubos fotomultiplicadores. Por fim, o sistema eletrónico converte a luz em sinal digital, que é visualizado no ecrã de um computador (115,116). A citometria de fluxo é uma tecnologia versátil, estando disponível para uma vasta gama de ensaios incluindo (mas não restrito a) análise de ciclo celular, proliferação e morte celular. Outras vantagens da técnica são possibilitar a análise de todo o tipo de fluidos biológicos e tecidos e de permitir discriminar subpopulações, pois apesar de a análise ser feita em milhares a milhões de células de cada vez, cada célula é analisada individualmente (115).

No contexto deste trabalho, a técnica de citometria de fluxo foi utilizada para avaliar os efeitos do iodo-131 na linha celular TFK-1 a nível da viabilidade celular e tipos

de morte celular induzidos, expressão proteica de BAX, BCL-2 e citocromo c, bem como as alterações induzidas no potencial de membrana mitocondrial, ciclo celular e níveis de peróxidos intracelulares, de radical superóxido e de glutatona reduzida.

Para estas avaliações foram utilizadas 5×10^5 células por cada marcação a efetuar, plaqueadas em frascos de 75 cm² ou de 25 cm². Todas as moléculas foram avaliadas 48 horas após irradiação com as doses da Tabela II, excepto os frascos destinados a controlo. Adicionalmente, os níveis de ROS e GSH foram avaliados também 2 horas após irradiação com doses de 20 Gy e 60 Gy. Deste modo, para se proceder à marcação com anticorpos monoclonais ou sondas específicas, começou-se por destacar as células dos frascos e seguidamente, as suspensões celulares resultantes, juntamente com o meio e solução de lavagem (PBS) guardados, foram centrifugadas a 1300 G, durante 5 minutos. Após descartar o sobrenadante, ressuspenderam-se os *pellets* em 1 mL de PBS por cada marcação a efetuar e distribuíram-se pelos tubos de citometria, tendo em conta que para cada molécula e condição em análise foram feitos duplicados.

O número de eventos obtidos através do programa CellQuest™ (BD Diagnostics), correspondente ao número de células contadas pelo citómetro, foi de 1×10^5 . Para a análise e a quantificação da informação foi utilizado o programa Paint-a-Gate™ 3.02, Machintosh Software (BD Diagnostics), que corre em computador dedicado.

3.7.1 Avaliação da Viabilidade Celular e Tipos de Morte Celular Induzidos

A viabilidade celular e os tipos de morte induzidos numa determinada população celular, podem ser analisados através da existência ou não de marcação com certos corantes e/ou anticorpos. Neste trabalho, a opção foi a dupla marcação com anexina V (AV) e iodeto de propídeo (IP). A fosfatidilserina é um fosfolípido membranar que em condições fisiológicas se encontra no folheto interno da bicamada fosfolipídica. Quando

uma célula entra num processo de morte por apoptose, este fosfolípido é translocado para o folheto externo, ficando exposto ao reconhecimento e ligação da AV, que possui grande afinidade por ele (117,118). Por outro lado, o IP tem a capacidade de entrar na célula e intercalar-se na dupla cadeia de DNA, mas apenas em células cuja integridade membranar se encontra comprometida (característica que se associa a células em processo de morte por necrose) (117,119). Assim, de acordo com a Tabela V e em termos de padrão de marcação com AV/IP, as células viáveis são duplamente negativas, as células em apoptose inicial são positivas apenas para a AV, enquanto que as células em necrose são positivas apenas para o IP. Células duplamente marcadas poderão encontrar-se em apoptose tardia ou necrose.

Tabela V Padrões de marcação com anexina V e iodeto de propídeo para os diferentes grupos de células.

	Anexina V	Iodeto de Propídeo
Células Viáveis	-	-
Células em Apoptose Inicial	+	-
Células em Apoptose Tardia/ Necrose	+	+
Células em Necrose	-	+

De modo a proceder à sua marcação, cada suspensão celular foi submetida a centrifugação (1300 G, durante 5 minutos). Após decantação do sobrenadante, foi feita a marcação de acordo com as instruções do *kit* de deteção de morte celular da Immunostep (*kit* Immunotech). Assim, ressuspendeu-se o *pellet* em 100 µL de tampão de ligação frio, constituído por 0,1 M de HEPES (H7523, Sigma Aldrich®), 1,4 M de cloreto de sódio (S7653, Sigma Aldrich®) e 25 mM de cloreto de cálcio (C4901, Sigma Aldrich®) e adicionaram-se 2,5 µL de AV acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) (*kit* Immunotech da Immunostep) e 1 µL de IP (*kit* Immunotech da Immunostep). Incubou-se durante 15 minutos no escuro e após esse tempo,

adicionaram-se 400 μ L de tampão de ligação. As suspensões celulares foram depois guardadas a 4 °C até análise no citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado com um laser de árgon e os comprimentos de onda de excitação de 525 e 640 nm para a AV-FITC e para o IP, respetivamente. Os resultados foram expressos em percentagem de células identificadas em cada uma das subpopulações e basearam-se na positividade e/ou negatividade de marcação para a AV-FITC/IP.

3.7.2 Avaliação da Expressão de BAX, BCL-2 e Citocromo c

Existem muitas moléculas envolvidas no controlo da ativação das vias de apoptose, incluindo as caspases, as proteínas anti- e pró-apoptóticas. De facto, enquanto as proteínas anti-apoptóticas como a BCL-2 são responsáveis pela inibição da permeabilização da membrana externa da mitocôndria (inibindo a apoptose), ao interagir com este organelo, as pró-apoptóticas como a BAX podem ativar a apoptose, desencadeando a libertação de citocromo c que, por sua vez, ativa as caspases (120,121). Estímulos como o dano no DNA podem resultar no aumento da expressão de BAX e/ou diminuição da expressão de BCL-2, culminando na indução do processo apoptótico (121).

Para a avaliação da expressão proteica de BAX, BCL-2 e citocromo c, iniciou-se o procedimento pela centrifugação das suspensões celulares (1300 G, durante 5 minutos). Após decantar o sobrenadante, adicionaram-se 100 μ L de solução A (solução fixante do *Intracell Kit*, Immunostep) ao *pellet* e incubou-se durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionaram-se 2 mL de PBS, centrifugou-se a 1300 G, durante 5 minutos e, por fim, decantou-se o sobrenadante. Adicionaram-se então 100 μ L de solução B (solução permeabilizante do *Intracell Kit*, Immunostep) e 2,5 μ L de anticorpo anti-BAX (sc-20067 PE, Santa Cruz Biotechnology, inc) juntamente com 2,5 μ L de anti-BCL-2 (sc-509 FITC, Santa Cruz Biotechnology, inc) ou apenas 2,5 μ L de anti-

citocromo c (sc-13561 FITC, Santa Cruz Biotechnology, inc). Após incubação durante 15 minutos no escuro e a temperatura ambiente, adicionaram-se 2 mL de PBS e repetiu-se a centrifugação e decantação do sobrenadante. Por fim, ressuspenderam-se todos os conteúdos dos tubos em 400 µL de PBS e guardaram-se a 4 °C até análise no citômetro de fluxo. Na aquisição foram utilizados comprimentos de onda de excitação de 585 nm para a BAX e de 530 nm para a BCL-2 e citocromo c. Os resultados obtidos foram expressos como média de intensidade de fluorescência (MIF), tendo-se calculado posteriormente a razão BAX/BCL-2.

3.7.3 Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial

Durante a apoptose, o gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial sofre uma redução abrupta, devido à formação de poros pela BAX dimerizada ou pela BID, BAK ou BAD ativadas, seguindo-se a libertação de citocromo c para o citoplasma (117). Por citometria de fluxo, é possível analisar a perda de potencial de membrana mitocondrial através da utilização da sonda 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina (JC-1). Em células vivas e intactas, que possuem um potencial de membrana elevado (superior a -140 mV), a sonda é captada pela mitocôndria carregada e sofre agregação (agregados J), resultando em fluorescência laranja/vermelho. Já em células apoptóticas, em que o potencial de membrana mitocondrial se dissipa, esta sonda permanece localizada no citoplasma, na forma monomérica, apresentando fluorescência verde (122,123). Deste modo, a razão entre a fluorescência vermelha e a verde fornece uma estimativa do potencial de membrana mitocondrial (117).

De forma a marcar as suspensões celulares, adicionou-se 1 µL de JC-1 numa concentração de 5 mg/mL (T4069, Sigma Aldrich®) dissolvido em DMSO (41640, Sigma Aldrich®) e incubou-se durante 15 minutos no escuro, a 37°C. Posteriormente,

adicionaram-se 2 mL de PBS a cada tubo e centrifugou-se (1300 G, durante 5 minutos). Após decantação do sobrenadante, ressuspendeu-se em 400 µL de PBS e guardou-se a 4°C. A detecção foi feita em citómetro de fluxo com comprimento de onda de excitação de 490 nm e os resultados obtidos, analisados em termos de MIF para os agregados e monómeros, tendo-se calculado posteriormente a razão entre eles.

3.7.4 Avaliação do Ciclo Celular

O crescimento celular é determinado pela capacidade que uma célula possui de iniciar/completar um ciclo celular e dividir-se, pelo que uma célula cuja proliferação se encontra inibida, deverá encontrar-se parada numa das fases do ciclo. Utilizando o IP, um corante que se intercala em ácidos nucleicos de cadeia dupla, é possível medir, proporcionalmente, o conteúdo de DNA de células individuais, o que permite calcular a percentagem de células em cada uma das fases do ciclo celular: G0, G1, G2/M e S, podendo ainda detetar-se um pico pré-G0 (característico da entrada das células em apoptose) (117).

Para marcação das suspensões celulares foi utilizada a *PI/RNase solution*, de modo a impedir a ligação inespecífica do IP ao RNA. Assim, começou-se por centrifugar os tubos a 1300 G, durante 5 minutos e posteriormente, decantou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 200 µL de etanol a 70% com o tubo em agitação no vórtex e após incubação de 30 minutos no escuro a 4°C, adicionaram-se 2 mL de PBS. As células foram então centrifugadas a 1300 G, durante 5 minutos. Depois de decantar o sobrenadante, adicionaram-se 200 µL de *PI/RNase solution (kit Immunostep)* e incubou-se durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. As suspensões celulares foram guardadas a 4°C até análise no citómetro de fluxo, realizada utilizando o comprimento de onda de excitação de 488 nm. Os resultados foram expressos em percentagem de células identificadas em cada uma das fases do ciclo celular.

3.7.5 Avaliação da Produção Intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio e de Defesas Antioxidantes

Para avaliar os efeitos da radiação, além do crescimento e divisão celulares, também a atividade fisiológica das células e o nível de stresse a que são sujeitas são parâmetros importantes. Em cultura, o stresse celular mais importante é o stresse oxidativo, causado por radicais e iões gerados durante a produção de energia pela mitocôndria. As ROS são moléculas quimicamente reativas que contêm oxigênio, tais como iões de oxigênio, radicais livres e peróxidos, diretamente associadas ao metabolismo energético e stresse oxidativo. Para proteção contra as ROS são muito importantes as defesas antioxidantes, como é o caso da GSH (117).

3.7.5.1 Avaliação da Produção Intracelular de Peróxidos

A diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH₂-DA) é uma sonda comumente utilizada para a deteção semi-quantitativa de algumas ROS. A DCFH₂-DA é captada e hidrolisada a 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína, permanecendo aprisionada no interior das células. Este análogo não fluorescente da fluoresceína é então oxidado a 2'-7'-diclorofluoresceína pelas ROS, tornando-se fluorescente. Nestas circunstâncias, a fluorescência observada é proporcional à concentração intracelular de peróxidos, incluindo o peróxido de hidrogênio (124).

Para esta marcação, começou-se por adicionar aos tubos com a suspensão celular, 1 µL de DCFH₂-DA a 1 mM (35848, Sigma Aldrich®) dissolvido em DMSO (41640, Sigma Aldrich®), tendo-se incubado durante 45 minutos no escuro, a 37°C. Posteriormente, adicionaram-se 2 mL de PBS e centrifugou-se (1300 G, durante 5 minutos). Após ressuspensão em 400 µL de PBS, os tubos foram guardados a 4°C até à

sua aquisição. A análise foi feita no citômetro de fluxo com excitação no comprimento de onda de 504 nm e os resultados obtidos, analisados em termos de MIF.

3.7.5.2 Avaliação da Produção Intracelular de Radical Superóxido

A sonda dihidroetidina (DHE) reage com o radical superóxido, resultando na formação de etídio que, por sua vez, se intercala no DNA, promovendo fluorescência nuclear. A oxidação de DHE é relativamente específica, uma vez que a reação praticamente não ocorre na presença de outras ROS, pelo que esta sonda é frequentemente usada para a detecção intracelular de radical superóxido (124).

Para esta marcação, adicionaram-se às suspensões celulares 5 µL de DHE a 1 mM (D7008, Sigma Aldrich®) dissolvido em DMSO (41640, Sigma Aldrich®) e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Após adicionar 2 mL de PBS, procedeu-se à centrifugação (1300 G, durante 5 minutos) e decantar do sobrenadante. Posteriormente, ressuspendeu-se o *pellet* resultante em 400 µL de PBS e guardou-se a 4°C até à sua aquisição no citômetro de fluxo. A detecção foi feita com comprimento de onda de excitação de 620 nm, tendo os resultados obtidos sido expressos como MIF.

3.7.5.3 Avaliação da Expressão Intracelular de Glutathiona Reduzida

A glutathiona reduzida é um agente redutor intracelular importante, na medida em que protege as células do dano provocado por radicais livres e por reduzir o peróxido de hidrogénio ou peróxidos orgânicos. Para medir os seus níveis intracelulares podem ser utilizados corantes como o alaranjado de mercúrio, que através da sua ligação a grupos sulfidril, forma adutos fluorescentes. Esta sonda, que emite uma intensa fluorescência vermelha quando excitada, é frequentemente utilizada uma vez que reage mais rapidamente com a GSH do que com os grupos sulfidril de outras proteínas, permitindo um bom grau de especificidade, sob condições controladas (125).

Para proceder à marcação das suspensões celulares, começou-se por adicionar aos tubos de citometria 1 μ L de alaranjado de mercúrio (M7750, Sigma Aldrich®) numa concentração de 10 mM, diluído em DMSO (41640, Sigma Aldrich®). Após incubação durante 15 minutos a 37°C e no escuro, adicionaram-se 2 mL de PBS e centrifugou-se a 1300 G durante 5 minutos. Cada amostra foi então ressuspensa em 400 μ L de PBS e guardada a 4°C até à análise no citómetro de fluxo. A deteção foi feita a comprimento de onda de excitação de 620 nm e os resultados obtidos, analisados em termos de MIF.

3.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO INTRACELULAR DE SUPERÓXIDO DISMUTASE

A superóxido dismutase, que catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio molecular, é uma das enzimas antioxidantes mais importantes (123). O *kit* utilizado neste trabalho baseia-se na determinação da atividade da SOD através de um método colorimétrico, tendo em conta a produção de um corante de formazano pela redução de um sal de tetrazólio, resultante da ação do radical superóxido. A taxa de redução com oxigénio relaciona-se linearmente com a atividade da xantina oxidase, inibida pela SOD (126).

Para este ensaio foram utilizadas $1,5 \times 10^6$ células da linha TFK-1, plaqueadas em frascos de 25 cm^2 , tendo sido posteriormente irradiadas com iodo-131 (com doses de 0,35; 1,7; 3,5; 6,6; 20 e 60 Gy para avaliação às 48 horas e de 20 e 60 Gy para avaliação 2 horas após a irradiação), excepto os frascos destinados a controlo. Após 2 ou 48 horas de repouso, efetuaram-se extratos celulares, de modo a isolar as proteínas das células. Assim, começou-se por recolher o meio de cada frasco e lavaram-se três vezes com PBS, recolhendo também este para os tubos correspondentes. Centrifugou-se a 1300 G,

durante 5 minutos, decantaram-se os sobrenadantes e fez-se uma nova lavagem com PBS, seguida de nova centrifugação e posterior decantação. Posteriormente, adicionaram-se aos frascos 200 µL de tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA, do inglês *radioimmunoprecipitation assay buffer*) constituído por 150 mM de cloreto de sódio (S5886, Sigma Aldrich®), 50 mM de trizima base (T1503, Sigma Aldrich®), 5 mM de EGTA (E4378, Sigma Aldrich®), 1% (V/V) de Triton X-100 (K34979403, Merck), 0,5% (m/V) de deoxicolato (30970, Sigma Aldrich®) e 0,1% (m/V) de dodecil sulfato de sódio (SDS, L3771, Sigma Aldrich®). De seguida, com a ajuda de um raspador soltaram-se as células da superfície de cada frasco e com as suspensões celulares resultantes ressuspenderam-se os respetivos *pellets*, recolhendo por fim para microtubos. Posteriormente, sonicaram-se as amostras três vezes, durante 10 segundos cada, a uma amplitude de 35% (sonicador Vibra cell da *Sonic and Materials inc.*, modelo VC50 de 240V, 50W e 20KHz). De seguida, centrifugaram-se a 14 000 G, a 4°C, durante 15 minutos e transferiram-se os sobrenadantes para novos microtubos, tendo-se guardado as amostras a -80°C. Todo o procedimento foi realizado em gelo para potenciar a inativação de proteases.

Para a quantificação de proteínas foi utilizada uma técnica colorimétrica, baseada no método do ácido bicinconínico (BCATM *protein assay kit*, Pierce Biotechnology), sensível na gama de proteínas entre 20 e 2000 µg/mL, em que é utilizada uma reta padrão que relaciona a absorvância obtida na leitura de cada amostra com a concentração de proteína nelas contida. Com essa informação obteve-se o valor da concentração de proteínas de cada amostra através da seguinte equação:

$$A = c l \varepsilon$$

Equação 7 Lei de Beer-Lambert.

onde A é a absorvância obtida no leitor ELISA em cada poço, c é a concentração da amostra, l é o comprimento da amostra ao qual a luz atravessa e ϵ é o coeficiente de absorção molar do complexo que exibe cor, neste caso o complexo entre o cobre reduzido pelas proteínas numa solução alcalina, de Cu^{2+} a Cu^+ , e duas moléculas de ácido bicinconínico.

Assim, começou-se por descongelar as amostras e preparar as soluções de RIPA numa diluição de 1:9, BCA numa diluição de 50 de solução A para 1 de solução B do *kit* e padrões de BSA (BCA™ *protein assay kit*, Pierce Biotechnology). De seguida e de acordo com o *kit*, adicionaram-se os reagentes e amostras nas respetivas quantidades numa placa de 96 poços e agitou-se durante 30 segundos. Incubou-se a 37°C durante 30 minutos e mediu-se a absorvância a 540 nm, utilizando um espectrofotómetro ELISA (Biotek® Synergy HT).

Para a determinação da expressão de SOD propriamente dita, recorreu-se ao *SOD Determination Kit* (19160-1KT, Sigma Aldrich®). Para tal, começou-se por preparar a solução de trabalho de *water-soluble tetrazolium* (WST, composta por 19 mL de solução tampão e 1 mL de solução WST) e enzima (composta por 2,5 mL de tampão de diluição e 10 µL de solução de enzima). De seguida, adicionaram-se a cada poço de uma placa de 96 poços, 20 µL de amostra (em duplicado), 200 µL de solução de trabalho de WST e por fim 20 µL de solução de trabalho de enzima. Incubou-se a 37°C durante 20 minutos e mediu-se a absorvância a 450 nm, utilizando um espectrofotómetro ELISA (Biotek® Synergy HT).

A atividade inibitória da SOD foi quantificada tendo por base que a absorvância a 450 nm é proporcional à quantidade de radical superóxido contida em cada poço. Assim, os valores de absorvância obtidos foram posteriormente relacionados com a concentração de proteína total presente em cada amostra, obtendo-se valores de atividade de SOD por concentração de proteína (µg/µL).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM® SPSS® v. 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA). A avaliação da normalidade de distribuição das variáveis quantitativas foi feita de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. Foram utilizados testes paramétricos no caso de se verificar uma distribuição normal e testes não paramétricos no caso contrário.

Na avaliação da viabilidade celular, da razão BAX/BCL-2, do citocromo c, do potencial de membrana mitocondrial, do ciclo celular, de ROS e de defesas antioxidantes, as diferentes condições de irradiação (doses de radiação) foram comparadas utilizando o teste ANOVA de um fator (no caso de distribuição normal e homogeneidade de variâncias) ou o teste de Kruskal-Wallis (caso contrário). As comparações das diferentes condições com o controlo para a avaliação de potencial de membrana mitocondrial, ROS e defesas antioxidantes foram realizadas de acordo com o teste t de Student para uma média. Todas as comparações múltiplas foram realizadas segundo a correção de Bonferroni.

Na avaliação dos resultados do ensaio cometa foram consideradas as medições de área do cometa, comprimento da cauda, percentagem de DNA na cauda e momento da cauda. As comparações destes parâmetros entre as condições consideradas foram realizadas segundo o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com comparações múltiplas segundo correção de Bonferroni.

Nos estudos de imunofluorescência, a comparação da MIF entre condições com e sem permeabilização foi efetuada segundo o teste de Kruskal-Wallis, com correção de Bonferroni para as comparações múltiplas.

Na análise do ensaio clonogénico, os valores experimentais obtidos foram ajustados ao modelo linear quadrático utilizando o *software* OriginLab v. 8.0:

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

onde SF representa o factor de sobrevivência determinado no ensaio clonogénico, D representa a dose de radiação a que a população celular foi exposta e α e β representam parâmetros do modelo linear-quadrático. Foram ainda determinadas a razão α/β e a dose necessária para reduzir o SF para 0,5.

Na análise da captação de iodo-131, os valores experimentais obtidos foram ajustados a um modelo exponencial utilizando o *software* OriginLab v. 8.0:

$$\text{Captação (\%)} = A \cdot (1 - e^{-\ln(2) \cdot t / T_{50\%}})$$

onde A representa a captação máxima obtida (*steady state*) e $T_{50\%}$ representa o tempo que demora a ser atingida metade da captação máxima.

Na análise da retenção de iodo-131, os valores experimentais obtidos foram ajustados a um modelo exponencial utilizando o *software* OriginLab v. 8.0:

$$\text{Retenção (\%)} = A + (100 - A) e^{-\ln(2) \cdot t / T_{50\%}}$$

onde A representa a retenção de iodo em equilíbrio (*steady state*) e $T_{50\%}$ representa o tempo que demora a ser atingido o valor de retenção correspondente a metade do efluxo máximo (considerando $\text{Efluxo} = 100 - \text{Retenção}$).

Foi considerado um erro tipo I de 0,05 para todas as comparações.

4. RESULTADOS¹

¹ Os resultados apresentados ao longo deste capítulo foram obtidos em coautoria com a Mestre Alexandra Fernandes.

O objetivo geral deste trabalho de investigação consistiu em avaliar o potencial terapêutico da radioterapia metabólica com iodo-131 numa linha celular de colangiocarcinoma. Os métodos descritos no capítulo anterior foram assim utilizados com o intuito de verificar se a utilização deste radiofármaco pode representar uma nova abordagem terapêutica para este tumor.

4.1 EXPRESSÃO DE NIS

O NIS é um transportador fundamental para a captação de iodo e em particular de iodo-131, sendo que para ser funcional, é necessário estar expresso ao nível da membrana celular. Deste modo, começou-se por avaliar, por imunofluorescência a expressão deste transportador de iodo na linha celular TFK-1.

As imagens da figura 12 dizem respeito aos padrões de marcação obtidos com esta técnica, representando a expressão basal da proteína, total (imagens A a C) e a nível membranar (imagens D a F), bem como a expressão após irradiação com iodo-131 com uma dose de 20 Gy, total (G a I) e a nível membranar (J a M).

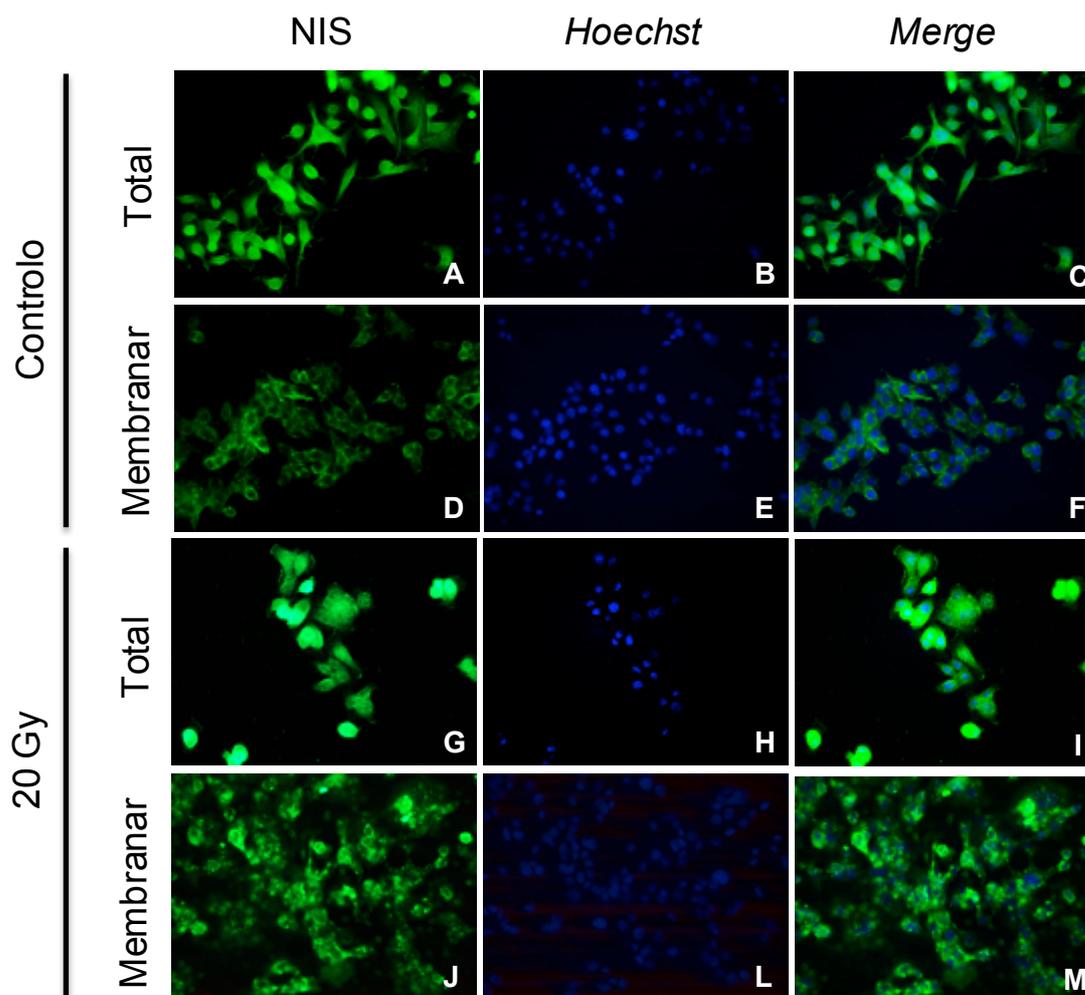


Figura 12 Imagens ilustrativas da expressão de NIS na linha celular TFK-1, total (A, G – NIS; B, H – *Hoechst*; C, I – *Merge*) e a nível membranar (D, J – NIS; E, L – *Hoechst*; F, M – *Merge*), obtidas com ampliação de 400X.

O gráfico da figura 13 representa os resultados de imunofluorescência obtidos para a linha celular TFK-1. De referir que por questões experimentais, os resultados referentes a irradiação com iodo-131 com uma dose de 20 Gy são preliminares, representando duas experiências independentes.

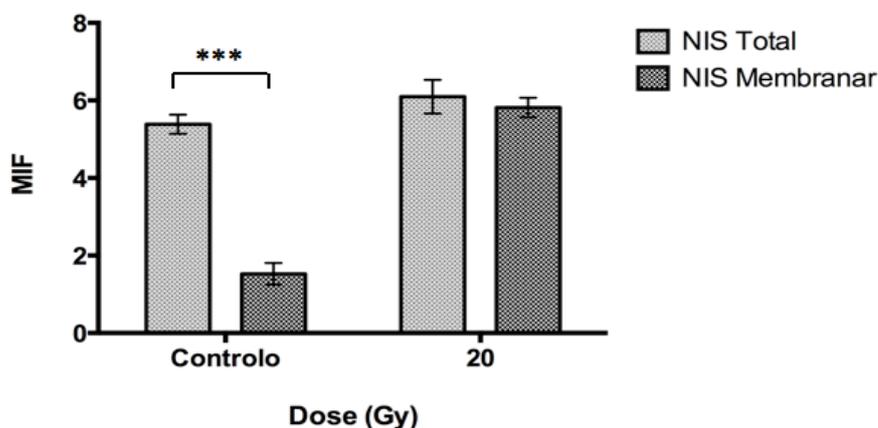


Figura 13 Expressão total e membranar de NIS na linha celular TFK-1. Os resultados expressam a média e o desvio padrão da média de intensidade de fluorescência (MIF) de 4 experiências independentes, num total de 60 campos aleatórios, para a condição controlo. No que respeita às células irradiadas com 20 Gy, os resultados apresentados são preliminares e referem-se a 2 experiências independentes, num total de 60 campos aleatórios. As diferenças significativas estão assinaladas com ***, que representa $p < 0,001$.

Através da análise do gráfico da figura 13, verifica-se que a irradiação com iodo-131 parece induzir um aumento de expressão de NIS na linha celular TFK-1, quer a nível total quer membranar. Nas células controlo verifica-se que a expressão de NIS ao nível da membrana celular é significativamente inferior à expressão total desta proteína ($p < 0,001$). Duas horas após a irradiação, verifica-se uma tendência para o aumento tanto da sua expressão total como da sua expressão membranar. De facto, após irradiação, a expressão de NIS a nível membranar parece corresponder aproximadamente à totalidade da proteína.

4.2 CAPTAÇÃO E RETENÇÃO DE IODO-131

Foram realizados estudos de captação e de retenção de iodo-131 na linha celular TFK-1. Os gráficos da figura 14 apresentam os resultados obtidos ao longo de duas

horas de ensaio, para a captação (figura 14 A) e para a retenção (figura 14 B) do radiofármaco em estudo.

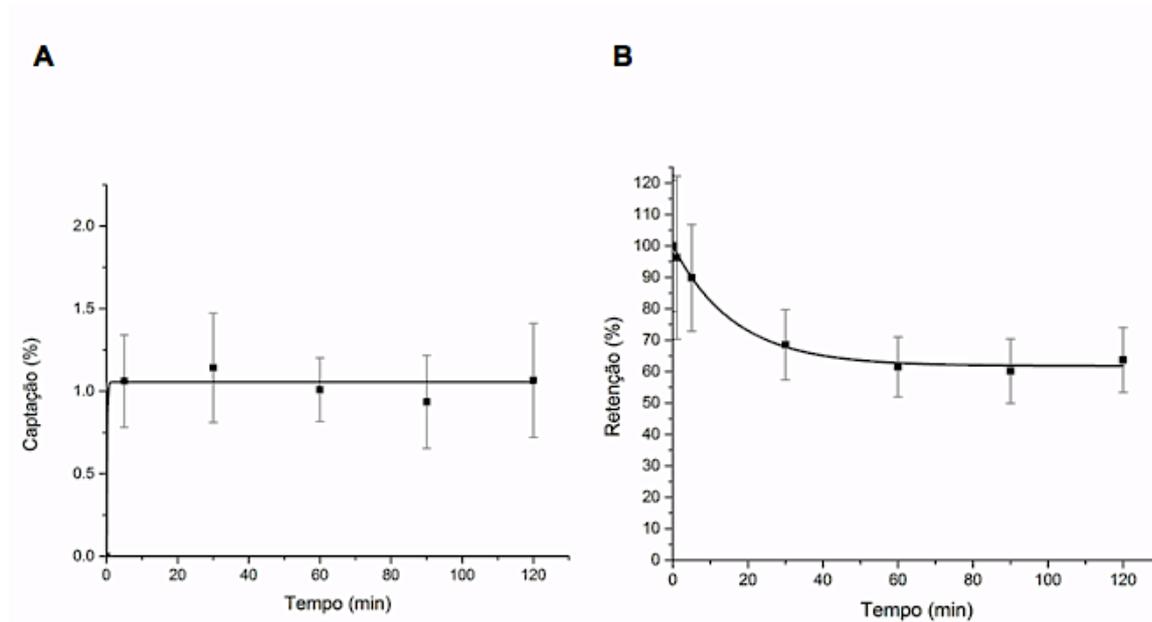


Figura 14 Perfis de captação (A) e de retenção (B) de iodo-131 pela linha celular TFK-1. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos 4 experiências independentes realizadas em duplicado.

De acordo com o gráfico A da figura 14, verifica-se que o iodo-131 é captado pela linha celular TFK-1, sendo que aos 46,8 segundos, a captação atinge metade da captação máxima, cujo valor é de 1,09% e se verifica 1,12 minutos após o início do estudo. Posteriormente, a captação permanece aproximadamente constante.

Através da observação do gráfico B, é possível verificar que o radiofármaco em estudo é retido pelas células TFK-1, atingindo metade da retenção mínima aos 11,34 minutos após o início do ensaio e cujo valor mínimo é de 61,78%. Verifica-se ainda que a percentagem de retenção de iodo-131 se mantém posteriormente aproximadamente constante.

4.3 EFEITOS CELULARES DO IODO-131

Com o intuito de testar a eficácia da radioterapia metabólica com iodo-131, avaliaram-se os seus efeitos ao nível da sobrevivência celular, bem como a ativação de vias de morte celular, possíveis alterações no ciclo celular, danos causados no DNA e indução de stresse oxidativo.

4.3.1 Sobrevivência Celular

Para avaliar o efeito da radioterapia metabólica com iodo-131 na sobrevivência celular, foram realizados ensaios clonogénicos. O gráfico da figura 15 expressa o fator de sobrevivência calculado em relação às culturas controlo, obtido para as condições estudadas, na linha celular TFK-1.

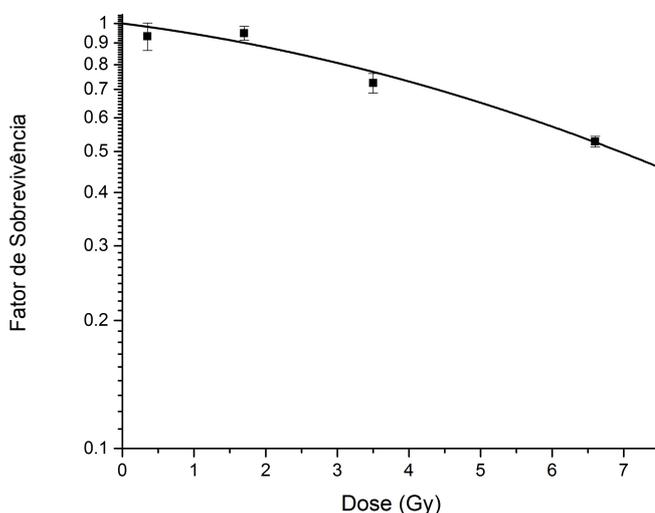


Figura 15 Análise da sobrevivência celular através do ensaio clonogénico, em resposta à irradiação com iodo-131, na linha celular TFK-1. As culturas celulares foram submetidas às doses de irradiação referidas no ponto 3.5 e a formação de colónias foi quantificada doze dias mais tarde. O gráfico expressa o logaritmo das médias de fator de sobrevivência em relação ao controlo e respetivos desvios padrão de 10 experiências independentes, para cada exposição.

Através da observação da figura 15 consegue-se constatar que a irradiação com as diferentes doses de iodo-131 testadas induziu alterações significativas no que respeita à capacidade de formação de colónias na linha celular TFK-1.

Pela análise do gráfico podemos constatar que, de forma geral, à medida que se aumenta a dose de radiação, ocorre uma diminuição gradual e significativa da capacidade de formação de colónias na linha celular TFK-1. De facto, quando irradiadas com doses de 3,5 Gy, 20 Gy e 60 Gy, a sua sobrevivência diminuiu para cerca de 72% ($p < 0,001$), 39% ($p < 0,001$) e 32% ($p < 0,001$), respetivamente. Verificou-se ainda que a dose letal média, ou seja, a dose necessária para diminuir a sobrevivência celular em 50% para as células TFK-1 é de 6,94 Gy.

4.3.2 Vias de Morte Celular

Após verificar que o tratamento com iodo-131 diminui a sobrevivência celular das células TFK-1, pretendeu-se avaliar a viabilidade celular e os tipos de morte induzidos, a expressão de BAX, de BCL-2 e de citocromo c, bem como possíveis alterações do potencial de membrana mitocondrial nesta linha celular.

4.3.2.1 Viabilidade Celular e Tipos de Morte Celular Induzidos

A viabilidade celular em resposta ao tratamento com iodo-131, foi avaliada por citometria de fluxo, através da dupla marcação com AV-FITC e IP. O gráfico da figura 16 representa as diferentes populações identificadas (células viáveis, células em apoptose inicial, células em apoptose tardia/necrose e células em necrose) para cada uma das condições testadas.

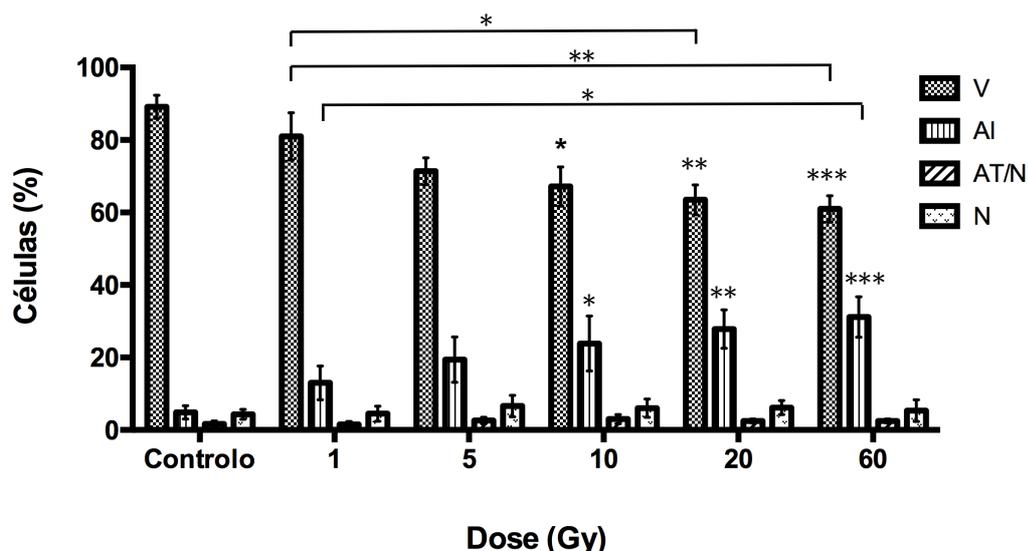


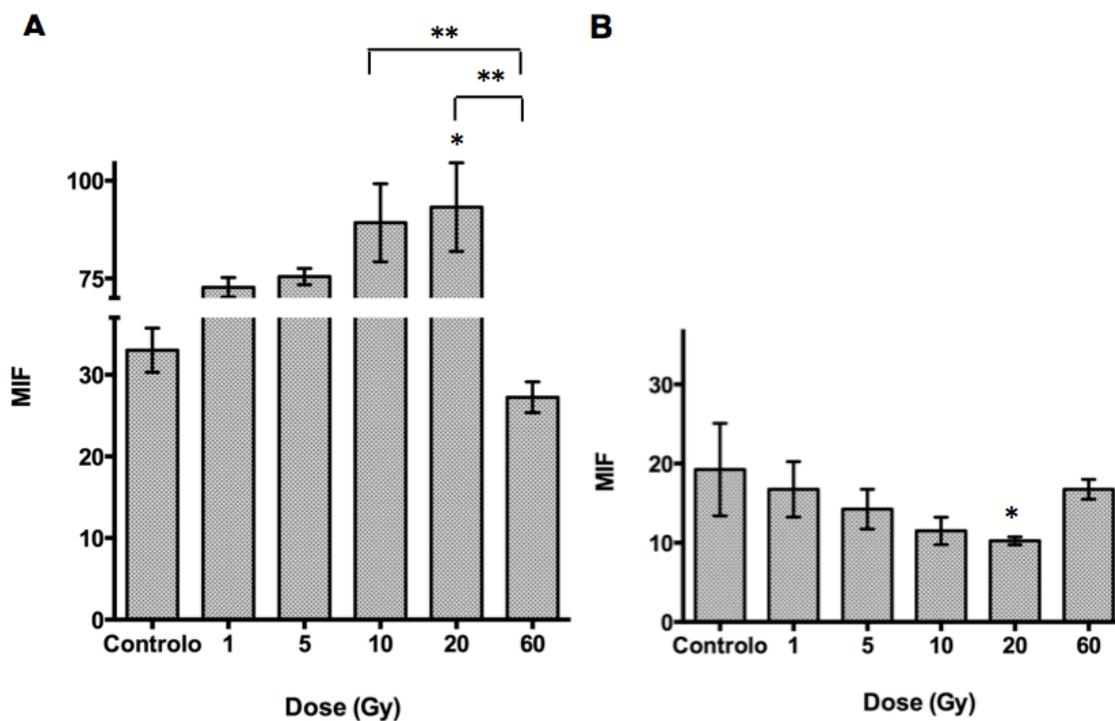
Figura 16 Análise da viabilidade celular, 48 horas após irradiação com iodo-131, na linha celular TFK-1. Os resultados estão representados na forma de percentagem de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e em necrose (N). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de 6 experiências independentes para cada uma das condições testadas. As diferenças significativas estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$.

De acordo com a figura 16, é possível constatar que à medida que se aumenta a dose de radiação, a percentagem de células TFK-1 viáveis decresce sendo a apoptose o tipo de morte celular que maioritariamente se verifica. De facto, embora com a menor dose testada (1 Gy) estas células tenham mantido aproximadamente 81% de viabilidade, ao aumentar a dose de radiação para 5 Gy, 10 Gy, 20 Gy e 60 Gy, a viabilidade celular diminuiu para cerca de 71%, 67%, 64% e 61%, respetivamente, apresentando significado estatístico, relativamente ao controlo, para as condições de 10 Gy ($p < 0,05$), de 20 Gy ($p < 0,01$) e de 60 Gy ($p < 0,001$). Verificaram-se ainda diferenças significativas entre as condições de 1 Gy e 20 Gy ($p < 0,05$) e as condições de 1 Gy e de 60 Gy ($p < 0,01$). Já a população de células em morte celular por apoptose, em fase inicial, aumentou com a dose de radiação para cerca de 19%, 24%, 28% e 31%, para as doses de 5 Gy, de 10 Gy, de 20 Gy e de 60 Gy respetivamente, apresentando significado estatístico relativamente ao controlo, também para as condições de 10 Gy ($p < 0,05$), 20 Gy ($p < 0,01$) e 60 Gy ($p < 0,001$). Ainda respeitante as células em apoptose inicial, verificaram-se diferenças significativas entre as condições de 1 Gy e de 60 Gy ($p < 0,05$). No que se

refere às populações de células em apoptose tardia/necrose e em necrose, não se verificaram diferenças significativas entre o controlo e as várias condições testadas, embora se verifique uma ligeira tendência para o aumento da percentagem de células nestas populações celulares.

4.3.2.2 Expressão de BAX, BCL-2 e Citocromo c

Com o intuito de determinar a relação entre a expressão da proteína pró-apoptótica BAX e a anti-apoptótica BCL-2, bem como a expressão de citocromo c, utilizou-se a técnica de citometria de fluxo. Os gráficos da figura 17 representam os valores de BAX (A), BCL-2 (B) e razão BAX/BCL-2 (C), obtidos em cada uma das condições testadas. O gráfico da figura 18 apresenta os valores de expressão de citocromo c obtidos em cada uma das condições testadas.



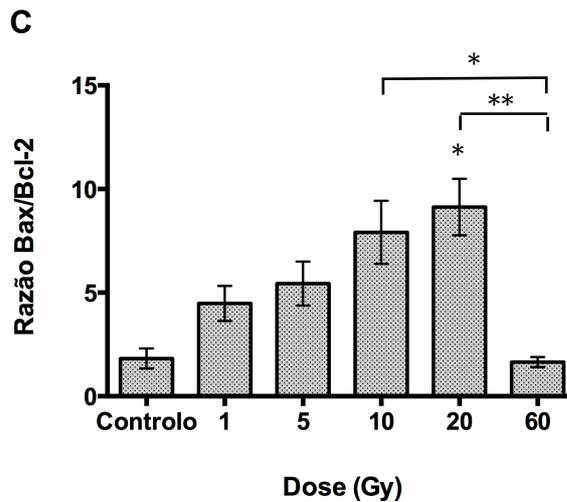


Figura 17 Análise da expressão de BAX (A), BCL-2 (B) e razão entre a BAX e a BCL-2 (C), 48 horas após irradiação com iodo-131, na linha celular TFK-1. Os resultados apresentados são expressos como MIF (gráficos A e B) ou razão (gráfico C) para cada uma das doses testadas, exprimindo a média e o desvio padrão de 4 experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$ e ** representa $p < 0,01$.

De acordo com os resultados obtidos e apresentados nos gráficos A e B da figura 17, verificou-se uma tendência para o aumento progressivo da expressão da proteína BAX e diminuição gradual da BCL-2, à medida que se aumenta a dose de radiação, excepto para a condição de 60 Gy. Para esta condição a tendência dos resultados inverte-se, verificando-se um aumento de expressão de BCL-2 e diminuição da expressão de BAX para valores aproximados aos verificados na condição controlo. Para a BAX verificou-se, face ao controlo, um aumento significativo de expressão após irradiação com 20 Gy ($p < 0,05$), bem como uma diminuição significativa entre as condições de 10 Gy e de 60 Gy ($p < 0,01$) e entre 20 Gy e 60 Gy ($p < 0,01$). Para a BCL-2 verificou-se, em relação ao controlo, uma diminuição significativa de expressão após irradiação com iodo-131 com uma dose de 20 Gy ($p < 0,05$). Pela análise dos gráficos A e B da figura 17 é também possível verificar que a expressão da BAX é sempre superior à da BCL-2. Tendo em conta os resultados obtidos na condição controlo, ou seja, uma maior expressão de BAX relativamente a BCL-2 (gráficos A e B) e um valor de razão

BAX/BCL-2 (gráfico C) superior a 1, verifica-se que nas condições basais, as células TFK-1 possuem uma maior expressão da proteína BAX relativamente à BCL-2.

No que diz respeito à razão BAX/BCL-2, através da figura 17 C observa-se ainda que, relativamente ao controlo, o tratamento com iodo-131 tende a induzir um aumento progressivo da razão BAX/BCL-2 para todas as condições testadas, excepto para a condição de 60 Gy, sendo estatisticamente significativo para a condição de 20 Gy ($p < 0,05$). Para a dose de radiação de 60 Gy, que apresenta uma razão BAX/BCL-2 ligeiramente inferior à verificada no controlo, obteve-se um resultado significativamente inferior ao observado após irradiação com 10 Gy ($p < 0,05$) e com 20 Gy ($p < 0,01$).

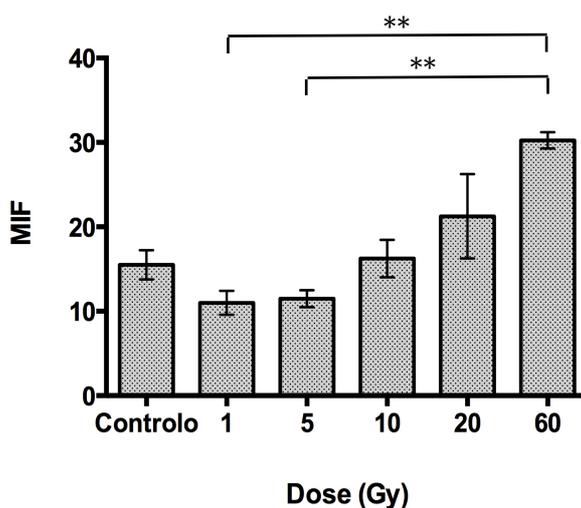


Figura 18 Análise da expressão de citocromo c, 48 horas após irradiação com iodo-131, na linha celular TFK-1. Os resultados apresentados são expressos como MIF e exprimem a média e o desvio padrão de 4 experiências independentes, para as diferentes doses testadas. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com **, que representa $p < 0,01$.

Relativamente à expressão de citocromo c, representada na figura 18, é possível observar uma tendência para o aumento da sua expressão com a dose de radiação. De facto, verifica-se para todas as doses de irradiação, uma tendência para o aumento progressivo da expressão desta proteína, que é significativo entre as condições de 1 Gy e de 60 Gy ($p < 0,01$) e entre 5 Gy e 60 Gy ($p < 0,01$). Enquanto que após irradiação com

doses de 1 Gy e de 5 Gy, a sua expressão é inferior à observada na condição controlo, verifica-se que para uma dose de 10 Gy a expressão de citocromo c é semelhante à verificada no controlo e que para doses de iodo-131 superiores (20 Gy e 60 Gy), esta proteína parece encontrar-se sobreexpressa, no entanto sem significado estatístico relativamente ao controlo.

4.3.2.3 Potencial de Membrana Mitocondrial

No que diz respeito à análise de possíveis alterações do potencial de membrana mitocondrial, determinou-se a razão entre agregados e monómeros com a sonda JC-1, através da técnica de citometria de fluxo. O gráfico da figura 19 representa os valores obtidos da razão agregados/monómeros em cada uma das condições testadas, normalizados ao controlo.

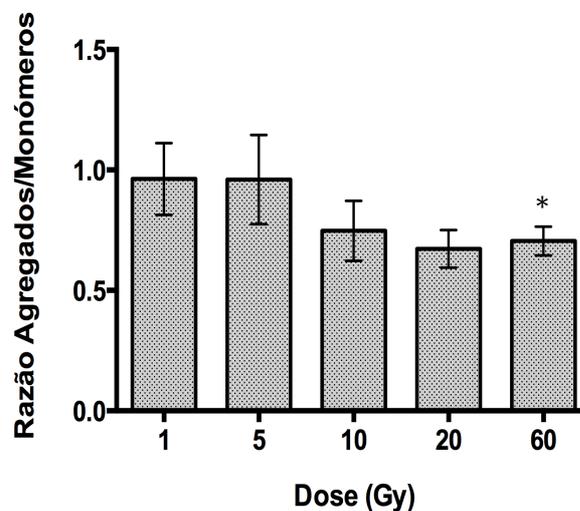


Figura 19 Avaliação de alterações do potencial de membrana mitocondrial, na linha celular TFK-1, 48 horas após irradiação com iodo-131. Para cada condição, os resultados foram normalizados em relação ao controlo e exprimem a média e o desvio padrão de 4 experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *, que representa $p < 0,05$.

De acordo com o gráfico da figura 19, verifica-se uma tendência para uma diminuição gradual da razão agregados/monómeros de JC-1 à medida que se aumenta a

dose de radiação. Relativamente às condições de 1 Gy e de 5 Gy, é ainda possível verificar que os resultados obtidos são semelhantes aos verificados no controlo. Por outro lado, para as doses mais elevadas (10 Gy, 20 Gy e 60 Gy), verifica-se que o potencial de membrana mitocondrial é inferior ao verificado na condição controlo, com significado estatístico entre o controlo e a condição de 60 Gy ($p < 0,05$).

4.3.3 Ciclo Celular

Ao longo deste trabalho, procedeu-se também à avaliação de possíveis alterações induzidas no ciclo celular, tendo por base que a quantidade de fluorescência emitida por células marcadas com IP permite conhecer a sua distribuição ao longo das diferentes fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M). Os resultados obtidos para as diferentes condições testadas na linha celular TFK-1 encontram-se na figura 20, sendo expressos como percentagem de células existentes em cada uma das fases do ciclo celular.

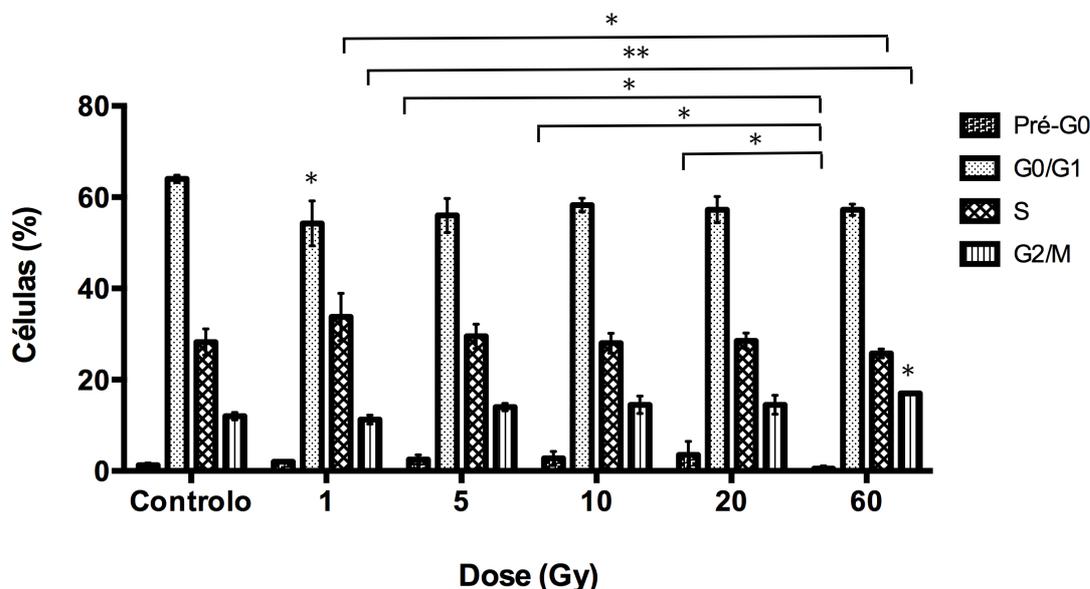


Figura 20 Avaliação das populações celulares em cada uma das fases do ciclo celular, 48 horas após irradiação com iodo-131, na linha celular TFK-1. Os resultados estão representados na forma de percentagem de células em fase pré-G0, G0/G1, S e G2/M. Os resultados exprimem a média e o desvio padrão de 4 experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$ e ** representa $p < 0,01$.

Tendo em conta o gráfico da figura 20, é importante referir uma tendência para o aparecimento do pico pré-G0, o pico pré-apoptótico, principalmente após irradiação com iodo-131 nas doses de 5 Gy, 10 Gy e 20 Gy, sendo significativamente superior a percentagem de células verificadas nestas condições face à de 60 Gy ($p < 0,05$ para as três comparações), condição para a qual a percentagem de células diminui. Por outro lado, é possível observar que a população de células em fase G0/G1 nas condições testadas é sempre inferior à observada no controlo, com diferenças significativas para a dose de 1 Gy ($p < 0,05$). No que se refere às populações de células em fase S, verifica-se uma diminuição significativa entre as condições de 1 Gy e de 60 Gy ($p < 0,05$). Relativamente à fase G2/M, verifica-se um aumento significativo entre as condições controlo e de 60 Gy ($p < 0,05$) e entre 1 Gy e 60 Gy ($p < 0,01$).

4.3.4 Danos causados no DNA

De modo a averiguar os efeitos do tratamento com iodo-131 a nível do DNA, recorreu-se ao ensaio cometa. As imagens da figura 21 pretendem ilustrar os resultados obtidos com esta técnica, para a linha celular TFK-1 e em cada uma das condições testadas, a partir das quais foi possível obter os parâmetros apresentados nos gráficos da figura 22.

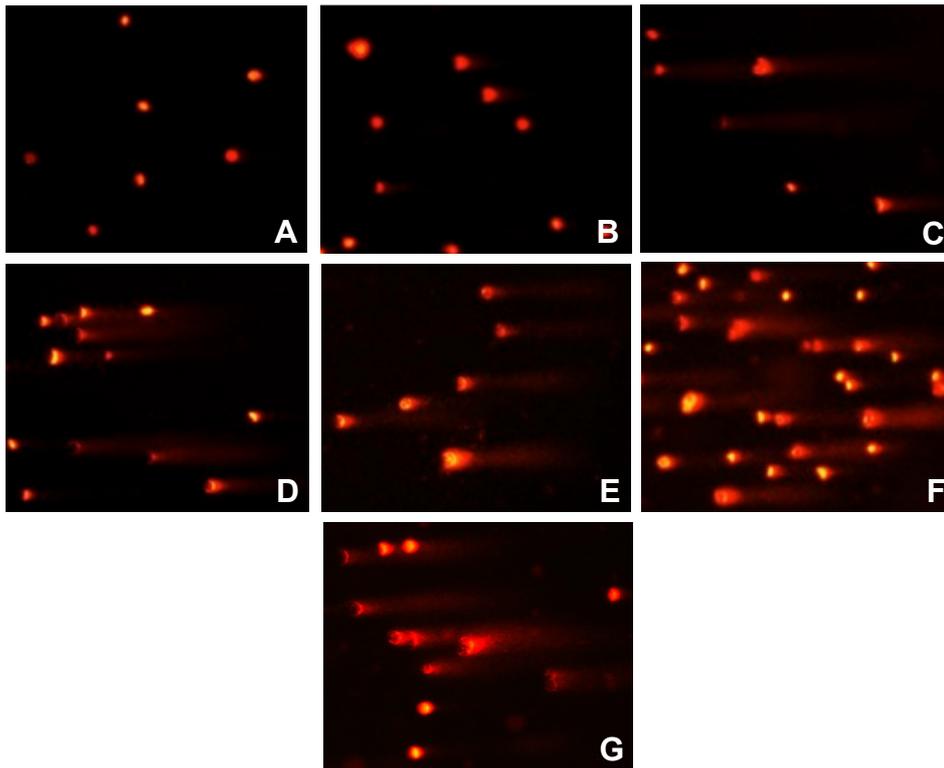


Figura 21 Imagens ilustrativas dos resultados obtidos com o ensaio cometa na linha celular TFK-1, para o controlo (A), dose de 0,35 Gy (B), 3,5 Gy (C), 6,6 Gy (D), 20 Gy (E) e 60 Gy (F) de iodo-131, bem como para o controlo positivo (G) obtidas com ampliação de 100X.

Os gráficos da figura 22 apresentam os resultados obtidos, relativamente à área do cometa (A), comprimento da cauda (B), percentagem de DNA na cauda (C) e momento da cauda (D) para as condições em estudo, estando representados os valores das medianas e das amplitudes interquartis para cada parâmetro.

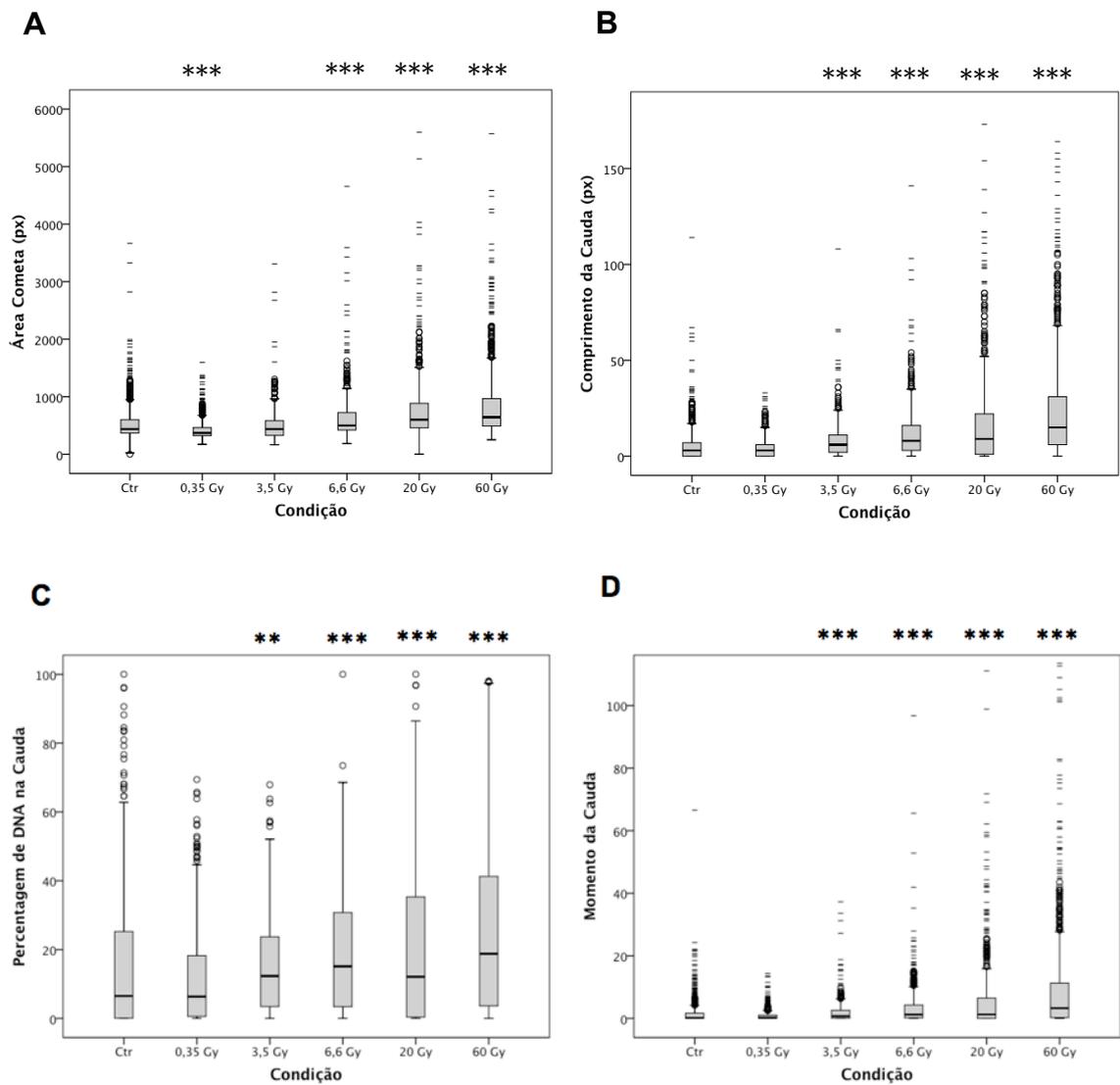


Figura 22 Avaliação de danos causados no DNA, com a técnica de ensaio cometa, na linha celular TFK-1, 48 horas após irradiação com iodo-131. Os resultados expressam a mediana e amplitude interquartis de pelo menos 3 experiências independentes, num total de pelo menos 30 campos aleatórios, para os parâmetros de área do cometa (A), comprimento da cauda (B), percentagem de DNA na cauda (C) e momento da cauda (D). As diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$.

De acordo com a figura 21 e os resultados dos gráficos apresentados na figura 22, a irradiação com iodo-131 induziu danos significativos ao nível do DNA, na linha celular TFK-1 podendo constatar-se que de forma geral, à medida que se aumenta a dose de radiação, aumenta também, progressivamente, a agressividade do dano causado no DNA.

No que se refere à área do cometa, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas, comparativamente ao controlo, após irradiação com 0,35 Gy ($p < 0,001$), 6,6 Gy ($p < 0,001$), 20 Gy ($p < 0,001$) e 60 Gy ($p < 0,001$). Verificaram-se ainda diferenças significativas entre todas as condições testadas ($p < 0,001$), excepto entre os 20 Gy e os 60 Gy.

No que diz respeito ao comprimento da cauda, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas após irradiação com 3,5 Gy ($p < 0,001$), 6,6 Gy ($p < 0,001$), 20 Gy ($p < 0,001$) e 60 Gy ($p < 0,001$), comparativamente ao controlo. Verificaram-se ainda diferenças com significado estatístico entre todas as condições testadas, com $p < 0,05$ entre as doses de 3,5 Gy e de 6,6 Gy e entre as doses de 3,5 Gy e de 20 Gy. Entre as restantes comparações, verificou-se $p < 0,001$.

Quanto à percentagem de DNA na cauda, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas após irradiação com 3,5 Gy ($p < 0,01$), 6,6 Gy ($p < 0,001$), 20 Gy ($p < 0,001$) e 60 Gy ($p < 0,001$), comparativamente ao controlo. Verificaram-se ainda diferenças significativas entre as irradiações de 0,35 Gy e 3,5 Gy ($p < 0,01$), de 0,35 Gy e 6,6 Gy ($p < 0,001$), de 0,35 Gy e 20 Gy ($p < 0,001$), de 0,35 Gy e 60 Gy ($p < 0,001$), de 3,5 Gy e 60 Gy ($p < 0,001$) e entre 20 Gy e 60 Gy ($p < 0,001$).

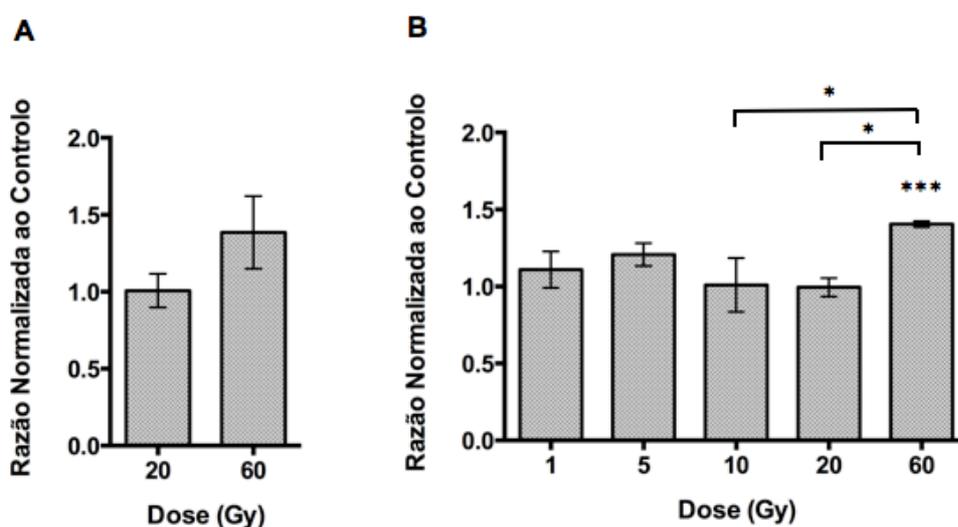
Por fim, no que diz respeito ao momento da cauda, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas após irradiação com 3,5 Gy ($p < 0,001$), 6,6 Gy ($p < 0,001$), 20 Gy ($p < 0,001$) e 60 Gy ($p < 0,001$), comparativamente ao controlo. Verificaram-se ainda diferenças significativas ($p < 0,001$) entre todas as condições testadas, excepto entre 3,5 Gy e 6,6 Gy, entre 3,5 Gy e 20 Gy e entre 6,6 Gy e 20 Gy, nas quais não se verificaram diferenças significativas.

4.3.5 Stresse Oxidativo

Para avaliar os efeitos do tratamento com iodo-131 ao nível da produção de espécies reativas de oxigénio e de defesas antioxidantes na linha celular TFK-1, recorreu-se à técnica de citometria de fluxo. Assim, avaliou-se a produção intracelular de peróxidos, de radical superóxido e de glutathiona reduzida. A atividade da enzima superóxido dismutase foi também avaliada nesta linha celular, com recurso a um *kit* específico (*SOD Determination Kit*, Sigma Aldrich®).

4.3.5.1 Produção Intracelular de Peróxidos

Os resultados relativos aos níveis intracelulares de peróxidos encontram-se representados nos gráficos da figura 23, obtidos para cada uma das doses de radiação em estudo. Os resultados estão mostrados normalizados em relação ao controlo, determinados 2 horas (figura 23 A) e 48 horas (figura 23 B) após a irradiação com iodo-131. O gráfico C da figura 23 diz respeito à comparação entre as 2 e as 48 horas após irradiação, para as condições homólogas.



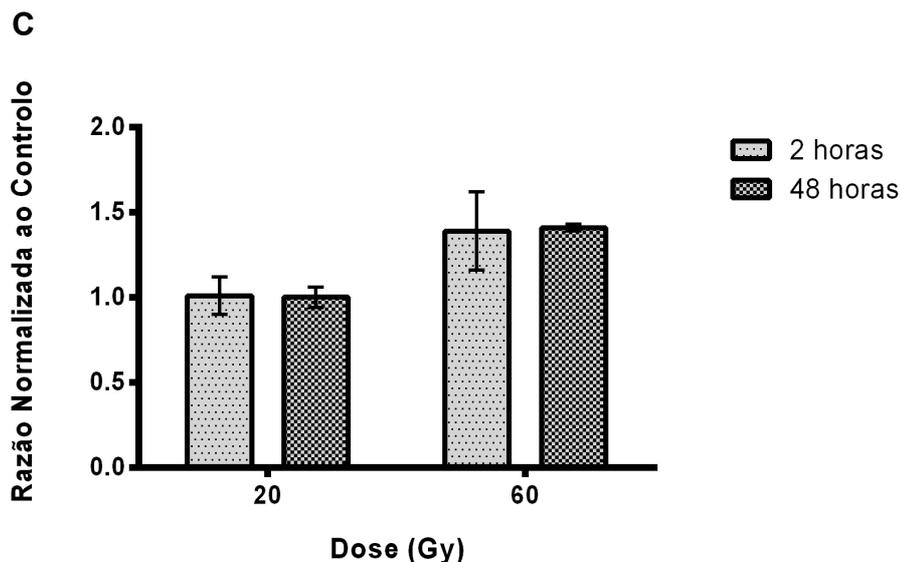


Figura 23 Avaliação da produção intracelular de peróxidos na linha celular TFK-1, 2 horas (A) e 48 horas após irradiação com iodo-131 (B) e comparação entre 2 e 48 horas (C). Para cada condição, os resultados foram normalizados em relação ao controle e exprimem a média e o desvio padrão de 4 experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controle estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$ e *** representa $p < 0,001$.

Pela observação dos resultados apresentados na figura 23 A, verifica-se que 2 horas após a irradiação com 20 Gy com recurso ao iodo-131, a concentração de peróxidos intracelulares se mantém semelhante à verificada no controle, apresentando uma tendência para aumentar na condição de 60 Gy. Quarenta e oito horas após a irradiação (figura 23 B), a expressão de peróxidos intracelulares determinada para as doses entre 1 Gy e 20 Gy também não varia significativamente em relação ao controle, aumentando apenas significativamente para a dose de radiação de 60 Gy ($p < 0,001$). Verificam-se ainda diferenças significativas entre as condições de 10 Gy e de 60 Gy ($p < 0,05$) e entre os 20 Gy e os 60 Gy ($p < 0,05$).

Entre os dois tempos a que a análise foi realizada (gráfico C), não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as condições homólogas (20 Gy e 60 Gy).

4.3.5.2 Produção Intracelular de Radical Superóxido

No que respeita à produção intracelular de radical superóxido, os valores obtidos em cada uma das condições testadas, normalizados em relação ao controlo, estão representados nos gráficos da figura 24, para 2 horas (figura 24 A) e 48 horas (figura 24 B) após a irradiação. O gráfico C da figura 24 diz respeito à comparação entre 2 e 48 horas após irradiação, para as condições homólogas.

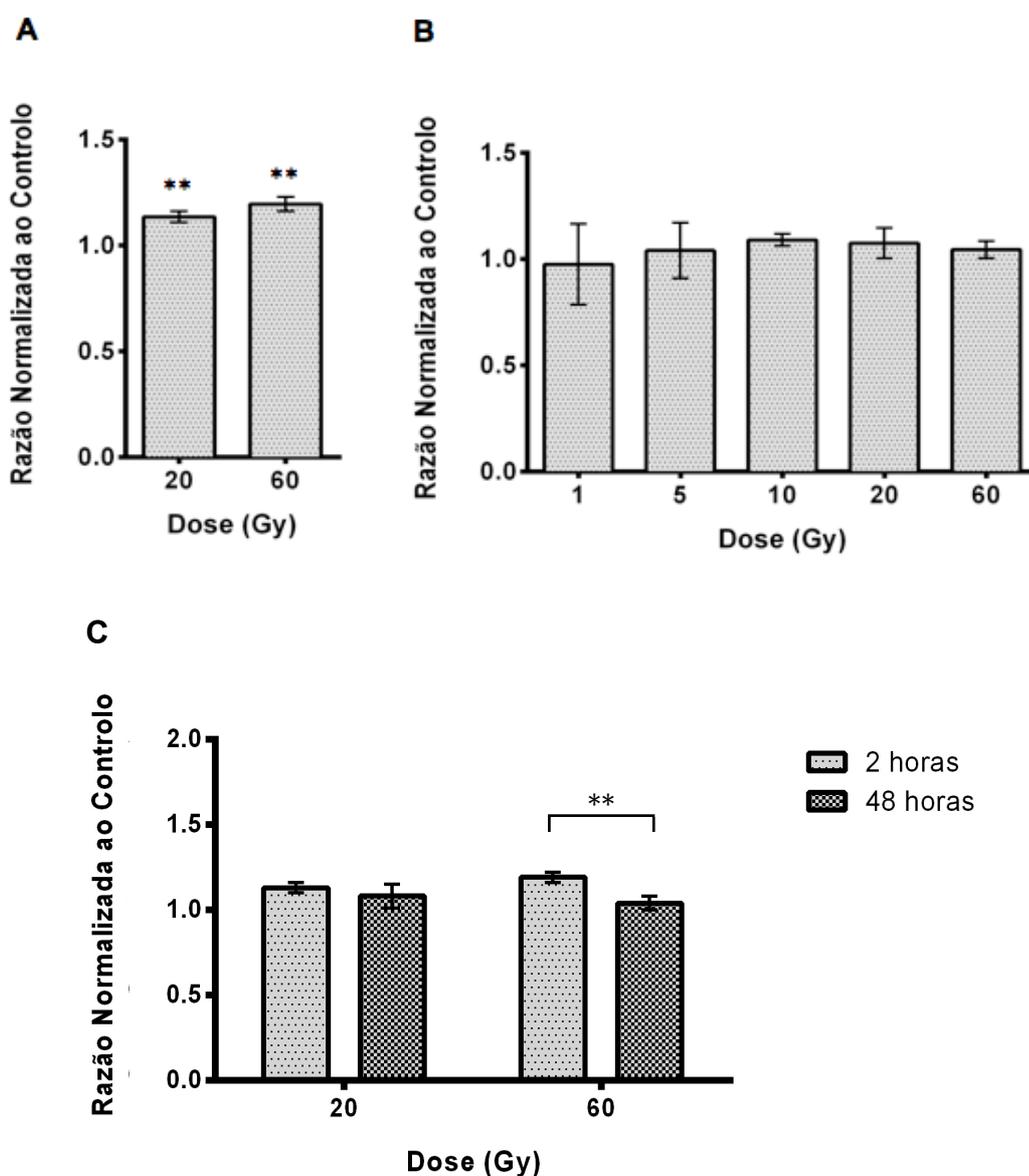


Figura 24 Avaliação da produção intracelular de radical superóxido na linha celular TFK-1, 2 horas (A) e 48 horas após irradiação com iodo-131 (B) e comparação entre 2 e 48 horas (C). Para cada condição, os resultados foram normalizados em relação ao controlo e exprimem a média e o

desvio padrão de 4 experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com **, que representa $p < 0,01$.

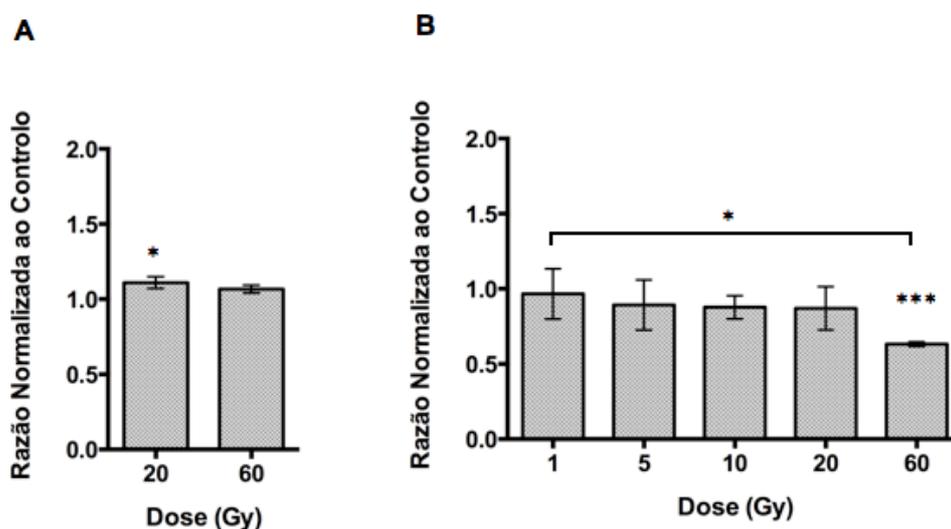
De acordo com o gráfico A da figura 24, é possível observar que 2 horas após a irradiação, a concentração de radical superóxido se encontra significativamente aumentada relativamente ao controlo, quer para a condição de 20 Gy ($p < 0,01$) quer de 60 Gy ($p < 0,01$), sendo ligeiramente superior para a dose mais elevada.

No entanto, 48 horas após o tratamento (gráfico B), não se verificaram diferenças significativas na produção desta ROS, entre os resultados obtidos para as condições testadas e as células controlo.

Entre as 2 e as 48 horas após a irradiação (gráfico C), ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa de radical superóxido entre as condições de 60 Gy ($p < 0,01$).

4.3.5.3 Expressão Intracelular de Glutaciona Reduzida

Relativamente à produção de glutaciona reduzida, os resultados obtidos foram normalizados em relação ao controlo e estão representados nos gráficos da figura 25, para cada uma das condições testadas, 2 horas (figura 25 A) e 48 horas (figura 25 B) após a irradiação. O gráfico C da figura 25 diz respeito à comparação entre 2 e 48 horas após irradiação, para as condições homólogas.



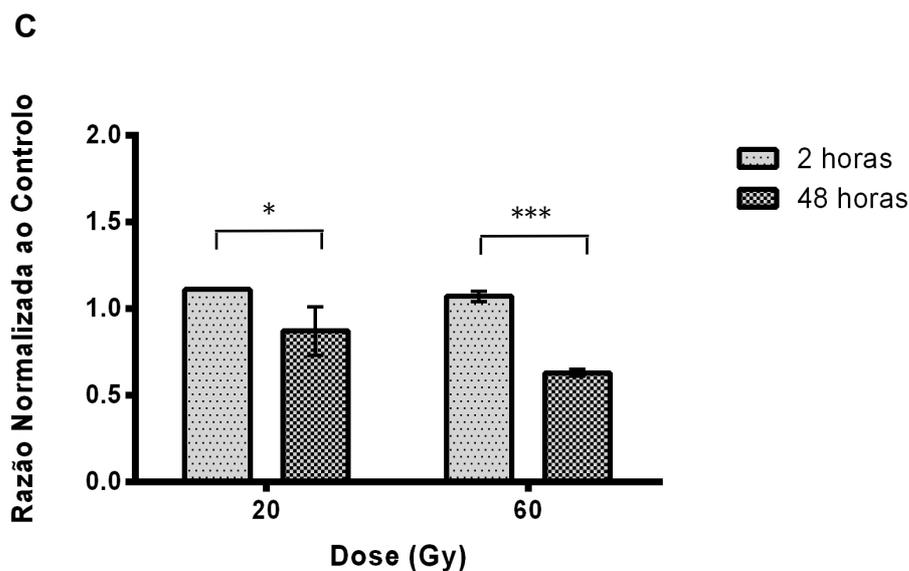


Figura 25 Avaliação da expressão intracelular de glutatona reduzida na linha celular TFK-1, 2 horas (A) e 48 horas após irradiação com iodo-131 (B) e comparação entre 2 e 48 horas (C). Para cada condição, os resultados foram normalizados em relação ao controle e exprimem a média e o desvio padrão de 4 experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controle estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$ e *** representa $p < 0,001$.

Como se pode observar pelo gráfico A da figura 25, 2 horas após irradiação, a concentração de glutatona reduzida é ligeiramente superior à observada no controle, ocorrendo diferenças com significado estatístico na condição de irradiação com 20 Gy ($p < 0,05$) e parecendo diminuir da dose de 20 Gy para 60 Gy, ainda que essa diminuição não tenha significado estatístico.

Quarenta e oito horas após a irradiação (gráfico B), a produção desta defesa antioxidante é inferior à verificada no controle, diminuindo ligeira e progressivamente, à medida que se aumenta a dose de radiação. Verifica-se uma diminuição significativa da expressão de GSH da condição controle para 60 Gy ($p < 0,001$) e entre as doses de 1 Gy e 60 Gy ($p < 0,05$).

Entre as 2 e as 48 horas após a irradiação (gráfico C), verificaram-se diferenças estatisticamente significativas para as duas condições homólogas, ou seja, uma diminuição da produção de GSH quer para a condição de 20 Gy ($p < 0,05$) quer para a de 60 Gy ($p < 0,001$).

4.3.5.4 Expressão Intracelular de Superóxido Dismutase

Neste trabalho foi ainda avaliada a atividade da enzima SOD em resposta ao tratamento com iodo-131. Na figura 26 encontram-se representados os gráficos relativos aos resultados de atividade desta enzima por concentração de proteína, 2 horas (figura 26 A) e 48 horas (figura 26 B) após a irradiação com recurso a iodo-131. O gráfico C da figura 26 diz respeito à comparação entre 2 e 48 horas após irradiação, para as condições homólogas.

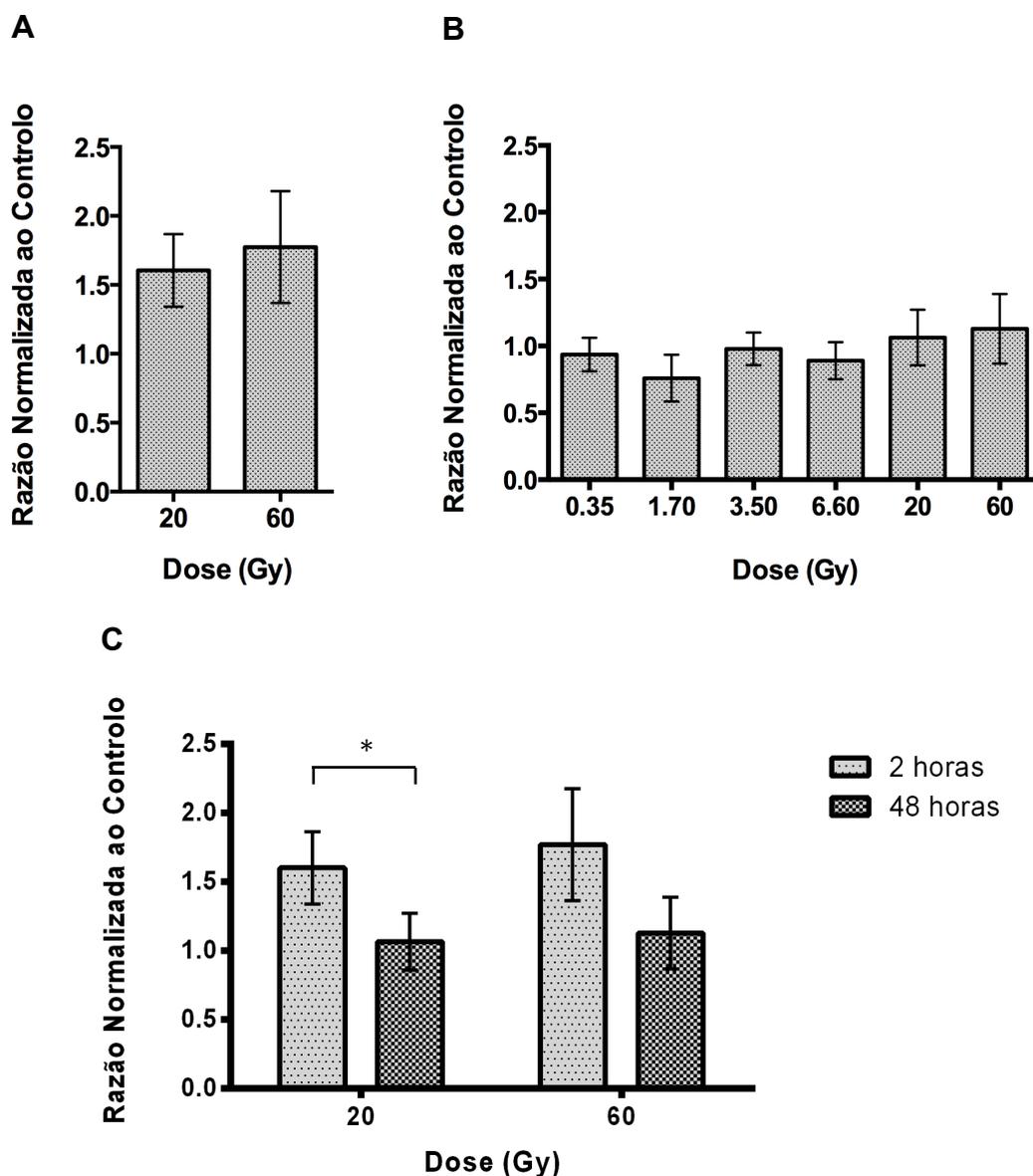


Figura 26 Avaliação da atividade de superóxido dismutase na linha celular TFK-1, 2 horas (A) e 48 horas após irradiação com iodo-131 (B) e comparação entre 2 e 48 horas (C). Para cada

condição, os resultados foram normalizados em relação ao controlo e exprimem a média e o desvio padrão de 4 experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *, que representa $p < 0,05$.

Como se pode verificar no gráfico A da figura 26, 2 horas após irradiação, a concentração de superóxido dismutase tende a aumentar face à observada no controlo, observando-se também uma tendência para um aumento da dose de 20 Gy para 60 Gy.

Quarenta e oito horas após a irradiação (gráfico B) e até à condição de 6,6 Gy, a produção desta defesa antioxidante é inferior à verificada no controlo, não se verificando diferenças estatisticamente significativas. Para além disto, verifica-se ainda um aumento ligeiro e progressivo, à medida que se aumenta a dose de radiação, a partir da dose de 6,6 Gy, mas mais uma vez, sem significado estatístico. Para as doses de 20 Gy e de 60 Gy, a atividade de SOD é superior à verificada na condição controlo.

Entre as 2 e as 48 horas após a irradiação (gráfico C), verifica-se uma diminuição estatisticamente significativa nas condições de 20 Gy ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O colangiocarcinoma é uma neoplasia maligna rara, com origem na árvore biliar. No que respeita à terapêutica, a única abordagem curativa é a remoção cirúrgica, mas esta só é possível num número reduzido de doentes. Além disso, mesmo quando esta abordagem é utilizada, a taxa de recorrência é elevada. Por outro lado, em doentes inoperáveis, têm sido utilizadas a quimioterapia e a radioterapia, mas estas têm geralmente um papel meramente paliativo. Dada a elevada taxa de mortalidade e o aumento da incidência do CC, torna-se crucial investigar e desenvolver novos métodos de diagnóstico e modalidades terapêuticas para este tumor (30). Recentemente, foi identificada a expressão celular de um transportador de sódio e de iodo, o NIS, em amostras histológicas humanas de CC, sendo que a expressão desta molécula em células tumorais poderá vir a representar um alvo para novos métodos de diagnóstico e terapêutica. De facto, é sabido que a expressão de NIS a nível celular e principalmente no caso da proteína se localizar na membrana plasmática, permite a captação de iodo e os seus radioisótopos. Posto isto, podemos estar perante uma nova abordagem terapêutica para o CC, através de radioterapia metabólica com iodo-131 (30), terapêutica esta que é já uma abordagem bem estabelecida para o tratamento de doenças benignas e tumores da tiróide (127).

Deste modo, o objetivo principal deste trabalho de investigação consistiu em avaliar o potencial terapêutico da radioterapia metabólica com iodo-131, numa linha celular humana de colangiocarcinoma.

Assim, para este trabalho experimental utilizou-se uma linha celular de colangiocarcinoma extrahepático, a TFK-1, com o intuito de perceber qual seria o efeito da terapêutica com iodo-131 a nível tumoral.

Uma vez que para ocorrer captação de iodo, é necessária a expressão de NIS ao nível da membrana celular (128), começou-se por avaliar, por imunofluorescência, a expressão deste transportador nas células TFK-1. A avaliação da expressão endógena de NIS permitiu verificar que esta linha celular expressa este transportador particularmente a nível membranar. Relativamente à expressão de NIS em resposta à

irradiação com iodo-131 numa dose de 20 Gy, pelos resultados preliminares obtidos podemos verificar que a expressão de NIS nas células TFK-1 tende a aumentar, quer na totalidade quer a nível membranar, sendo que nesta localização, a quantidade de proteína se parece aproximar da total. No que se refere à expressão de NIS no CC, os nossos resultados são os primeiros a demonstrar a expressão desta proteína num tumor extrahepático. De facto, os estudos publicados até à data são referentes à expressão de NIS apenas em tumores intrahepáticos e indicam que mais de 98% dos CCs estudados expressam NIS. Ainda dentro dos resultados obtidos pelos mesmos autores, os colangiócitos normais adjacentes também expressam esta proteína, mas em menor quantidade que as células tumorais (29,30). De salientar que existem evidências de que a expressão de NIS nos CCs intrahepáticos é induzida por membros da família da P53, nomeadamente pela P63 e P73 e que a ativação destas proteínas poderá ocorrer em consequência de dano provocado ao DNA (129,130). Curiosamente, as células TFK-1 não expressam P53, o que parece ser uma característica de mais de metade dos casos de CC extrahepático (131). Assim, é possível postular a hipótese de que também nas células TFK-1, após irradiação com iodo-131, ocorrerá dano no DNA e consequente ativação de P63 e/ou de P73 que induzem posteriormente um aumento de expressão de NIS. Contudo, não existem ainda estudos que demonstrem a expressão de P63 ou P73 nesta linha celular, pelo que seria interessante avaliar a presença destas duas proteínas. De salientar ainda que estudos preliminares por nós entretanto realizados parecem mostrar que após irradiação com 20 Gy, a expressão de NIS em colangiócitos normais (linha celular H69) é bastante inferior à verificada nas células tumorais (TFK-1).

Tendo em conta que após a irradiação se verificou elevada expressão de NIS a nível membranar nas células TFK-1, uma condição fundamental para a captação de iodo (128), como já referido, tornou-se pertinente estudar o perfil de captação de iodo-131 nesta linha celular. Podemos constatar, através dos resultados obtidos, que o iodo-131 é de facto captado pelas células TFK-1, apresentando um pico de captação de 1,09% no primeiro minuto de estudo, mantendo-se, à posteriori, aproximadamente constante. Este

resultado está em concordância com a literatura, onde vários trabalhos, em diversos tipos de cancro, demonstram um pico de captação nos primeiros minutos de ensaio e posterior manutenção do influxo (127,132,133). Por outro lado, e tendo em conta que para que a terapêutica com iodo-131 seja eficaz, não basta que as células capturem o radiofármaco mas também que o retenham tempo suficiente para exercer os seus efeitos citotóxicos (32), tornou-se importante estudar também o perfil de retenção de iodo-131 nas células TFK-1. Verificou-se que a retenção deste radioisótopo tende a diminuir até 11 minutos após o início do estudo, atingindo um valor mínimo de 61,78%, que se mantém posteriormente aproximadamente constante. Outros estudos realizados *in vitro*, noutros tipos de cancro, mostraram variadas percentagens de retenção de iodo radioativo, desde uma redução para 30% verificada 2 minutos após o início do estudo, para 20% aos 30 minutos ou para 60% aos 25 minutos (127,132,134). De referir ainda que embora os tecidos extra-tiroideus não possuam capacidade para organificar o iodo-131, o que poderá explicar o efluxo do radiofármaco verificado nas células TFK-1, existem estudos que demonstram que esta terapêutica poderá ser eficaz desde que exista quantidade de radiofármaco e tempo suficientes para que este origine moléculas reativas capazes de danificar as células (128,135).

De seguida, pretendeu-se estudar os efeitos celulares provocados pela irradiação com iodo-131 nas células TFK-1. Com o objetivo de estudar os seus efeitos a nível da sobrevivência celular, procedeu-se ao ensaio clonogénico. Torna-se importante realçar que uma vez que o efeito antiproliferativo do iodo-131 é, segundo alguns autores, dependente não só da interação entre moléculas transportadoras e do tempo de retenção, mas também da atividade captada durante a irradiação celular (133,135), se testaram diferentes doses de iodo-131. Para traçar uma curva de dose-efeito foi também fundamental a utilização de diferentes doses de radiofármaco, o que permitiu, posteriormente, o cálculo da dose letal média. Assim, com os resultados obtidos através do ensaio clonogénico, foi possível construir uma curva de sobrevivência celular ajustada a um modelo linear quadrático, em concordância com a literatura onde se encontra

descrito que a correlação dose-efeito após irradiação com isótopos com baixo LET, em particular o iodo-131, é geralmente do tipo linear quadrático (136). De facto, pode-se constatar uma diminuição gradual e significativa da sobrevivência das células TFK-1, à medida que se aumenta a dose de radiação, sendo que a dose letal média quando se usa o iodo-131, ou seja, a dose de radiação necessária para reduzir a sobrevivência destas células para 50% é de 6,94 Gy. Com uma dose de radiação mais alta (60 Gy), verificou-se apenas cerca de 30% de sobrevivência. A diminuição de sobrevivência celular à medida que se aumenta a dose de radiação é de facto um resultado concordante com o que já foi demonstrado por outros autores (127,133). Embora os estudos referidos tenham sido efetuados em linhas celulares diferentes da utilizada no presente trabalho, não deixam de destacar a capacidade que este radioisótopo tem em reduzir a proliferação das células TFK-1. Contudo, não se encontrou, nestas ou noutras publicações, a dose letal média obtida para outros tipos de células tumorais em resposta a irradiação com iodo-131. Os resultados obtidos levam a crer que a percentagem de iodo-131 que é efetivamente retida por estas células, é suficiente para causar um efeito terapêutico dependente da dose. Contudo, tendo em conta a não expressão de P53 por estas células (131), a inibição da sua proliferação após irradiação deverá ocorrer através de uma via independente da P53 o que, segundo alguns autores, poderá ocorrer por indução da P21 (131,137,138) em consequência do aumento de ROS (139). Estudos preliminares com a linha celular H69, uma linha de colangiócitos normais, por nós realizados demonstraram que, aparentemente, a irradiação com iodo-131 não afeta a sua taxa de sobrevivência, verificando-se valores de 117%, 82% e 106%, para as doses de 3,5 Gy, 20 Gy e 60 Gy, respetivamente. Neste sentido, os resultados obtidos com a linha celular TFK-1 (nas quais se verificou um fator de sobrevivência de 72%, 39% e 32%, respetivamente) tornam-se bastante promissores, uma vez que a diminuição gradual do fator de sobrevivência com o aumento da dose de radiação nas células tumorais face ao aparente efeito nulo nas células normais, nos indica que poderemos estar perante uma captação de iodo-131 pelas células tumorais e consequente efeito seletivo. Embora a

expressão de NIS nas células H69 após irradiação seja aparentemente inferior à verificada nas TFK-1, o que por si só poderá explicar as diferenças de efeito do iodo-131 nos dois tipos de células analisados, poderão existir outras explicações para o facto. Por exemplo, foi proposto que a pendrina, para além do NIS, possibilita a captação de iodo. Esta molécula é conhecida pela sua função de extrusar iodo na tiróide, contudo, em tecidos extra-tiroideus, foi demonstrada a sua ação contrária, ao mediar o influxo de iodo para o interior das células (10). Neste sentido, tornar-se-ia interessante avaliar o papel desta molécula na captação de iodo-131 nas células TFK-1.

O ensaio clonogénico apenas permite aferir acerca da sobrevivência e proliferação celular, não fornecendo qualquer tipo de informação relativamente ao tipo de morte celular ou participação de ROS, entre outros. Assim, com o objetivo de reforçar os resultados obtidos através do ensaio clonogénico e também verificar o efeito do iodo-131 a curto prazo, avaliou-se a viabilidade e tipos de morte celular induzidos, 48 horas após irradiação. Através desta análise, verificou-se uma diminuição gradual da viabilidade celular, à medida que se aumentou a dose de radiação, acompanhada por um aumento progressivo de indução de morte celular por apoptose. Este resultado vai de encontro a vários estudos encontrados na literatura, noutros tipos de cancro, que indicam a indução de apoptose como consequência dos efeitos da radiação ionizante e, em particular, da irradiação com iodo-131, de forma dependente da dose (135,137,138,140).

Posteriormente, pretendeu-se averiguar se a via mitocondrial estaria envolvida na ativação da morte celular por apoptose, pelo que se avaliou a expressão de BAX, BCL-2 e citocromo c, bem como o potencial de membrana mitocondrial em resposta ao tratamento com iodo-131. Os estudos da expressão de BAX e BCL-2 permitiram verificar uma tendência para o aumento progressivo de expressão da proteína pró-apoptótica BAX e diminuição gradual da anti-apoptótica BCL-2, com consequente tendência para o aumento progressivo da razão BAX/BCL-2, à medida que se aumenta a dose de radiação até aos 20 Gy, o que corrobora o aumento progressivo de apoptose descrito anteriormente. Dados que também corroboram os resultados por nós obtidos

demonstram que a irradiação com iodo-131 diminui a proliferação celular e induz apoptose com aumento da razão BAX/BCL-2 e consequente atividade de caspase 3, ou seja, através da ativação da via intrínseca/mitocondrial da apoptose (135). Ainda dentro dos resultados obtidos, após irradiação com 60 Gy, os valores da BAX, da BCL-2 e da razão BAX/BCL-2 alteram-se e ficam semelhantes aos obtidos no controlo. Tal poderá dever-se a uma alteração das moléculas pró-apoptóticas e/ou anti-apoptóticas que são ativadas, ou mesmo a uma alteração da via de indução da apoptose. Em concordância com esta hipótese, Okaro e colaboradores demonstraram que a linha celular TFK-1 tal como a maioria dos CCs não expressa BCL-2 mas sim BCL-XL e MCL-1 (141), o que também poderá explicar o facto de terem sido obtidos valores de BCL-2 muito baixos comparativamente aos observados para a BAX. Por outro lado, está descrito que não só a via intrínseca é ativada após irradiação com iodo-131, mas também a via extrínseca poderá ter um papel importante na indução da apoptose, tendo sido demonstrada a ativação das caspases 8 e 9 após irradiação (137,138). Estas são possíveis explicações para os resultados obtidos, porém são necessários estudos adicionais que confirmem estas hipóteses.

Os resultados de BAX/BCL-2 obtidos em resposta à irradiação com iodo-131 são corroborados com os de citocromo c. De facto, o estudo da expressão de citocromo c também revelou uma tendência para o aumento progressivo de expressão à medida que se aumenta a dose de radiação. Tais evidências parecem indicar a libertação de citocromo c para o citoplasma, associada à ativação da via mitocondrial da apoptose. É ainda possível postular a hipótese de que após irradiação com 60 Gy, para além da via mitocondrial continuar a ser induzida, possivelmente envolvendo outras moléculas que não a BAX e a BCL-2, também a via extrínseca pode ser ativada, em concordância com as hipóteses apresentadas anteriormente.

Os resultados referentes à análise do potencial de membrana vêm de encontro aos resultados anteriormente discutidos, uma vez que se verificou uma tendência para a despolarização, de forma gradual, à medida que se aumentou a dose de radiação.

Efetivamente, quando não existem fatores de crescimento ou glicose, necessários para manter o potencial de membrana mitocondrial, este diminui, permitindo a libertação de citocromo c e iniciando assim o processo apoptótico (142). Estes resultados são concordantes com a literatura, onde existem trabalhos que descrevem que a indução de apoptose após irradiação com iodo-131 é, pelo menos em parte, dependente da mitocôndria, e acompanhada por um aumento da ativação da BAX, disrupção do potencial de membrana mitocondrial, libertação de citocromo c e ativação de caspase 3 (137).

Tendo em conta os resultados anteriormente discutidos, tornou-se pertinente estudar possíveis alterações do ciclo celular na linha celular TFK-1, uma vez que a indução de apoptose em resposta ao dano celular pode resultar da ineficácia de mecanismos de reparação acionados durante o bloqueio da sua progressão (143). Curiosamente, não se verificaram diferenças entre a quantidade de células em cada fase do ciclo celular, 48 horas após irradiação com iodo-131 e nas culturas controlo. Embora este resultado seja algo inesperado, é concordante com o descrito por Eriksson e colaboradores, que demonstraram que a irradiação com iodo-131 induz um bloqueio na fase G2/M, detetável 24 horas após a irradiação (138). Contudo, segundo os autores esta paragem é transiente, uma vez que as células têm a capacidade de reentrar no ciclo e de progredirem para a mitose, sendo que às 48 horas, a percentagem de células em cada fase do ciclo tende a aproximar-se novamente da verificada no controlo. Tal evidência deve-se ao facto de após a irradiação ocorrer uma diminuição inicial do índice mitótico que é posteriormente compensada com o seu aumento, resultando em mitoses catastróficas (138). Estas hipóteses vão de encontro aos resultados por nós obtidos, uma vez que perante mitoses catastróficas, as células acabam por induzir um processo apoptótico (138). Por outro lado, a P53 e a P21 são necessárias para manter o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, pelo que células que não expressem P53, como é o caso das TFK-1 (131), poderão ter a capacidade de escapar a este bloqueio (138).

No sentido de aprofundar os efeitos celulares provocados pela irradiação com iodo-131, nomeadamente a nível da molécula de DNA, procedeu-se ao ensaio do cometa, no qual as células, quando lesadas, apresentam um arrastamento semelhante à cauda de um cometa e nas quais o dano é proporcional ao tamanho e conteúdo de DNA dessa cauda. Tendo em conta a observação de lâminas correspondentes ao controlo positivo da técnica, nas quais se verificou a presença de cometas em todas as experiências, é possível afirmar que a eletroforese decorreu sempre em boas condições e que os resultados obtidos para cada condição são fidedignos. Assim, os resultados obtidos permitiram verificar um aumento progressivo e significativo de todos os parâmetros estudados, nomeadamente da área do cometa, do comprimento da cauda, da percentagem de DNA na cauda e do momento da cauda. Deste modo, podemos constatar que à medida que se aumenta a dose de radiação, aumenta também a extensão dos danos causados na molécula de DNA, podendo estes dever-se ao efeito direto da irradiação ou ao efeito indireto, via stresse oxidativo. De facto, está descrito na literatura que as consequências do tratamento com iodo-131 se poderão dever a efeitos diretos ou indiretos da radiação, sendo que em ambos os casos, o principal alvo é a molécula de DNA (66). De referir que existem evidências de que os efeitos da radiação com partículas β ou outras formas de radiação ionizante, dependem do número e extensão dos danos letais e sub-letais provocados ao DNA, sendo que as quebras nas duas cadeias do DNA, a forma mais tóxica de dano nesta molécula, são a primeira causa de morte celular induzida pela radiação ionizante (128,144).

Como já referido, os efeitos da radiação ionizante que incluem danos no DNA, lípidos e proteínas, ocorrem não só em consequência direta da energia da radiação, mas também através da produção de espécies reativas de oxigénio, derivadas da radiólise da água. De facto, quando se encontram em elevada concentração, as ROS conseguem facilmente reagir com lípidos membranares, causando alterações de permeabilidade da membrana; com o DNA, causando dano e instabilidade genómica; com proteínas, causando modificações oxidativas que podem resultar em enzimas cataliticamente

menos ativas ou proteínas mais susceptíveis a degradação proteolítica, podendo em último caso, induzir processos de morte celular como a apoptose ou a necrose (139). Assim, pretendeu-se averiguar se os efeitos provocados pelo iodo-131 anteriormente discutidos se deveriam à produção de peróxidos intracelulares e/ou radical superóxido, bem como a expressão de glutathiona reduzida e superóxido dismutase. A análise foi feita a dois tempos diferentes, 2 e 48 horas após a irradiação, uma vez que, por um lado geralmente as ROS têm um tempo de meia-vida curto (130) mas, por outro, o estudo dos efeitos celulares do iodo-131 foram realizados 48 horas após irradiação. Duas horas após irradiação com iodo-131, verifica-se uma tendência para o aumento de peróxidos intracelulares para a dose de radiação mais elevada, um aumento de radical superóxido em ambas as condições testadas, um aumento de GSH na condição de 20 Gy, bem como uma tendência para o aumento de expressão de SOD em ambas as condições testadas. O aumento do radical superóxido, acompanhado pelo aparente aumento de SOD, pode resultar da conversão de radical superóxido numa outra ROS menos reativa mas com capacidade de difusão através de membranas, o peróxido de hidrogénio (130). De facto, e em concordância, verifica-se que também ocorre um aumento da expressão de peróxidos intracelulares, que poderão ter um efeito lesivo ou podem ser convertidos em espécies ainda mais lesivas, como o radical hidroxilo, através da reação de Fenton (130). Por outro lado, verifica-se uma tentativa de compensar a produção de ROS por parte da célula, aumentando a produção de GSH. De facto, por ação da glutathiona peroxidase, são necessárias duas moléculas de GSH para neutralizar uma molécula de peróxido de hidrogénio, convertendo-o em água (130).

Às 48 horas após a irradiação, verifica-se uma expressão aumentada de peróxidos intracelulares para a dose de radiação mais elevada, uma diminuição de GSH para a mesma condição e uma tendência para o aumento de SOD nas condições de 20 Gy e 60 Gy, não se verificando quaisquer diferenças relativamente ao radical superóxido. Relativamente a estes resultados, não seria de esperar elevados níveis de expressão de ROS e de defesas antioxidantes, uma vez que como já foi referido, estas têm um tempo

de vida muito curto. Em concordância, não se verificaram diferenças na expressão de radical superóxido e apenas uma diminuição de GSH após irradiação com 60 Gy, não tendo havido quaisquer diferenças de expressão com as doses mais baixas. Contudo, é ainda possível verificar uma aparente expressão aumentada de SOD e uma expressão significativamente aumentada de peróxidos intracelulares, o que nos permite considerar que, por um lado, a conversão de radical superóxido em peróxido de hidrogénio é um processo contínuo e que, por outro, a expressão de GSH observada não é suficiente para controlar o stresse oxidativo gerado. Em concordância, comparando os resultados obtidos 2 e 48 horas após a irradiação, verificou-se uma diminuição da expressão do radical superóxido após irradiação com 60 Gy, com uma diminuição da expressão de GSH, após irradiação com 20 Gy e 60 Gy. De uma forma geral, e também corroborando os resultados de ROS obtidos, existem na literatura evidências de que as radiações de baixo LET, como é o caso das emitidas pelo iodo-131, induzem dano no DNA geralmente de forma indireta, através da formação de radicais livres. Deste modo podemos postular a hipótese de que, pelo menos parte do dano verificado através do ensaio cometa, se deverá ao aumento destas espécies, sendo no entanto necessários mais estudos que comprovem esta relação. Por outro lado, se a ação das ROS no núcleo celular é determinante para a lesão do DNA, no citoplasma, o aumento de concentração destas moléculas resulta em dano de proteínas e/ou lípidos e interferência em vias de crescimento e morte celular. Deste modo, a exposição aguda a este tipo de radioisótopos pode resultar em dano severo de macromoléculas críticas para a viabilidade celular e na formação de outras ROS pela mitocôndria o que, em conjunto, poderá induzir diretamente senescência, lesões degenerativas ou programas de morte celular (145,146). No que respeita à indução de apoptose, está descrito que os efeitos das ROS podem conduzir à ativação tanto da via intrínseca como da extrínseca, tendo neste último caso, a capacidade de alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial, em concordância com os resultados da avaliação do potencial de membrana mitocondrial (146). Curiosamente, foi demonstrado em colangiócitos que os baixos níveis de BCL-2 e

consequente aumento de apoptose, se podem dever a uma diminuição da expressão de GSH (147), o que poderá hipoteticamente ocorrer também no CC, em concordância com a diminuição da sua expressão observada 48 horas após a irradiação.

Concluindo, os resultados descritos anteriormente parecem indicar que o iodo-131 é captado através do NIS e retido tempo suficiente nas células TFK-1 para que induza danos severos no DNA, possivelmente através da produção de ROS, resultando na indução de morte celular programada por apoptose, pelo menos em parte através da via mitocondrial, de forma dependente da dose aplicada.

6. CONCLUSÕES

Ao longo deste trabalho experimental, cujo objetivo principal consistiu em avaliar o efeito citotóxico da radioterapia metabólica com iodo-131, foi avaliada uma linha celular de tumor extrahepático (TFK-1).

A expressão de NIS na linha celular TFK-1 foi avaliada através de estudos de imunofluorescência, que permitiram concluir que estas células expressam a proteína, em particular a nível membranar. Após irradiação com iodo-131 na dose de 20 Gy, verificou-se uma maior quantidade de expressão membranar face às células controlo. Por outro lado, estudos preliminares com as células H69, igualmente após irradiação com 20 Gy, indicam que a expressão de NIS é bastante inferior à verificada nas células TFK-1.

A realização de estudos de captação e de retenção com a linha celular TFK-1, permitiram comprovar a captação de iodo-131 para o interior das células e que a sua retenção é superior a 60%.

Através do ensaio clonogénico foi possível avaliar a longo prazo, o efeito do iodo-131 na sobrevivência das células TFK-1. A irradiação com este radiofármaco mostrou ser notavelmente eficaz a diminuir o fator de sobrevivência destas células. De acordo com resultados preliminares, este radioisótopo demonstrou exercer pequena alteração na taxa de sobrevivência das células H69.

A análise de viabilidade celular permitiu concluir que nas células TFK-1 tende a diminuir à medida que se aumenta a dose de radiação, sendo que a via de morte celular predominantemente ativada é a apoptose, corroborada com uma tendência para o aumento da razão BAX/BCL-2, disrupção do potencial de membrana mitocondrial e consequente libertação de citocromo c.

Contudo, não foi possível verificar alterações do ciclo celular em resposta à irradiação com iodo-131, face às células não irradiadas.

De acordo com os resultados obtidos com o ensaio cometa, a irradiação com iodo-131 permite infligir danos ao nível da cadeia de DNA das células TFK-1, aumentando de severidade de forma dependente da dose.

A análise da produção de ROS e da expressão de defesas antioxidantes permitiu concluir que tanto o radical superóxido como os peróxidos intracelulares têm um papel no dano celular induzido pelo iodo-131, parecendo ocorrer, por ação da SOD, a conversão de radical superóxido em peróxido de hidrogénio.

Em suma, os resultados apresentados e discutidos ao longo desta dissertação, apontam a radioterapia metabólica com iodo-131 como uma possível nova abordagem terapêutica para o CC, sendo no entanto necessário proceder a mais estudos que confirmem a sua eficácia.

7. PERSPETIVAS FUTURAS

No início deste trabalho experimental, propusemo-nos averiguar se a radioterapia metabólica com iodo-131 poderia representar uma nova abordagem terapêutica para o CC, tendo demonstrado que a irradiação com este radiofármaco diminui a sobrevivência das células TFK-1. Verificamos também que a sua utilização causa danos celulares severos e que induzem morte celular por apoptose. No entanto, ao longo deste trabalho, outras questões pertinentes foram surgindo mas por impossibilidade de responder a todas elas, aqui ficam sugestões de estudos futuros que poderão melhorar o conhecimento sobre a eficácia desta abordagem terapêutica no CC.

No que respeita ao melhoramento da eficácia deste tratamento, seria interessante perceber se existem outros transportadores que captem o iodo para o interior das células TFK-1. Como referido anteriormente, a pendrina seria uma molécula a considerar, uma vez que também já foi indicada como responsável pela captação de iodo em células epiteliais (135). Por outro lado, foi demonstrado que o ácido 4,4'-diisotiocianostilbeno-2,2'-disulfónico, um bloqueador de canais aniónicos, permite aumentar e reter por mais tempo o iodo-131 (127), pelo que se torna pertinente avaliar o seu efeito na captação e retenção de iodo-131 pelas células TFK-1.

De modo a clarificar os mecanismos envolvidos nos efeitos do iodo-131, algumas sugestões foram apresentadas ao longo da discussão. Adicionalmente, no que se refere à morte celular induzida pelo iodo-131, será de grande relevância avaliar a ativação de moléculas efetoras da via extrínseca da apoptose, de modo a comprovar a sua participação neste mecanismo, bem como a expressão de outras moléculas relacionadas com a via mitocondrial, como a BCL-XL e a MCL-1, previamente associadas à morte celular por apoptose no CC (141). Seria também de todo o interesse avaliar outros tipos de morte possivelmente induzidos pela irradiação com iodo-131, como é o caso da autofagia, já descrita como consequência dos efeitos da radiação ionizante (90).

Em relação à expressão de ROS e de defesas antioxidantes, seria interessante avaliar a sua produção em resposta à irradiação com iodo-131, 2 horas após a irradiação, comparando os resultados com os obtidos às 48 horas, para as diferentes doses. Por

outro lado, de modo a confirmar a hipótese de que a SOD converte o radical superóxido em peróxido de hidrogénio após irradiação com iodo-131, seria importante avaliar as suas expressões num tempo intermédio entre as 2 e as 48 horas. Ainda, uma vez que existem outras espécies não estudadas, como o radical hidroxilo, a glutathiona peroxidase, a glutathiona redutase e a catalase, cuja avaliação poderia ajudar a esclarecer o mecanismo envolvido nos efeitos mediados pelo iodo-131, torna-se pertinente num futuro próximo, avaliar possíveis alterações da sua produção.

Posteriormente, seria importante continuar os estudos com a linha celular H69 e testar outras linhas celulares de CC. De facto, a avaliação de uma linha celular de CC extrahepático que expressasse P53 permitiria averiguar a importância desta proteína na severidade dos danos celulares causados pelo iodo-131. Por outro lado, a utilização de linhas celulares de outras localizações, nomeadamente de tumores intrahepáticos, permitiria comparar os efeitos do iodo-131 nas diversas localizações do tumor.

De salientar ainda que para dar continuidade aos estudos *in vitro* realizados, se torna extremamente relevante a realização de estudos *in vivo* que comprovem os resultados obtidos com as linhas celulares.

Uma vez que os únicos estudos sobre a expressão de NIS em CCs foram realizados em tumores intrahepáticos, seria pertinente avaliar a expressão deste transportador de iodo também em amostras histológicas de tumores extrahepáticos, de modo a tentar perceber se na sua maioria, estes de facto expressam NIS ao nível da membrana celular. Uma vez que nem todos os tumores intrahepáticos expressam o NIS a nível membranar (29,30), não permitindo a captação de iodo-131 e portanto a eficácia da radioterapia metabólica, seria também de todo o interesse estudar em linhas celulares com esta característica, a indução ou o aumento do transporte de NIS para a membrana celular, verificando se desta forma, a terapêutica teria efeito.

Por fim, tendo em conta que o NIS permite a captação não apenas de isótopos radioativos do iodo mas também outros radionúclidos, como o rénio-188, e que já existem alguns estudos que demonstram que este radioisótopo é mais eficaz que o iodo-131 na

diminuição da sobrevivência de algumas linhas celulares, ainda que captado em menor percentagem (132,134), poderia ser também considerado, num próximo estudo, testar a sua ação antiproliferativa no CC.

BIBLIOGRAFIA

1. Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011). Global Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. **61**(2): p. 69–90.
2. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Recuperado em 14 de Março de 2014 de <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
3. Razumilava N, Gores G (2013). Classification, Diagnosis, and Management of Cholangiocarcinoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. **11**(1): p. 13–21.
4. Wiazzane N, Chauffert B, Ghiringhelli F (2013). Retrospective analysis of survival benefits of chemotherapy for metastatic or non-resectable intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. **37**(6): p. 614-8.
5. Fava G, Lorenzini I (2012). Molecular Pathogenesis of Cholangiocarcinoma. *International Journal of Hepatology*.
6. Gatto M, Alvaro D (2010). New insights on cholangiocarcinoma. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. **2**(3): p. 136–45.
7. Fava G (2010). Molecular mechanisms of cholangiocarcinoma. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. **1**(1): p. 12–22.
8. Marsh R, Alonzo M, Bajaj S, Baker M, Elton E, Farrell T, Gore R, Hall C, Nowak J, Roy H, Shaikh A, Talamonti M (2012). Comprehensive Review of the Diagnosis and Treatment of Biliary Tract Cancer 2012. Part I: Diagnosis-Clinical Staging and Pathology. *Journal of Surgical Oncology*. **106**(3): p. 332–8.
9. Dhanasekaran R, Hemming A, Zendejas I, George T, Nelson D, Soldevila-Pico C, Firpi R, Morelli G, Clark V, Cabrera R (2013). Treatment outcomes and prognostic factors of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncology Reports*. **29**: p. 1259–67.
10. Ciombor K, Goff L (2013). Current Therapy and Future Directions in Biliary Tract Malignancies. *Current Treatment Options in Oncology*. **14**(3): p. 337-49.
11. Tyson G, El-Serag H (2011). Risk Factors of Cholangiocarcinoma. *Hepatology*. **54**(1): p. 173–84.
12. Sia D, Hoshida Y, Villanueva A, Roayaie S, Ferrer J, Tabak B, Peix J, Sole M, Tovar V, Alsinet C, Cornella H, Klotzle B, Fan J, Cotsoglou C, Thung S, Fuster J, Waxman S, Garcia-Valdecasa J, Bruix J, Schwartz M, Beroukhim R, Mazzaferro V, Llovet J (2013). Integrative Molecular Analysis of Intrahepatic Cholangiocarcinoma Reveals 2 Classes That Have Different Outcomes. *Gastroenterology*. **144**: p. 829–40.
13. Charbel H, Al-Kawas F (2012). Cholangiocarcinoma treatment. *Current Gastroenterology Reports*. **14**(6): p. 528–33.
14. Mosconi S, Beretta G, Labianca R, Zampino M, Gatta G, Heinemann V (2009). Cholangiocarcinoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. **69**: p. 259–70.

15. Ustundag Y, Bayraktar Y (2008). Cholangiocarcinoma: A compact review of the literature. *World Journal of Gastroenterology*. **14**(42): p. 6458-66.
16. Goodman Z (2007). Neoplasms of the liver. *Modern Pathology*. **20**(Suppl 1): S49-60.
17. Cholangiocarcinoma Defined. Recuperado em 10 de Dezembro de 2013 de <http://www.cholangiocarcinoma.org/definition.htm>.
18. Charbel H, Al-Kawas F (2011). Cholangiocarcinoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, and Diagnosis. *Current Gastroenterology Reports*. **13**(2): p. 182-7.
19. Meza-Junco J, Montano-Loza A, Ma M, Wong W, Sawyer M, Bain V (2010). Cholangiocarcinoma: Has there been any progress? *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*. **24**(1): p. 52-7.
20. Skipworth J, Damink S, Imber C, Bridgewater J, Pereira S, Malago M (2011). Surgical, Neo-Adjuvant and Adjuvant Management Strategies in Biliary Tract Cancer. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. **34**(9): p. 1063-78.
21. Hammill C, Wong L (2008). Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Malignancy of Increasing Importance. *Journal of the American College of Surgeons*. **207**(4): p. 594-603.
22. Malaguarnera G, Giordano M, Paladina I, Rando A, Uccello M, Basile F, Biondi A, Carnazzo S, Alessandria I, Mazzarino C (2011). Markers of bile duct tumors. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. **3**(4): p. 49-59.
23. Friman S (2011). Cholangiocarcinoma - Current treatment options. *Scandinavian Journal of Surgery*. **100**: p. 30-4.
24. Petrowsky H, Wildbrett P, Husarik D, Hany T, Tam S, Jochum W, Clavien P (2006). Impact of integrated positron emission tomography and computed tomography on staging and management of gallbladder cancer and cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology*. **45**(1): p. 43-50.
25. Gatto M, Bragazzi M, Semeraro R, Napoli C, Gentile R, Torrice A, Gaudio E, Alvaro D (2010). Cholangiocarcinoma: update and future perspectives. *Digestive and liver Disease*. **42**(4): p. 253-60.
26. Balcer-Kubiczek E (2012). Apoptosis in Radiation Therapy: A Double-Edged Sword. *Experimental Oncology*. **34**(3): p. 277-85.
27. Gerber D, Chan T (2008). Recent Advances in Radiation Therapy. *American Family Physician*. **78**(11): p. 1254-62.
28. Halperin E, Wazer D, Perez C, Brady L. *Perez and Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology*. Sixth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
29. Liu B, Hervé J, Bioulac-Sage P, Valogne Y, Roux J, Yilmaz F, Boisgard R, Guettier C, Calès P, Tavitian B, Samuel D, Clerc J, Bréchet C, Faivre J (2007). Sodium

- Iodide Symporter is expressed at the Preneoplastic Stages of Liver Carcinogenesis and in Human Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology*. **132**: p. 1495–503.
30. Kim J, Han S, Lee S, Baek Y, Kim H, Kim J, Jeong J, Roh Y, Kim Y, Park B, Kwon H, Cho J, Nam K (2012). Sodium Iodide Symporter and Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome Ten Expression in Cholangiocarcinoma Analysis with Clinicopathological Parameters. *Gut and Liver*. **6**(3): p. 374–80.
 31. Kogai T, Brent G (2012). The sodium iodide symporter (NIS): Regulation and approaches to targeting for cancer therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*. **135**: p. 355–70.
 32. Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P (2006). A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications. *European Journal of Endocrinology*. **155**: p. 495–512.
 33. Kogai T, Taki K, Brent G (2006). Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*. **13**: p. 797–826.
 34. Dohán O, Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter C, Carrasco N (2003). The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Characterization, Regulation, and Medical Significance. *Endocrine Reviews*. **24**: p. 48–77.
 35. Chung J (2002). Sodium Iodide Symporter: its role in nuclear medicine. *The Journal of Nuclear Medicine*. **43**(9): p. 1188–200.
 36. Beyer S, Lakshmanan A, Liu Y, Zhang X, Wapnir I, Smolenski A, Jhiang S (2011). KT5823 Differentially Modulates Sodium Iodide Symporter Expression, Activity, and Glycosylation between Thyroid and Breast Cancer Cells. *Endocrinology*. **152**(3): p. 782–92.
 37. Ahn B (2012). Sodium Iodide Symporter for Nuclear Molecular Imaging and Gene Therapy: from bedside to bench and back. *Theranostics*. **2**(4): p. 392–402.
 38. Altorjay A, Dohán O, Szilágyi A, Paroder M, Wapnir I, Carrasco N (2007). Expression of the Na⁺/I⁻ symporter (NIS) is markedly decreased or absent in gastric cancer and intestinal metaplastic mucosa of Barrett esophagus. *BMC Cancer*. **7**: 5.
 39. Jhiang S, Cho J, Ryu K, DeYoung B, Smanik P, McGaughy V, Fischer A, Mazzaferri E (1998). An Immunohistochemical Study of Na⁺/I⁻ Symporter in Human Thyroid Tissues and Salivary Gland Tissues. *Endocrinology*. **139**(10): p. 4416–9.
 40. Gaertner F, Rohde F, Mueller J, Blechert B, Janssen K, Essler M (2009). Endogenous expression of the sodium iodide symporter mediates uptake of iodide in murine models of colorectal carcinoma. *International Journal of Cancer*. **125**: p. 2783–91.
 41. Kang D, Lee H, Choi P, Lee K, Roh M (2009). Sodium/iodide symporter expression in primary lung cancer and comparison with glucose transporter 1 expression. *Pathology International*. **59**: p. 73–9.

42. Mitchell A, Manley S, Morris J, Powell K, Bergert E, Mortimer R (2001);. Sodium Iodide Symporter (NIS) Gene Expression in Human Placenta. *Placenta*. **22**: p. 256–8.
43. Lacroix L, Mian C, Caillou B, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, Bidart J (2001). Na⁺/I⁻ symporter and Pendred syndrome gene and protein expressions in human extra-thyroidal tissues. *European Journal of Endocrinology*. **144**: p. 297–302.
44. Spitzweg C, Dutton C, Castro M, Bergert E, Goellner J, Heufelder A, Morris J (2001). Expression of the sodium iodide symporter in human kidney. *Kidney International*. **59**: p. 1013–23.
45. Tazebay U, Wapnir I, Levy O, Dohán O, Zuckier L, Zhao Q, Deng H, Amenta P, Fineberg S, Pastelli R, Carrasco N (2000). The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nature Medicine*. **6**(8): p. 871–8.
46. Bidart J, Lacroix L, Evain-Brion D, Caillou B, Lazar V, Frydman R, Bellet D, Filetti S, Schlumberger M (2000). Expression of Na⁺/I⁻ symporter and Pendred syndrome genes in trophoblast cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **85**(11): p. 4367–72.
47. Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Katoh R, Kawaoi A, Muramatsu A (1998). Increased Expression of the Sodium/Iodide Symporter in Papillary Thyroid Carcinomas. *The Journal of Clinical Investigation*. **101**(7): p. 1296–300.
48. Wapnir I, Rijn M, Nowels K, Amenta P, Walton K, Montgomery K, Greco R, Dohán O, Carrasco N (2003). Immunohistochemical Profile of the Sodium/Iodide Symporter in Thyroid, Breast, and Other Carcinomas Using High Density Tissue Microarrays and Conventional Sections. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **88**(4): p. 1880–8.
49. Wapnir I, Goris M, Yudd A, Dohán O, Adelman D, Nowels K, Carrasco N (2004). The Na⁺/I⁻ Symporter Mediates Iodide Uptake in Breast Cancer Metastases and Can Be Selectively Down-Regulated in the Thyroid. *Clinical Cancer Research*. **10**: p. 4294–302.
50. Russo D, Scipioni A, Durante C, Ferretti E, Gandini L, Maggisano V, Paoli D, Verrienti A, Costante G, Lenzi A, Filetti S (2011). Expression and localization of the sodium/iodide symporter (NIS) in testicular cells. *Endocrine*. **40**: p. 35–40.
51. Castro M, Bergert E, Goellner J, Hay I, Morris J (2001). Immunohistochemical analysis of Sodium Iodide Symporter expression in Metastatic Differentiated Thyroid Cancer: correlation with radioiodine uptake. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **86**(11): p. 5627–32.
52. Navarra M, Micali S, Lepore S, Cesinaro A, Celano M, Sighinolfi M, Gaetani C, Filetti S, Bianchi G, Russo D (2010). Expression of the Sodium/Iodide Symporter in Human Prostate Adenocarcinoma. *Urology*. **75**: p. 773–8.
53. Chatterjee S, Malhotra R, Varghese F, Bukhari A, Patil A, Budrukkar A, Parmar V, Gupta S, De A (2013). Quantitative Immunohistochemical Analysis Reveals Association between Sodium Iodide Symporter and Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer. *PLoS One*. **8**: p. 1–9.

54. Stanciu A (2012). Radionuclides in Targeted Therapy of Cancer. *Revue Roumaine de Chimie*. **57**: p. 5–13.
55. Parthasarathy K, Crawford E (2002). Treatment of Thyroid Carcinoma: Emphasis on high-dose ¹³¹I outpatient therapy. *Journal of Nuclear Medicine Technology*. **30**(4): p. 165–71.
56. Kassis A, Adelstein S (2005). Radiobiologic Principles in Radionuclide Therapy. *The Journal of Nuclear Medicine*. **46**(1Suppl 1): S4–12.
57. Kassis A (2008). Therapeutic Radionuclides: Biophysical and Radiobiologic Principles. *Seminars in Nuclear Medicine*. **38**: p. 358–66.
58. Wyszomirska A (2012). Iodine-131 for therapy of thyroid diseases. Physical and biological basis. *Nuclear Medicine Review*. **15**(2): p. 120–3.
59. Clarke S (2010). Radioiodine Therapy in Differentiated Thyroid Cancer: a nuclear medicine perspective. *Clinical Oncology*. **22**: p. 430–7.
60. Woodrum D, Gauger P (2005). Role of ¹³¹I in the Treatment of Well Differentiated Thyroid Cancer. *Journal of Surgical Oncology*. **89**: p. 114–21.
61. Robbins R, Schlumberger M (2005). The Evolving Role of ¹³¹I for the Treatment of Differentiated Thyroid Carcinoma. *The Journal of Nuclear Medicine*. **46**(Suppl 1): S28–37.
62. Scholz I, Cengic N, Baker C, Harrington K, Maletz K, Bergert E, Vile R, Goke B, Morris J, Spitzweg C (2005). Radioiodine therapy of colon cancer following tissue-specific sodium iodide symporter gene transfer. *Gene Therapy*. **12**(3): p. 272–80.
63. Klutz K, Willhauck M, Dohmen C, Wunderlich N, Knoop K, Zach C, Senekowitsch-Schmidike R, Gildehaus F, Ziegler S, Furst S, Goke B, Wagner E, Ogris M, Spitzweg C (2011). Image-guided tumor-selective radioiodine therapy of liver cancer after systemic nonviral delivery of the sodium iodide symporter gene. *Human Gene Therapy*. **22**(12): p. 1563–74.
64. Spitzweg C, Connor M, Bergert E, Tindall D, Young C, Morris J (2000). Treatment of Prostate Cancer by Radioiodine Therapy after Tissue-specific Expression of the Sodium Iodide Symporter. *Cancer Research*. **60**: p. 6526–30.
65. Barton K, Stricker H, Elshaikh M, Pegg J, Cheng J, Zhang Y, Karvelis K, Lu M, Movsas B, Freytag S (2011). Feasibility of adenovirus-mediated hNIS gene transfer and ¹³¹I radioiodine therapy as a definitive treatment for localized prostate cancer. *Molecular Therapy*. **19**(7): p. 1353–9.
66. Selzer E, Hebar A (2012). Basic principles of molecular effects of irradiation. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. **162**(3-4): p. 47–54.
67. Lomax M, Folkes L, O'Neill P (2013). Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clinical Oncology*. **25**(10): p. 578-85.

68. Joiner M, Kogel A. *Basic Clinical Radiobiology*. Fourth edition. London: Hodder Arnold, 2009.
69. Ross G (1999). Induction of cell death by radiotherapy. *Endocrine-Related Cancer*. **6**: p. 41–4.
70. Manda G, Nechifor M, Neagu T (2009). Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies. *Current Chemical Biology*. **3**: p. 342–66.
71. Lauber K, Ernst A, Orth M, Herrmann M, Belka C (2012). Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy. *Frontiers in Oncology*. **2**(116): p. 1–14.
72. Nowsheen S, Yang E (2012). The intersection between DNA Damage Response and Cell Death Pathways. *Experimental Oncology*. **34**(3): p. 243–54.
73. Valerie K, Yacoub A, Hagan M, Curiel D, Fisher P, Grant S, Dent P (2007). Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Molecular Cancer Therapeutics*. **6**: p. 789–801.
74. Morgan W, Sowa M (2005). Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **102**(40): p. 14127–8.
75. Deckbar D, Jeggo P, Löbrich M (2011). Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **46**(4): p. 271–83.
76. Yu H (2012). Typical cell signaling response to ionizing radiation: DNA damage and extranuclear damage. *Chinese Journal of Cancer Research*. **24**(2): p. 83–9.
77. Rodier F, Campisi J, Bhaumik D (2007). Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Research*. **35**(22): p. 7475–84.
78. Wen X, Wu J, Wang F, Liu B, Huang C, Wei Y (2013). Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy for human diseases. *Free Radical Biology & Medicine*. **65**: p. 402-10.
79. Birben E, Sahiner U, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*. **5**: p. 9–19.
80. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart M (2013). Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Research Reviews*. **12**: p. 376–90.
81. Matés JM, Segura J, Alonso F, Márquez J (2012). Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Archives of Toxicology*. **86**(11): p. 1649–65.
82. Mori I, Schroeder J (2004). Reactive Oxygen Species Activation of Plant Ca²⁺ Channels. A Signaling Mechanism in Polar Growth, Hormone Transduction, Stress Signaling, and Hypothetically Mechanotransduction. *Plant Physiology*. **135**: p. 702–8.
83. Wong R (2011). Apoptosis in cancer : from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. **30**:87.

84. Delbridge A, Valente L, Strasser A (2012). The Role of the Apoptotic Machinery in Tumor Suppression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **4**(11):a008789.
85. Surova O, Zhivotovsky B (2012). Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene*. **32**(33):p. 3789-97.
86. Baskar R, Lee K, Yeo R, Yeoh K (2012). Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Sciences*. **9**(3): p. 193–9.
87. Chaabane W, User S, El-gazzah M, Jaksik R, Sajjadi E, Rzeszowska-Wolny J, Los M (2013). Autophagy , Apoptosis , Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*. **61**: p. 43–58.
88. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang F, Zhou T, Liu B, Bao J (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis , autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*. **45**: p. 487–98.
89. Galluzzi L, Vitale I, Vacchelli E, Kroemer G (2011). Cell death signaling and anticancer therapy. *Frontiers in Oncology*. **1**:5.
90. Zois C, Koukourakis M (2009). Radiation-induced autophagy in normal and cancer cells. *Autophagy*. **5**(4): p. 442–50.
91. Coates P (2013). In Brief : cell senescence. *The Journal of Pathology*. **230**: p. 239–40.
92. Dimri G (2005). What has senescence got to do with cancer ? *Cancer Cell*. **7**(6): p. 505–12.
93. Elmore S (2007). Apoptosis: A review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. **35**(4): p. 495–516.
94. Saraste A, Pulkki K (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*. **45**: p. 528–37.
95. Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y (2011). Apoptosis : why and how does it occur in biology ? *Cell Biochemistry and Function*. **29**: p. 468–80.
96. Apoptosis, Necroptosis & Autophagy. Recuperado em 20 de Dezembro de 2013 de http://www.imgenex.com/antibody_list.php?id=109.
97. Wen X, Lin Z, Liu B, Wei Y (2012). Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*. **45**(3): p. 217–24.
98. MacFarlane M, Williams A (2004). Apoptosis and disease: a life or death decision. *European Molecular Biology Organization Reports*. **5**(7): p. 674–8.
99. Proskuryakov S, Gabai V (2010). Mechanisms of Tumor Cell Necrosis. *Current Pharmaceutical Design*. **16**: p. 56–68.

100. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko D (2013). Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. *Immunity*. **38**: p. 209–23.
101. Dunai Z, Bauer P, Mihalik R (2011). Necroptosis: Biochemical, Physiological and Pathological Aspects. *Pathology and Oncology Research*. **17**: p. 791–800.
102. Parkhitko A, Favorova O, Henske E (2013). Autophagy: Mechanisms, Regulation, and Its Role in Tumorigenesis. *Biochemistry*. **78**(4): p. 466–80.
103. Chen N, Karantza-wadsworth V (2009). Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1793**(9):1516–23.
104. Lorin S, Hamaï A, Mehrpour M, Codogno P (2013). Autophagy regulation and its role in cancer. *Seminars in Cancer Biology*. **23**(5): p. 361-79.
105. Palumbo S, Comincini S (2012). Autophagy and Ionizing Radiation in Tumors : The "Survive or Not Survive" Dilemma. *Journal of Cellular Physiology*. **228**: p. 1–8.
106. Macintosh R, Ryan K (2013). Autophagy in tumour cell death. *Seminars in Cancer Biology*. **23**(5): p. 344-51.
107. Murphy D. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. First Edition. New York: Wiley-Liss, Inc., 2001.
108. Collier A (2012). Thyrotoxicosis and radioiodine therapy: Does the dose matter? *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. **16**(Suppl 2): S147–9.
109. Fedr R, Pernicová Z, Slabáková E, Straková N, Bouchal J, Grepl M, Kozubík A, Soucek K (2013). Automatic cell cloning assay for determining the clonogenic capacity of cancer and cancer stem-like cells. *Cytometry Part A*. **83**(5): p. 472–82.
110. Rafahi H, Orłowski C, Georgiadis G, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis T (2011). Clonogenic assay: adherent cells. *Journal of Visualized Experiments*. (49): pii: 2573.
111. Ramamoorthy M, Vaughan C, Deb S, Deb S (2013). Measurement of Chemosensitivity and Growth Rate in p53 Expression Cells. In: p53 Protocols, *Methods in Molecular Biology*. **962**: p. 127–33.
112. Jayakumar S, Bhilwade H, Pandey B, Sandur S, Chaubey R (2012). The potential value of the neutral comet assay and the expression of genes associated with DNA damage in assessing the radiosensitivity of tumor cells. *Mutation Research*. **748**(1-2): p. 52–9.
113. Bajpayee M, Kumar A, Dhawan A (2013). The Comet Assay: Assessment of in Vitro and in Vivo DNA Damage. In: Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*. **1044**: p. 325–45.
114. Anderson D, Laubenthal J (2013). Analysis of DNA Damage via Single-Cell Electrophoresis. In: DNA Electrophoresis: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*. **1054**: p. 209–18.

115. Barnard R (2012). Flow cytometry: a flexible tool for biomarker research. *Bioanalysis*. **4**(20): p. 2471–83.
116. Givan A (2011). Flow Cytometry: An Introduction. In: Flow Cytometry Protocols, *Methods in Molecular Biology*. **699**: p. 1–29.
117. Kumar N, Borth N (2012). Flow-cytometry and cell sorting: an efficient approach to investigate productivity and cell physiology in mammalian cell factories. *Methods*. **56**(3): p. 366–74.
118. Demchenko A (2012). The change of cellular membranes on apoptosis: fluorescence detection. *Experimental Oncology*. **34**(3): p. 263–8.
119. Johnson S, Nguyen V, Coder D (2013). Assessment of cell viability. *Current Protocols in Cytometry*. **64**: 9.2.1-9.2.26.
120. Kim T, Zhao Y, Barber M, Kuharsky D, Yin X (2000). Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**(50): p. 39474–81.
121. Petros A, Olejniczak E, Fesik S (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1644**(2-3): p. 83–94.
122. Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z (2012). Cytometry of Apoptosis. Historical Perspective and New Advances. *Experimental Oncology*. **34**(3): p. 255–62.
123. Cottet-Rousselle C, Ronot X, Leverve X, Mayol J (2011). Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry Part A*. **79**(6): p. 405–25.
124. Armstrong J, Whiteman M (2007). Measurement of reactive oxygen species in cells and mitochondria. *Methods in Cell Biology*. **80**: p. 355–77.
125. Hedley D, Chow S (1994). Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry. *Cytometry*. **15**(4): p. 349–58.
126. SOD Determination kit Datasheet. Recuperado em 10 de Janeiro de 2014 de <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/19160dat.pdf>.
127. Chen L, Altmann A, Mier W, Eskerski H, Leotta K, Guo L, Zhu R, Haberkorn U (2006). Radioiodine Therapy of Hepatoma using Targeted Transfer of the Human Sodium/Iodide Symporter Gene. *Journal of Nuclear Medicine*. **47**(5): p. 854–62.
128. Hingorani M, Spitzweg C, Vassaux G, Newbold K, Melcher A, Pandha H, Vile R, Harrington K (2010). The Biology of the Sodium Iodide Symporter and its Potential for Target Gene Delivery. *Current Cancer Drug Targets*. **10**(2): p. 242–67.
129. Guerrieri F, Piconese S, Lacoste C, Schinzari V, Testoni B, Valogne Y, Gerbal-Chaloin S, Samuel D, Bréchet C, Faivre J, Levrero M (2013). The sodium/iodide symporter NIS is a transcriptional target of the p53-family members in liver cancer cells. *Cell Death and Disease*. **4**: e807.

130. Landriscina M, Maddalena F, Laudiero G, Esposito F (2009). Adaptation to Oxidative Stress, Chemoresistance, and Cell Survival. *Antioxidants and Redox Signaling*. **11**(11): p. 2701–16.
131. Caca K, Feisthammel J, Klee K, Tannapfel A, Witzigmann H, Wittekind C, Mossner J, Berr F (2002). Inactivation of the INK4A/ARF Locus and P53 in Sporadic Extrahepatic Bile Duct Cancres and Bile Tract Cancer Cell Lines. *International Journal of Cancer*. **97**: p. 481–8.
132. Kang J, Chung J, Lee Y, Shin J, Jeong J, Lee D, Lee M (2004). Establishment of a Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line Highly Expressing Sodium Iodide Symporter for Radionuclide Gene Therapy. *Journal of Nuclear Medicine*. **45**(9): p. 1571–6.
133. Carlin S, Cunningham S, Boyd M, McCluskey A, Mairs R (2000). Experimental targeted radioiodide therapy following transfection of the sodium iodide symporter gene: effect on clonogenicity in both two-and three-dimensional models. *Cancer Gene Therapy*. **7**(12): p. 1529–36.
134. Willhauck M, Samani B, Gildehaus F, Wolf I, Senekowitsch-Schmidtke R, Stark H, Goke B, Morris J, Spitzweg C (2007). Application of ¹⁸⁸Rhenium as an Alternative Radionuclide for Treatment of Prostate Cancer after Tumor-specific Sodium Iodide Symporter Gene Expression. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **92**(11): p. 4451–8.
135. Aranda N, Sosa S, Delgado G, Aceves C, Anguiano B (2013). Uptake and Antitumoral Effects of Iodine and 6-Iodolactone in Differentiated and Undifferentiated Human Prostate Cancer Cell Lines. *Prostate*. **73**(1): p. 31–41.
136. Erselcan T, Sungu S, Ozdemir S, Turgut B, Dogan D, Ozdemir O (2004). Iodine-131 treatment and chromosomal damage: in vivo dose-effect relationship. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. **31**(5): p. 676–84.
137. Friesen C, Lubatschowski A, Kotzerke J, Buchmann I, Reske S, Debatin K (2003). Beta-irradiation used for systemic radioimmunotherapy induces apoptosis and activates apoptosis pathways in leukaemia cells. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. **30**(9): p. 1251–61.
138. Eriksson D, Blomberg J, Lindgren T, Löfroth P, Johansson L, Riklund K, Stigbrand T (2008). Iodine-131 induces Mitotic Catastrophes and activates Apoptotic Pathways in HeLa Hep2 Cells. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. **23**(5): p. 541–9.
139. Barrera G (2012). Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncology*. ID 137289.
140. Watters D (1999). Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis. *Immunology and Cell Biology*. **77**(3): p. 263–71.
141. Okaro A, Deery A, Hutchins R, Davidson B (2001). The expression of antiapoptotic proteins Bcl-2, Bcl-XL, and Mcl-1 in benign, dysplastic, and malignant biliary epithelium. *Journal of Clinical Pathology*. **54**(12): p. 927–32.

142. Gottlieb E, Armour S, Harris M, Thompson C (2003). Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death Differentiation*. **10**(6): p. 709–17.
143. Pucci B, Kasten M, Giordano A (2000). Cell Cycle and Apoptosis. *Neoplasia*. **2**(4): p. 291–9.
144. Neshasteh-Riz A, Koosha F, Mohsenifar A, Mahdavi S (2012). DNA Damage Induced in Glioblastoma Cells by I-131: A Comparison between Experimental Data and Monte Carlo Simulation. *Cell Journal*. **14**(1): p. 25–30.
145. Kiang J, Garrison B, Gorbunov N (2010). Radiation Combined Injury: DNA Damage, Apoptosis, and Autophagy. *Adaptative Medicine*. **2**(1): p. 1–10.
146. Wang J, Yi J (2008). Cancer cell killing via ROS. *Cancer Biology and Therapy*. **7**(12): p. 1875–84.
147. Celli A, Que F, Gores G, LaRusso N (1998). Glutathione depletion is associated with decreased Bcl-2 expression and increased apoptosis in cholangiocytes. *American Journal of Physiology*. **275**(4 Pt 1): G749–57.