

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta conhece 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 in the 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 acknowledgment.

*The process of scientific discovery is, in effect,
a continual flight from wonder.*

Albert Einstein

Agradecimentos

Após a realização desta tese, não poderia deixar de expressar o meu profundo agradecimento a todos os que contribuíram para a concretização da mesma:

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Diretora da Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, por me ter aceite na Unidade de Biofísica e proporcionado o desenvolvimento deste projeto de investigação, pela orientação, por toda a transmissão de conhecimentos e pelas críticas e sugestões que muito contribuíram para este trabalho.

Ao Mestre João Casalta Lopes, co-orientador deste trabalho, pela orientação, pela partilha de conhecimentos, por todos os esclarecimentos de dúvidas, pela dedicação, pelo apoio, pela ajuda no processamento dos resultados e pela sua análise, pelos conselhos na revisão do manuscrito, e, em especial, pela confiança.

À Mestre Mafalda Laranjo, pelo acompanhamento e orientação constantes, pelo apoio e disponibilidade, pela transmissão de conhecimentos, pelas críticas e conselhos fornecidos ao longo da realização desta tese, pela ajuda no processamento dos resultados e na revisão do manuscrito, pelo incentivo, pelo exemplo de responsabilidade, de empenho e de profissionalismo, pela exigência em dar sempre o meu melhor para atingir os meus objetivos.

Ao Professor Doutor António Cabrita, Coordenador do Mestrado Integrado em Patologia Experimental, pela transmissão de conhecimentos, pela colaboração na realização da técnica histológica, pela disponibilidade na avaliação das lâminas de histologia e pelas sugestões; e ao restante corpo docente do Mestrado.

Ao Serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, na pessoa da Dra. Paula Soares, antiga Diretora do Serviço, e da Dra. Margarida Borrego, atualmente responsável pelo Serviço, pela permissão da realização dos tratamentos de radioterapia; a todos os Especialistas em Física Médica pelo apoio e ajuda na execução dos tratamentos, pelo esclarecimento dos procedimentos e de dúvidas, pelo carinho e boa disposição com que sempre me receberam, muito embora a minha presença fosse sinónimo de trabalho acrescido; bem como aos restantes profissionais de saúde do Serviço.

À Unidade de Biologia Molecular Aplicada da Faculdade de Medicina da Universidade Coimbra, na pessoa da Professora Doutora Ana Bela Sarmiento-Ribeiro e na pessoa da Mestre Ana Cristina Gonçalves pela colaboração nos ensaios de citometria de fluxo, que tanto contribuíram para este trabalho.

À Doutora Ana Margarida Abrantes, pelo exemplo de determinação, de responsabilidade e de trabalho, pelos esclarecimentos, sobretudo relacionados com os estudos *in vivo*, pela motivação e pela sua boa disposição.

Aos Mestres Ana Salomé Pires, Ana Catarina Mamede, Ana Brito, Fernando Mendes e Sara Ferreira pelo exemplo de dedicação, pelo esclarecimento de dúvidas, pelo apoio na execução de tarefas, pela partilha de conhecimentos, pelas sugestões, pela boa disposição e sorrisos constantes.

À Mestre Kathleen Santos, por toda a transmissão de conhecimentos, pelo incremento de espírito crítico, pela ajuda na execução de tarefas, pela motivação, pelas gargalhadas e desabafos e, acima de tudo, pela amizade que fomos construindo.

Ao Mestre Ricardo Teixeira, pelo apoio e ajuda na execução de tarefas, pela partilha de conhecimentos, pela boa disposição e pela amizade.

À Cláudia, à Denise, à Filipa, ao Gonçalo, ao Tiago, à Tânia, ao Telmo, à Sara e ao João, por todo o apoio que me deram durante este ano, pela ajuda, por tudo o que aprendi com eles, pelos ótimos momentos juntos e pelo ânimo e força que me transmitiram nos momentos menos bons.

À Rita Silva, ao Eduardo Costa e ao Mestre Ricardo Cabeças, pela ajuda e troca de conhecimentos e pelos bons momentos passados em conjunto.

À Marlene D'Além, por ter sido tão prestável e por me ter auxiliado desde o início do Curso, pelo exemplo de esforço e dedicação, pelo otimismo, pelas horas infinitas a esclarecer dúvidas, pelo estudo em conjunto, pelas confidências, pelos desabafos, pelos maravilhosos momentos partilhados, pelo carinho e preocupação e, sobretudo, pela amizade.

À Filipa Silva, por conseguir ver sempre o lado positivo de todas as situações e me transmitir esse pensamento, pelo exemplo de coragem, determinação e dedicação e por todo o carinho e amizade que tem demonstrado ao longo de tantos anos.

A todos os familiares, amigos e colegas que, de algum modo, contribuíram para o presente trabalho e que, embora não tenham sido denominados, não foram esquecidos.

Ao Francisco, por todo o amor, pela compreensão da minha ausência em tantos momentos, mas sem por isso deixar de me apoiar e de demonstrar o seu orgulho; por ter sempre uma palavra amiga, pelo incentivo e pela confiança.

Ao “Quico” por ser o melhor irmão do mundo.

Aos meus Pais, por serem os melhores pais do mundo e a quem devo tudo, por me apoiarem e incentivarem incondicionalmente, pelo exemplo de esforço e de dedicação que demonstram todos os dias, pela amizade, pelo carinho e pelo amor.

Índice

Resumo	xv
<i>Abstract</i>	xix
Lista de Abreviaturas	xxiii
1. Introdução	1
1.1 Cancro Colorretal	3
1.1.1 Epidemiologia	3
1.1.2 Anatomia, Fisiologia e Histologia do Cólon e do Reto	5
1.1.3 Definição, Localização e Caracterização	7
1.1.4 Carcinogénese, Eventos Moleculares e Fatores de Risco	8
1.1.5 Sinais, Sintomas, Rastreio e Diagnóstico	12
1.1.6 Estadiamento	13
1.1.7 Tratamento	15
1.1.8 Prognóstico	16
1.2 Radioterapia	17
1.2.1 Aplicação da Radioterapia no Cancro Colorretal	18
1.2.2 Combinação com Quimioterapia	19
1.2.3 Fundamentos da Radioterapia	20
1.2.3.1 Mecanismo de ação da radiação ionizante	22
1.2.4 Resposta dos tecidos à radiação	23
1.2.4.1 Apoptose	27
1.2.4.2 Autofagia	28
1.2.4.3 Necrose	28
1.2.4.4 Senescência	29
1.2.4.5 Catástrofe mitótica	29
1.3 Resistência à Radioterapia no Cancro Colorretal	29
2. Objetivos	35
3. Material e Métodos	39
3.1 Estudos <i>In Vitro</i>	41

3.1.1	Caracterização das Linhas Celulares	41
3.1.2	Manutenção Celular	42
3.1.3	Indução de Resistência à Radioterapia	43
3.1.3.1	Avaliação da Resposta das Linhas Celulares à Radioterapia.....	46
3.1.4	Tratamento de Radioterapia e Quimiorradioterapia nas Linhas Celulares Radiossensíveis e Radiorresistentes	48
3.1.4.1	Ensaio do MTT	49
3.1.5	Ensaio Clonogénico.....	51
3.1.6	Ensaio Cometa	51
3.1.7	Citometria de Fluxo	54
3.1.8	Eletroforese Bidimensional.....	60
3.2	Estudos <i>In Vivo</i>	66
3.2.1	Modelo Experimental.....	66
3.2.2	Desenvolvimento de Xenotransplantes	67
3.2.3	Desenho Experimental.....	67
3.3	Estudos <i>Ex Vivo</i>	69
3.3.1	Colheita de Sangue	69
3.3.2	Colheita de Tumor	70
3.3.2.1	Extração de proteínas	70
3.3.2.2	Análise histológica.....	70
3.4	Análise Estatística dos Dados.....	72
4.	Resultados	73
4.1	Indução de Resistência à Radioterapia	75
4.2	Avaliação das Linhas Celulares após Tratamento com Radioterapia e com Quimiorradioterapia	77
4.2.1	Atividade Metabólica.....	77
4.2.2	Sobrevivência Celular	81
4.2.3	Avaliação dos danos no DNA	85
4.2.4	Avaliação de viabilidade e de tipos de morte celular	91
4.2.5	Avaliação do estado oxidação-redução e das defesas antioxidantes	94

4.2.5.1	Produção intracelular de peróxidos.....	94
4.2.5.2	Produção intracelular do anião superóxido	97
4.2.5.3	Expressão de glutathiona reduzida	100
4.2.5.4	Avaliação do potencial da membrana mitocondrial.....	101
4.3	Avaliação do conteúdo proteico das linhas celulares WiDr e WiDr/10x.....	104
4.4	Estudos <i>In Vivo</i>	107
4.4.1	Avaliação do Crescimento Tumoral	107
4.5	Estudos <i>Ex Vivo</i>	109
5.	Discussão.....	113
6.	Conclusão	129
7.	Referências	133
8.	Anexos	145
8.1	Anexo I.....	147

Resumo

O cancro colorretal constitui o terceiro cancro mais comum e mais mortal em homens e mulheres, em Portugal. O tratamento com quimiorradioterapia é o tratamento padrão para os estádios mais avançados da doença, na medida em que promove a regressão tumoral e diminui o estadiamento T e N. No entanto, verifica-se que muitos doentes não respondem ao tratamento. A resistência à radioterapia tem vindo a ser investigada e têm sido testados diversos fármacos no sentido de sensibilizarem as células tumorais ao tratamento. Contudo, os mecanismos de radiorresistência ainda não são claros e a maioria dos marcadores moleculares sugestivos de radiosensibilidade ou radiorresistência não é utilizada na prática clínica para determinar a terapêutica mais adequada ao doente oncológico. Este estudo teve como objetivos estabelecer linhas celulares humanas de cancro colorretal e estudar a resposta das linhas celulares radiosensíveis e radiorresistentes após tratamento com radioterapia e com quimiorradioterapia *in vitro* e *in vivo*.

Para estudar a radiorresistência, foram utilizadas duas linhas celulares humanas de cancro colorretal, a linha celular C2BBe1 e a linha celular WiDr. A indução de resistência foi feita através da administração semanal da dose de 2 Gy, em frações cumulativas, com um acelerador linear Clinac 600, Varian. Durante a indução de resistência, foi avaliada a resposta à radioterapia das linhas celulares nativas e das linhas celulares derivadas, através da irradiação das células com doses únicas de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 Gy; e obtiveram-se curvas dose-resposta. Estabelecidas as linhas celulares derivadas resistentes à radioterapia, procedeu-se ao estudo da sua resposta, bem como da resposta das linhas celulares nativas, após tratamento com radioterapia (2 e 10 Gy), com quimioterapia (20 µM 5-fluorouracilo) e com quimiorradioterapia (tratamento combinado de 20 µM 5-fluorouracilo e as mesmas doses de radiação dos tratamentos isolados). A atividade metabólica foi avaliada às 24, 48, 72 e 96 horas, através do ensaio do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil)tetrazólio; a sobrevivência celular foi avaliada 12 dias após os tratamentos, com a realização do ensaio clonogénico; os danos no ácido desoxirribonucleico foram avaliados através do ensaio cometa imediatamente após os tratamentos; e a viabilidade, os tipos de morte celular e o stresse oxidativo foram avaliados com recurso a citometria de fluxo, 96 horas após os tratamentos. Para além destas técnicas, procedeu-se à realização de um protocolo de eletroforese bidimensional para avaliar a expressão proteica das linhas celulares WiDr, sensível e resistente à radioterapia. Por fim, estabeleceram-se modelos animais heterotópicos e avaliou-se a resposta dos xenotransplantes das linhas celulares WiDr sensível e resistente à radioterapia após tratamento com quimiorradioterapia (tratamento combinado de 66,6 mg/kg 5-fluorouracilo e 2 ou 10 Gy).

Foi possível estabelecer duas linhas celulares derivadas da linha celular WiDr, WiDr/6x e WiDr/10x, após seis e dez frações cumulativas de 2 Gy, respectivamente. A linha celular C2BBE1 demonstrou possuir resistência intrínseca à radioterapia, não tendo sido possível aumentar essa radiorresistência. O tratamento com radioterapia e quimiorradioterapia produziu efeitos diferentes nas linhas celulares estudadas, sendo que a linha celular C2BBE1 foi maioritariamente afetada após quimiorradioterapia, no que diz respeito à sobrevivência, proliferação e danos no ácido desoxirribonucleico. Por outro lado, apresentou-se resistente aos tratamentos de radioterapia isolada. No que diz respeito às linhas celulares WiDr e derivadas, as últimas demonstraram maior atividade metabólica, sobrevivência e viabilidade celular, sobretudo nos tratamentos com maior dose de radiação. Contudo, não se verificaram diferenças significativas ao nível do stresse oxidativo e as linhas celulares resistentes demonstraram mais danos no ácido desoxirribonucleico do que a linha parental. Verificaram-se diferenças na expressão de proteína entre a linha celular WiDr e a linha celular WiDr/10x. Relativamente aos estudos *in vivo*, foi possível estabelecer dois modelos heterotópicos de cancro colorretal, com xenotransplante das linhas celulares WiDr e WiDr/10x. A comparação entre a resposta dos tumores sensíveis e dos tumores resistentes à radioterapia não revelou diferenças.

Afigura-se que os estudos *in vitro* e *in vivo* deverão continuar com o intuito de compreender melhor os mecanismos de resistência à radioterapia.

Palavras-chave: cancro colorretal, quimiorradioterapia, resistência à radioterapia, marcadores moleculares

Abstract

Colorectal cancer is the third more common and more fatal cancer in Portugal for both men and women. Chemoradiotherapy is the standard treatment for locally advanced rectal cancer, since it promotes tumor local control and consequently tumor downstaging. However, many patients do not respond to treatment. Radioresistance has been investigated and several drugs have been tested in order to sensitize tumor cells to radiation. Unfortunately, the mechanisms beyond radioresistance have not been clarified yet and the majority of predictive molecular markers are not used in clinics in order to individualize treatment modalities. This study aimed to establish radioresistant colorectal cancer human cell lines and to evaluate radiotherapy and chemoradiotherapy response of both radiosensitive and radioresistant cell lines *in vitro* and *in vivo*.

Two human colorectal cancer cell lines, WiDr and C2BBe1, were used to study radioresistance. Novel derivatives displaying significant resistance to radiotherapy were established by irradiating both cell lines with cumulative fractions of 2 Gy per week, using a Varian Clinac 600 linear accelerator. *In vitro* response to radiotherapy was assessed by clonogenic assay, after irradiating native and derivative cells with single fractions of 0, 2, 4, 6, 8 e 10 Gy. Plating efficiency was calculated and dose-response curves were obtained. After establishing radioresistant cell lines, the response of both radiosensitive and radioresistant cells was assessed after treatment with radiotherapy alone (2 and 10 Gy), chemotherapy (20 μ M 5-fluorouracil) and chemoradiotherapy (combined treatment of both 20 μ M 5-fluorouracil and the same doses of radiation used in radiotherapy alone). Metabolic activity was measured 24, 48, 72 and 96 hours after treatment using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide salt assay; survival was assessed 12 days after treatment by clonogenic assay; deoxyribonucleic acid damage was evaluated with comet assay immediately after treatment; and viability, cell death and oxidative stress were assessed by flow cytometry. In order to evaluate protein profile of both sensitive and resistant WiDr cell lines, two-dimensional electrophoresis was performed. Finally, the response of both sensitive and resistant WiDr cell lines to chemoradiotherapy (combined treatment of 66.6 mg/kg 5-fluorouracil and 2 or 10 Gy) was assessed *in vivo* after establishing two heterotopic colorectal cancer models.

After six and ten cumulative fractions of 2 Gy, it was possible to establish two radioresistant derivatives of WiDr cell line, WiDr/6x and WiDr/10x, respectively. C2BBe1 cell line showed intrinsic resistance to radiotherapy and it was not possible to increase that radioresistance. Radiotherapy and chemoradiotherapy induced different effects on cell lines. C2BBe1 cell line was mainly affected after chemoradiotherapy in respect of proliferation, cell survival and deoxyribonucleic acid damage. On the other

hand, this cell line proved to be resistant to radiotherapy alone. In concern of native and derivative WiDr cell lines, the radioresistant ones demonstrated superior metabolic activity, cell survival and viability than their native, mainly for treatments with the highest dose of radiation. However, there were no statistically differences between sensitive and resistant cell lines regarding oxidative stress. Besides, radioresistant cells showed higher deoxyribonucleic acid damage than WiDr cell line. Differences in protein profile were observed between WiDr and WiDr/10x cell lines. When it comes to *in vivo* studies, there were no differences between treatment responses of both sensitive and resistant tumor xenografts.

In vitro and *in vivo* studies should continue in order to better understand the mechanisms underlying radioresistance.

Key-words: Colorectal cancer, chemoradiotherapy, radioresistance, molecular markers

Lista de Abreviaturas

An V – Anexina V
APC – *Adenomatous polyposis coli*
ATCC – *American Type Culture Collection*
ATM – Proteína da ataxia telangiectasia mutada
ATP – Adenosina trifosfato
ATR – Proteína cinase relacionada com ataxia telangiectasia
BCL-2 – *B-cell lymphoma 2*
BSA – Albumina sérica de bovino
CCR – Cancro colorretal
CEA – Antígeno carcinoembrionário
CF – Citometria de fluxo
COX-2 – Ciclo-oxigenase 2
D0 – Dia zero do período experimental
Dx – Dia x do período experimental
DCF – 2'-7'-diclorofluoresceína
DCFH₂ – 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína
DCFH₂-DA – 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína acetilada
DHE – Dihidroetídio
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagles's Medium*
DMSO – Dimetil-sulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNA-PKcs – Proteínas cinases dependentes de DNA
DOK3 – *Docking protein 3*
DTT – *DL-Dithiothreitol*
EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*
EUA – Estados Unidos da América
FBS – *Fetal Bovine Serum*
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
GSH – Glutaciona reduzida
GSSG – Glutaciona oxidada
H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio
HE – Hematoxilina e eosina
HLA – Antígenos leucocitários humanos
IP – Iodeto de propídeo
JC-1 – Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,18,3,3-tetraetil-benzimidazol-carbocianina
KRAS – *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
MAPK – *Mitogen-activated protein kinase*

MCC – *Mutated in colorectal carcinoma*
mTOR – *Mammalian target of rapamycin*
MTT – Sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil)tetrazólio
NAD – Dinucleótido de nicotinamida-adenina
PBS – Phosphate buffer saline
PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular
PI3K – *Phosphoinositide 3-kinase*
RNAm - Ácido ribonucleico mensageiro
ROS – *Reactive Oxygen Species*
SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
STAT3 – *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*
TCA – Ácido tricloroacético
TEMED – N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
TGF- β – *Transforming Growth Factor beta*
VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*

1. Introdução

1.1 Cancro Colorretal

O cancro constitui a principal causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda em países em desenvolvimento, sendo um grave problema de saúde pública a nível mundial^{1,2}. De 2008 a 2030, foi projetado um aumento de mortes por cancro de 7,6 milhões para 13 milhões³. Em 2013, apenas nos Estados Unidos, foram estimados 1.660.290 novos casos de cancro e 580.350 mortes por cancro².

O cancro do cólon e do reto, também designado por cancro colorretal (CCR), é uma doença que afecta muitos homens e mulheres e, embora nos últimos anos se tenham verificado progressos na qualidade dos tratamentos, as taxas de incidência e de mortalidade permanecem elevadas¹.

1.1.1 Epidemiologia

Em Portugal, o CCR é o terceiro cancro mais comum e mais mortal em homens e mulheres⁴. A sua incidência e mortalidade, tendo em conta ambos os sexos, é de 14,8% e de 15,7%, respetivamente, e a prevalência em 5 anos é de 15,7%, constituindo o terceiro cancro mais prevalente nesse período, tal como ilustrado na Figura 1⁴.

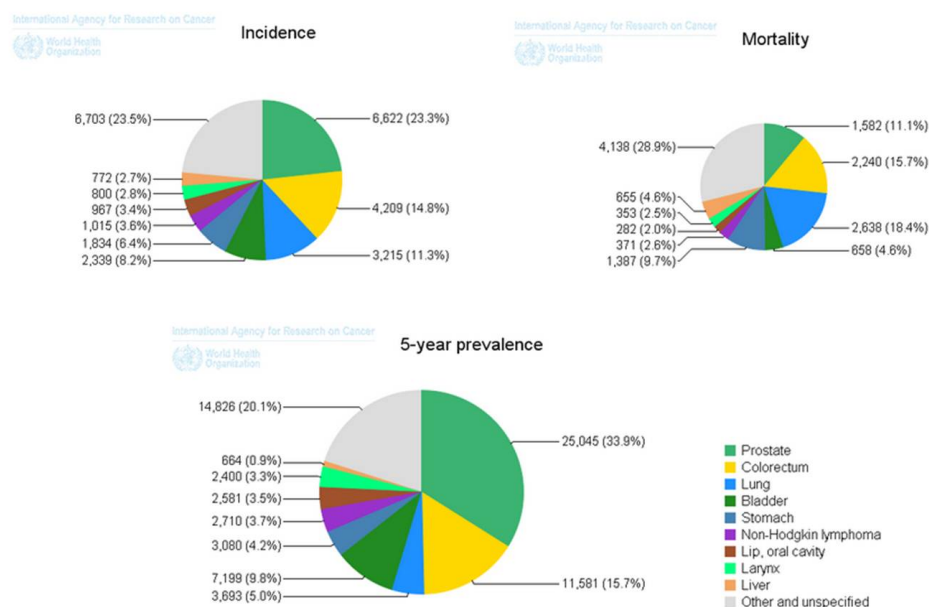


Figura 1 - Taxas de incidência, de mortalidade e de prevalência em 5 anos de cancro em Portugal (CCR representado a amarelo). Adaptado de Globocan, 2012.

Relativamente à mulher, este cancro representa o terceiro cancro mais comum e o segundo mais mortal. A prevalência do cancro em 5 anos é de 14,8%⁴. O CCR afeta 21,4% dos homens, sendo mortal para 14,4%⁴.

Na União Europeia, são diagnosticados anualmente cerca de 300.000 casos de CCR por 500 milhões de cidadãos⁵.

Numa escala mundial, o CCR é o quarto cancro mais comum nos homens e o terceiro nas mulheres, com aproximadamente 1,36 milhões de novos casos e 693.881 mortes estimados em 2012¹. A Figura 2 ilustra a posição ocupada pelo CCR a nível mundial, tendo em conta o género.



Figura 2 - Incidência e mortalidade do cancro no Mundo, incluindo o CCR (ilustrado a amarelo). As imagens à esquerda indicam as percentagens referentes aos homens e à direita as percentagens referentes às mulheres. Adaptado de Globocan, 2012.

Este cancro constitui um problema devido à sua grande incidência⁵. As maiores taxas de incidência verificam-se na Austrália e na Nova Zelândia, Europa e América do Norte, enquanto as taxas mais baixas se encontram em África e na Ásia Central-Sul¹. Estes números são substancialmente superiores nos homens do que nas mulheres¹. A incidência aumenta a partir dos 40 anos e atinge o seu máximo entre os 60 e os 75 anos de idade⁶. No que toca às taxas de mortalidade, o CCR representa a segunda causa de morte por cancro em ambos os sexos, sobretudo em pessoas com mais de 50 anos de idade⁵. A taxa de sobrevivência aos 5 anos é de, aproximadamente, 50%⁷. A metastização hepática e pulmonar constitui a principal causa de morte e ocorre em cerca de 25% dos doentes⁷.

Apesar da redução das taxas de incidência e de mortalidade do CCR nos últimos anos, é necessário mais investimento nesta patologia⁸. Para além disso, nem todos os grupos étnicos estão a beneficiar, de forma equitativa, do controlo e das reduções na incidência do cancro⁸.

A deteção precoce de lesões benignas no cólon e no reto torna o CCR um dos cancros com maior potencial na prevenção, pela remoção de pólipos adenomatosos antes de ocorrer transformação maligna⁹. A incidência de CCR varia de acordo com a situação geográfica, principalmente devido às diferenças que existem nos recursos para a vigilância deste cancro e ao acesso aos cuidados de saúde de cada país/região^{1,10}.

É necessário ter cuidado aquando da análise dos dados epidemiológicos¹¹. Um programa de rastreio pode aumentar a incidência de CCR a curto prazo, através da maior deteção de casos à custa de estádios mais precoces; por outro lado, pode levar à sua redução a longo prazo devido à remoção precoce de pólipos não malignos¹¹. Para além disso, a vigilância diminui a mortalidade por CCR ao longo do tempo, por reduzir a sua incidência e detetar maior percentagem de tumores em estádios mais precoces que apresentam melhor prognóstico¹¹. Nos Estados Unidos, o aumento da vigilância tem sido apontado como uma das causas mais importantes para a diminuição das taxas de CCR^{10,11}.

As taxas de incidência de CCR são duas a cinco vezes superiores em países desenvolvidos (e em países recentemente desenvolvidos) comparativamente a países em desenvolvimento^{1,11}. Estas diferenças podem ser atribuídas a uma série de fatores de risco, combinados com práticas díspares de diagnóstico¹. Apesar de muitos países desenvolvidos também possuírem elevadas taxas, tem-se verificado um declínio na mortalidade por CCR, sobretudo devido à maior vigilância e/ou ao progresso no tratamento¹¹.

A epidemiologia do CCR demonstra uma grande variedade a nível mundial, que parece estar mais relacionada com fatores ambientais do que com fatores genéticos¹².

1.1.2 Anatomia, Fisiologia e Histologia do Cólon e do Reto

O cólon e o reto constituem porções do intestino grosso, que se localiza na cavidade abdominal, como ilustra a Figura 3¹³. O intestino grosso tem como funções absorver água e minerais e concentrar os elementos não digeridos em fezes, para eliminação do organismo¹³. Divide-se em várias porções – cego, cólon ascendente, cólon transversal, cólon descendente, cólon sigmoide, reto e ânus¹³.

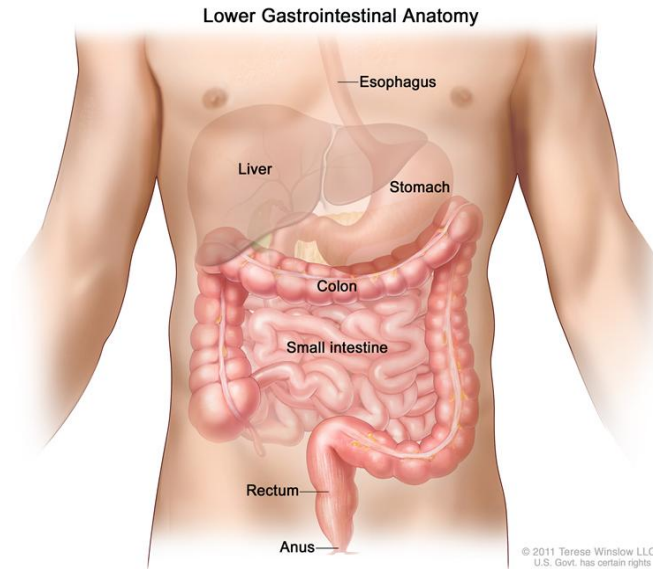


Figura 3 - Localização anatômica do cólon e do reto e sua relação com os órgãos adjacentes. Retirado de *National Cancer Institute*, 2013.

A parede do intestino grosso é formada pelas camadas mucosa, submucosa, muscular e adventícia¹⁴. A mucosa do intestino grosso não possui pregas nem vilosidades, ao contrário do intestino delgado^{13,14}. O epitélio que reveste o intestino é cilíndrico simples, sendo constituído por enterócitos, células caliciformes e glândulas de Lieberkhün do cólon^{13,14}. A lâmina própria da mucosa possui uma grande quantidade de linfócitos e macrófagos¹⁴. A camada submucosa não contém glândulas, é rica em vasos e possui o plexo nervoso de Meissner¹⁴. A camada muscular externa longitudinal no cego e no cólon possui uma disposição diferente, existindo três fitas longitudinais denominadas ténias cólicas¹⁴. No reto, as ténias são menos espessas, tornando a camada muscular semelhante à do intestino delgado¹⁴. Por fim, a adventícia ou serosa é constituída pelo folheto visceral do peritoneu, apresentando pequenos apêndices pediculados formados por tecido adiposo¹⁴. A Figura 4 ilustra cortes histológicos transversais do epitélio do cólon e do reto.

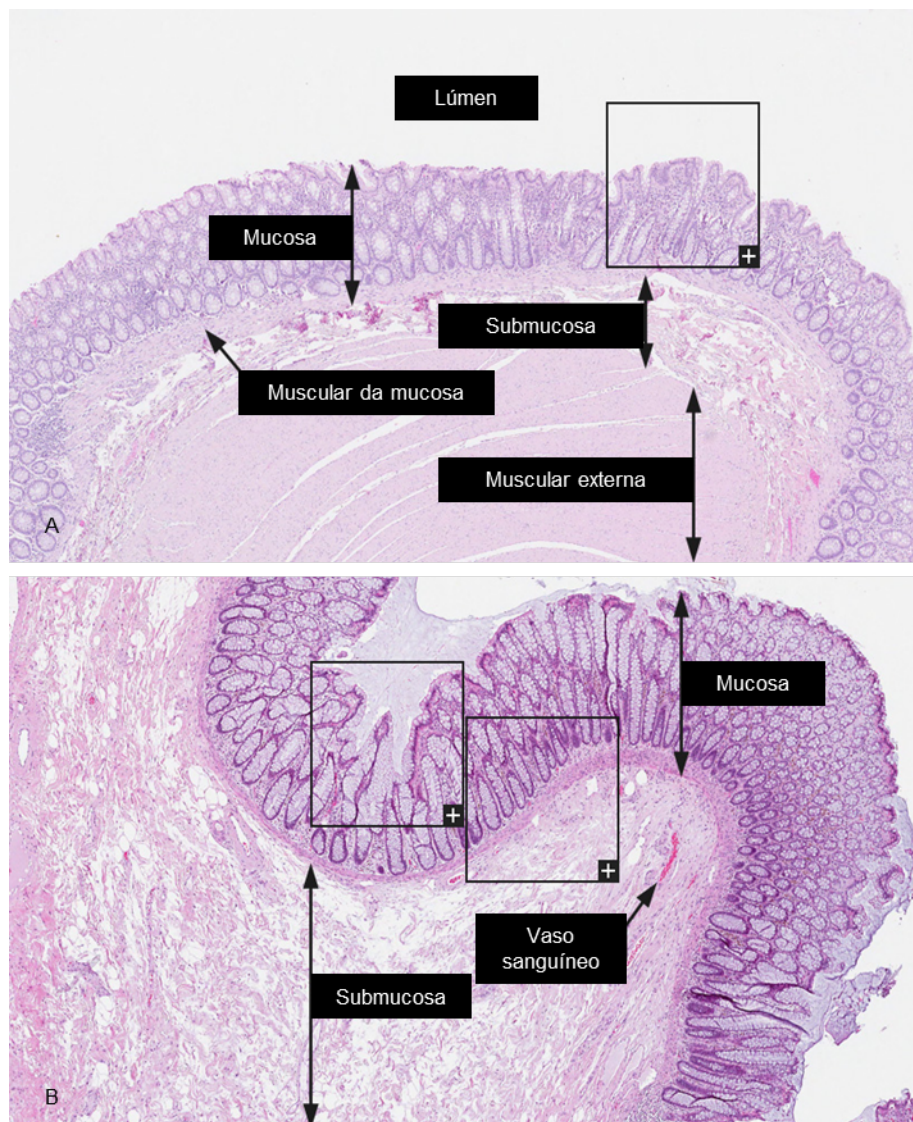


Figura 4 - Representação histológica das camadas mucosa, submucosa e musculares do cólon (A) e das camadas mucosa e submucosa do reto (B). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Adaptado de *The Human Protein Atlas*, 2013.

1.1.3 Definição, Localização e Caracterização

Os tumores colorretais apresentam um grande espectro de neoplasias¹⁵. O CCR é um cancro que se forma nos tecidos do cólon e do reto, a partir de lesões benignas no intestino grosso, conhecidas como adenomas ou pólipos^{15,16}. Segundo os médicos anatomopatologistas, as lesões podem ser classificadas em três grupos no que diz respeito à sua potencial transformação maligna: pólipos não-neoplásicos (exemplos: pólipos inflamatórios e juvenis), pólipos benignos (pólipos adenomatosos e adenomas) e cancro¹⁵.

Histologicamente, os tumores benignos são classificados em três tipos diferentes, com crescente potencial maligno: tubular, túbulo-viloso e viloso¹⁵. A

formação de adenomas parece refletir uma tendência inata ou adquirida do cólon para formar tumores, possuindo algumas características que estão intimamente relacionadas com o seu potencial de progressão para câncer¹⁵. Essas características incluem tamanho grande, patologia vilosa e o grau de displasia do adenoma¹⁵. Embora a maioria dos adenomas seja polipóide, lesões planas e/ou ulceradas também podem ser prevalentes¹⁵. As lesões também podem ser classificadas de acordo com o seu grau de diferenciação, desde pouco a bem diferenciadas¹².

A maior parte dos cânceres colorretais são carcinomas e, por sua vez, cerca de 95% dos carcinomas são adenocarcinomas, que derivam do epitélio glandular da mucosa do intestino^{12,15}. A Figura 5 ilustra lesões características de adenocarcinoma colorretal, a nível macroscópico e microscópico.

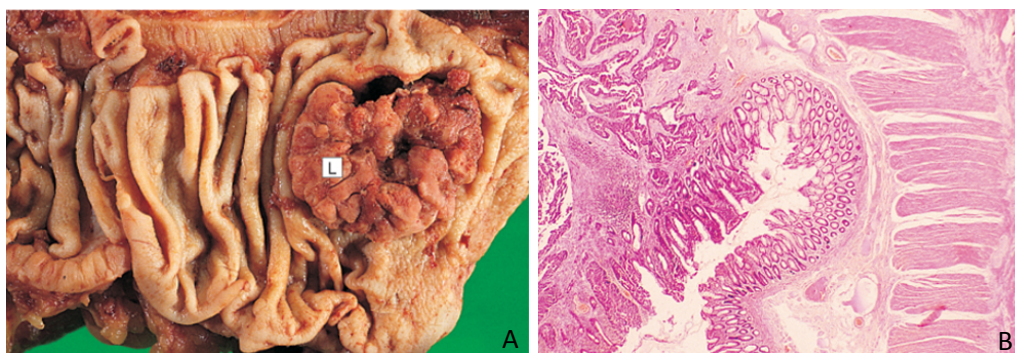


Figura 5 - Morfologia do adenocarcinoma colorretal. Peça operatória com lesão ulcerada (L), típica de CCR (A) e imagem histológica das células epiteliais neoplásicas (B). Retirado de Stevens *et al.*, Core Pathology, 2009.

Relativamente à sua localização, existem diversos tipos morfológicos de carcinoma do cólon e do reto¹². Cerca de 50% dos tumores ocorre no reto e no cólon sigmóide, 30% no cego e no cólon ascendente e 20% no cólon transversal e descendente¹². Os carcinomas localizados no lado direito do intestino grosso são constituídos maioritariamente por lesões polipóides exofíticas grandes, que crescem para o lúmen do intestino¹². Por sua vez, os carcinomas com origem no lado esquerdo do intestino grosso são de dois tipos: carcinomas pequenos que causam estenose; e carcinomas que ulceram, acompanhados de hemorragia¹².

1.1.4 Carcinogénese, Eventos Moleculares e Fatores de Risco

O desenvolvimento do CCR é lento e demora muito tempo até dar sintomas⁶. Ocorrem diversos eventos moleculares aquando da transição epitélio normal – adenoma – carcinoma, como ilustrado na Figura 6¹⁵. Este modelo de carcinogénese foi

estabelecido após uma comparação de alterações genéticas observadas em epitélio do intestino normal, adenomas de tamanho progressivamente maior e em lesões malignas¹⁵. Pelo menos 5 a 7 alterações moleculares principais podem ocorrer quando uma célula normal se transforma numa célula maligna¹⁵.

Existem no mínimo duas grandes vias pelas quais os eventos moleculares levam à formação de CCR¹⁵. Para além dos eventos que resultam em instabilidade cromossômica, dando origem à maioria dos carcinomas do cólon e do reto, cerca de 20 a 30% dos cancros colorretais demonstram padrões de hipermetilação do ácido desoxirribonucleico (DNA)¹⁵. O número de mutações somáticas envolvido na patogénese do CCR é considerável¹⁵. Um estudo verificou que os tumores colorretais acumulavam aproximadamente 90 genes mutados¹⁵. Desses, cerca de 65 foram classificados como relevantes para a patogénese do CCR¹⁵. Cada um dos tumores estudados possuía em média 9 genes mutados¹⁵. Para além disso, cada tumor apresentou um conjunto de genes mutados distinto¹⁵.

A maioria dos genes de suscetibilidade para CCR tem sido definida em estudos realizados com famílias com elevado risco de doença¹⁵. Existem três grandes grupos de genes envolvidos no CCR: genes supressores de tumor, oncogenes e genes de reparação de DNA¹⁵. Os genes supressores de tumor constituem a classe mais importante de genes responsáveis pelas síndromes hereditárias e pela polipose adenomatosa familiar e síndrome de polipose juvenil¹⁵. Apesar de as mutações em oncogenes não constituírem uma importante causa de suscetibilidade para CCR, mutações somáticas em oncogenes estão geralmente presentes nos cancros gastrointestinais¹⁵. Por sua vez, os genes de reparação, nomeadamente os genes responsáveis pela reparação de erros de emparelhamento, são grandemente responsáveis por CCR hereditário, como acontece na síndrome de Lynch.

As alterações mais importantes em cancros com instabilidade cromossômica incluem alterações no número de cromossomas (aneuploidia), perdas de porções de cromossomas, como nos cromossomas 5q, 18q e 17p, e mutações no oncogene *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)*¹⁵. Está descrito que mutações no oncogene *KRAS* ocorrem em cerca de 35 a 45% dos cancros colorretais avançados⁷. Os genes envolvidos nestas perdas cromossômicas são o gene *adenomatous polyposis coli (APC)* (5q), *DCC/MADH2/MADH4* (18q) e *TP53* (17p)¹⁵. O gene *mutated in colorectal carcinoma (MCC)* encontra-se inativado em 15% dos tumores colorretais esporádicos¹². As mutações adquiridas ou inatas de genes de reparação de DNA também têm importância na predisposição das células epiteliais colorretais para desenvolver cancro^{12,15}. Outro aspeto relevante tem a ver com os genes que adquirem mutação bem como o tipo específico de mutação, que podem influenciar o

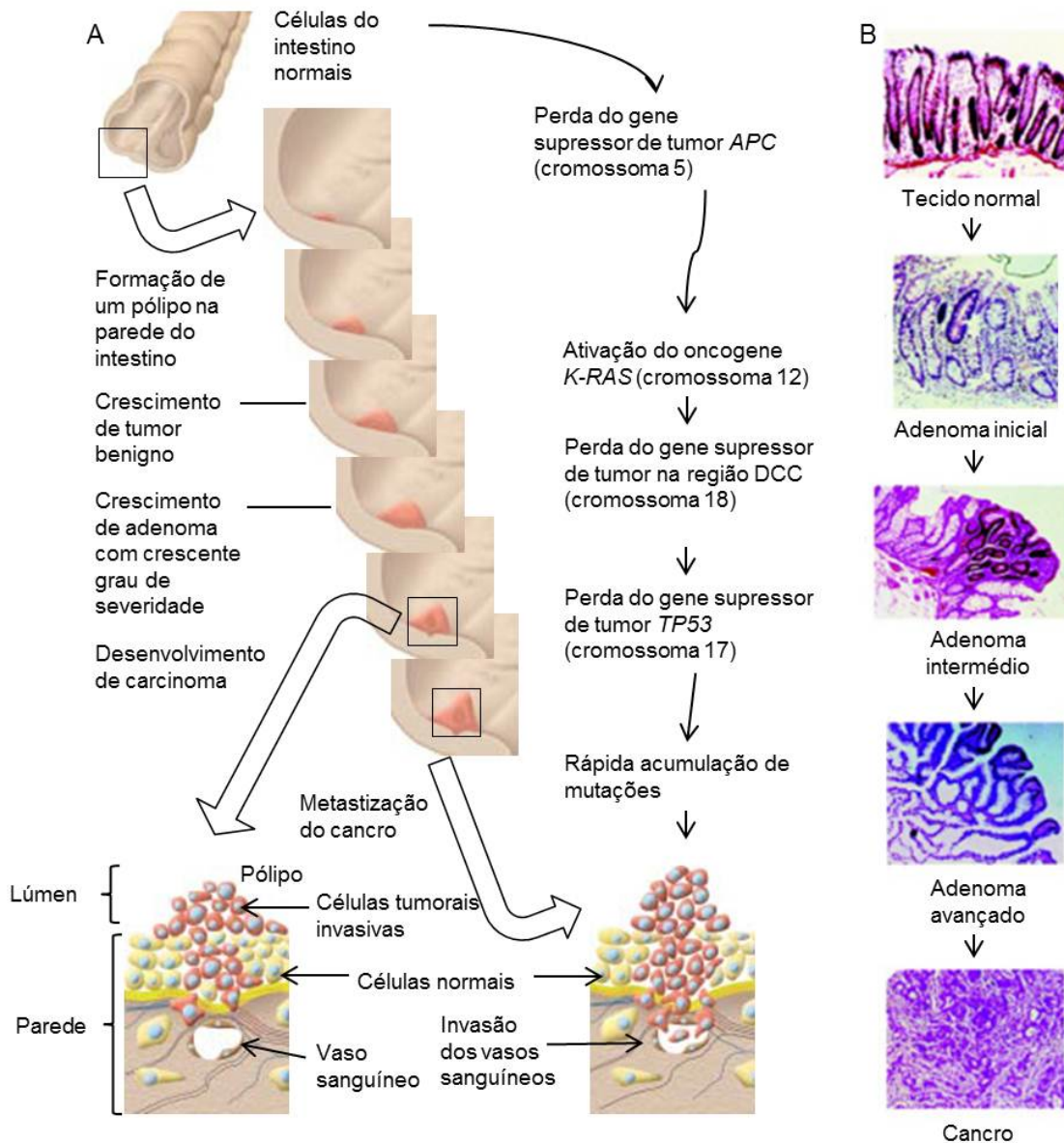


Figura 6 - Desenvolvimento e metastização do CCR humano e sua base genética. A - Uma mutação no gene APC induz divisão celular, formando uma massa de células benignas. Mutações subsequentes levam à ativação da proteína RAS e à perda de dois genes supressores de tumor – gene da região DCC e TP53. Forma-se uma célula maligna que se divide continuamente e que invade as estruturas adjacentes, desenvolvendo cancro. Algumas células tumorais disseminam pelos vasos sanguíneos, que deslocam as células para outras partes do corpo. B – Alterações histológicas das células do intestino que refletem as transformações que ocorrem a nível genético (sequência adenoma – carcinoma, estabelecida por Morson *et al.*. Adaptado de Lodish *et al.* (2004), Alberts *et al.* (2002) e Ilyas *et al.* (1999).

crescimento tumoral ou o tipo de alterações patológicas¹⁵. A velocidade de progressão de adenoma para carcinoma parece ser mais rápida nos tumores com instabilidade de microssatélites comparativamente a tumores estáveis¹⁵. Alterações histológicas características, como a produção elevada de mucina, podem ser observadas em tumores com maior instabilidade de microssatélites¹⁵. Isso sugere que alguns eventos moleculares influenciam as características histológicas do tumor¹⁵. Os tumores com instabilidade de microssatélites são tumores que, em caso de defeitos no sistema de reparação de erros de emparelhamento, adquirem mais rapidamente mutações em

genes importantes associados à carcinogénese relativamente a células com um sistema de reparação funcional¹⁵. É possível detetar este tipo de tumores através das alterações em unidades de repetição do DNA ao longo do genoma, conhecidas como microssatélites de DNA¹⁵.

O estudo das síndromes de CCR hereditário tem fornecido informação importante sobre os eventos moleculares que medeiam a iniciação e a progressão tumorais nos doentes sem anormalidades génicas¹⁵. Por outro lado, com a identificação de alguns genes envolvidos nas síndromes de polipose, têm sido realizados estudos com o intuito de estimar a percentagem de mutações *de novo* que ocorrem em doentes com estas síndromes. A polipose adenomatosa familiar, as síndromes de polipose juvenil, Peutz-Jeghers e Bannayan-Riley-Ruvalcaba aparentam ter grandes taxas de mutações espontâneas. Por outro lado, mutações *de novo* em genes de reparação de erros de emparelhamento associados à síndrome de Lynch não são frequentes.

A maioria dos doentes com CCR, cerca de 75%, tem a doença de forma esporádica, sem qualquer evidência de possuir alteração hereditária¹⁵. Os restantes doentes possuem uma história familiar de CCR que sugere uma componente hereditária, hábitos semelhantes ou uma combinação de ambos¹⁵. Existem dois aspetos importantes que indicam um risco de CCR hereditário¹⁵. Um deles é a incidência elevada de CCR em pessoas com história familiar desse cancro^{6,15}. Outro aspeto é o desenvolvimento precoce de CCR, sendo sugestivo (embora não indicativo) de causa hereditária¹⁵. Foram identificadas algumas mutações génicas responsáveis pelo risco de cancro em algumas famílias¹⁵. No entanto, estima-se que estas mutações contribuem apenas em 5 a 6% para o número total de casos de CCR¹⁵. Dessa forma, é provável que genes desconhecidos contribuam para o desenvolvimento de CCR familiar, em conjunto com fatores de risco não hereditários¹⁵. Para além disso, história familiar de polipose ou de doença semelhante também eleva o risco de cancro do cólon⁶. Doentes com colite ulcerosa ou doença de Crohn têm maior risco de desenvolver cancro⁶. O desenvolvimento de cancro relacionado com história familiar de CCR pode ser categorizado da seguinte forma: adenocarcinoma associado a polipose familiar e CCR hereditário sem polipose¹². A polipose familiar consiste na formação de 100 ou mais pólipos adenomatosos pré-cancerosos, que revestem o intestino grosso e o reto⁶. A maioria das pessoas com esta condição e que não são devidamente tratadas desenvolve CCR⁶. A polipose familiar está associada a uma mutação no gene *APC*, que é um gene supressor tumoral^{12,15}. Como foi referido em cima, a perda do gene *APC* constitui um dos primeiros eventos da progressão tumoral no cólon e no reto¹⁵.

O CCR hereditário sem polipose é mais comum do que o cancro associado à polipose familiar, sendo geralmente pouco diferenciado e mais agressivo¹². Até à data, foram identificadas cinco mutações génicas neste cancro, sendo as mutações inhMSH2 e hMLH1 as duas mais comuns¹². Todas as mutações conhecidas envolvem genes responsáveis pela reparação de DNA¹². Outros fatores de risco de CCR incluem obesidade, dieta pobre em fruta e vegetais, sedentarismo, consumo de carne vermelha e hábitos tabágicos^{1,8,10,11}. A dieta característica dos ocidentais, pobre em fibra e rica em proteínas animais, gorduras e hidratos de carbono refinados, está associada a um maior risco de CCR⁶. Embora o CCR não seja classificado como um cancro associado ao tabaco, existem algumas evidências de que este hábito aumenta o desenvolvimento de pólipos adenomatosos¹⁰. A modificação destes fatores de risco requer alterações comportamentais importantes¹⁰. O uso de aspirina e vitaminas, incluindo suplementos de cálcio, vegetais, bem como atividade física, constituem fatores que parecem estar associados a um menor risco de CCR^{6,10,11}.

1.1.5 Sinais, Sintomas, Rastreio e Diagnóstico

A evolução de alterações benignas para malignas geralmente não origina sintomas, mas em caso de existência o mais comum é a presença de retorragias⁶. Outros sintomas apresentados variam com o tipo de tumor, bem como com a sua localização e extensão⁶. No cólon ascendente, o principal sintoma é a astenia consequente a anemia; no cólon descendente são obstipação alternada com dejeções diarreicas⁶. Para além disso, os doentes podem sentir cólicas e outras dores abdominais^{6,16}. No cancro do reto, os sintomas mais frequentes são retorragias e tenesmo⁶.

Os testes sistemáticos de rastreio e/ou diagnóstico contribuem para uma deteção precoce de lesões⁶. A vigilância deve ser aplicada a pessoas com 50 ou mais anos de idade e a pessoas com menos idade que apresentem um risco elevado CCR¹⁵.

A pesquisa de sangue oculto nas fezes é um dos exames que pode ser realizado⁶. Este teste não é dispendioso e é facilmente exequível, constituindo uma opção fiável para rastreio¹¹. Alguns pólipos ou cancros causam hemorragia e este teste permite a sua deteção, mesmo em quantidades pequenas¹⁵. No caso de deteção de sangue nas fezes, devem ser realizados outros exames¹⁵. É importante ter em conta que condições benignas, como patologia hemorroidária, também provocam hemorragia, pelo que também devem ser pesquisadas¹⁵.

A retosigmoidoscopia é um exame que permite a visualização do reto e da região distal do cólon com um sigmoidoscópio¹⁵. É possível observar cerca de 65% dos cancros colorretais através de um sigmoidoscópio flexível de fibra óptica⁶. Caso seja detetado um pólipó que possa ser maligno, este é removido^{6,15}. Este exame é eficaz, económico e consiste apenas numa intervenção na maioria dos doentes¹⁷. Para observar toda a parede do cólon e do reto, é necessário realizar uma colonoscopia, com recurso a um colonoscópio^{6,15}. Tumores de aparência maligna podem ser extraídos ou biopsados com o auxílio de instrumentos cirúrgicos acoplados ao colonoscópio⁶.

Para além destes exames, é importante a realização de um exame físico com toque retal, que permite detetar lesões no reto médio e baixo¹⁵. Correntemente também são realizadas análises sanguíneas⁶. Cerca de 70% dos doentes com CCR apresenta valores elevados do antigénio carcinoembrionário (CEA) na altura do diagnóstico⁶. No caso de os exames sugerirem a presença de cancro ou em caso de existência de sintomas, deverão ser realizados uma história clínica detalhada, um exame físico cuidado e solicitados outros exames complementares de diagnóstico¹⁵. Se houver suspeita de lesão neoplásica maligna, é necessário realizar uma biópsia aquando da colonoscopia ou da retosigmoidoscopia¹⁵. Os fragmentos removidos são visualizados ao microscópio óptico por um médico anatomopatologista¹⁵. Confirmada a presença de neoplasia maligna, deverão ser solicitados outros exames para o correto estadiamento da doença.

1.1.6 Estadiamento

Se o resultado da biópsia for positivo para neoplasia maligna, é necessário saber a extensão da doença de forma a planear o melhor tratamento¹⁵. Esta avaliação é feita tendo em conta a dimensão do tumor, a invasão dos tecidos adjacentes e a metastização ganglionar à distância¹⁵. O estadiamento pode ser clínico ou patológico, consoante seja baseado em dados clínico-imagiológicos ou na análise anatomopatológica de uma peça cirúrgica¹⁸.

A disseminação do cancro é feita principalmente por três vias – disseminação local, linfática e sanguínea^{6,12,15}. A disseminação local ocorre no tecido, ocorrendo proliferação e invasão através da parede do intestino e podendo atingir áreas adjacentes. Na disseminação linfática, células tumorais entram no sistema linfático. Dessa forma, as células tumorais circulam pelos vasos linfáticos e invadem outros tecidos ou órgãos. Por fim, a disseminação sanguínea ocorre de forma semelhante à linfática, mas ocorrendo através dos vasos sanguíneos. Deste modo, as células

tumorais têm capacidade de invadir outros órgãos ou tecidos, como o fígado e os pulmões. Quando as células tumorais invadem outras localizações distintas da primária, diz-se que ocorreu metastização¹⁵. As metástases são do mesmo tipo que o tumor primário, denominando-se a doença por CCR metastático¹⁵.

Uma classificação comumente utilizada para estabelecer o estadiamento da doença é do *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, atualmente na 7ª edição, que classifica segundo um sistema TNM, esquematizado na Tabela 1¹⁹. Para além desta classificação, existe um estadiamento de acordo com grupos prognósticos e a classificação de Dukes, sendo ambas as classificações comparadas com o sistema TNM na Tabela 2¹⁹.

Tabela 1 - Estadiamento segundo a classificação TNM. Adaptado de *American Joint Committee on Cancer*, 2010.

Sistema TNM para CCR	
Tumor (T)	
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intra-epitelial ou invasão da <i>lamina propria</i> *
T1	Tumor invade a submucosa
T2	Tumor invade a <i>muscularis propria</i>
T3	Tumor invade os tecidos peri-colorretais atravessando a <i>muscularis propria</i>
T4a	Tumor penetra até à superfície do peritoneu visceral**
T4b	Tumor invade ou está aderente a outros órgãos ou estruturas*****
Gânglios linfáticos (N)	
N0	Sem metástases em gânglios linfáticos regionais
N1	Metástases em 1–3 gânglios linfáticos regionais
N2a	Metástases em 4–6 gânglios linfáticos regionais
N2b	Metástases em 7 ou mais gânglios linfáticos regionais
Metástases à distância (M)	
M0	Sem metástases à distância
M1	Com metástases à distância

*Tis inclui células tumorais confinadas à membrana basal glandular (intra-epitelial) ou à *lamina propria* mucosa (intra-mucoso), sem extensão submucosa através da *muscularis mucosae*. ** Invasão direta inclui invasão de outros órgãos ou outros segmentos colorretais como resultado de extensão direta através da serosa, confirmada por exame

microscópico ou, para tumores em localização retro ou subperitoneal, invasão direta por extensão além da *muscularis propria*. *** Se não existir tumor na aderência à análise microscópica, deverá ser classificado como pT1-4a, dependendo da extensão anatómica de invasão da parede.

Tabela 2 - Comparação entre o estágio anatómico e grupos prognósticos. Adaptado de *American Joint Committee on Cancer*, 2010.

Estádio anatómico / Grupos prognósticos		
Estádio	TNM	Classificação de Dukes
0	Tis N0 M0	-
I	T1-2 N0 M0	A
II A	T3 N0 M0	B
II B	T4a N0 M0	B
II C	T4b N0 M0	B
III A	T1-2 N1 M0 T1 N2a M0	C
III B	T3-4a N1 M0 T2-3 N2a M0 T1-2 N2b M0	C
III C	T4a N2a M0 T3-4a N2b M0 T4b N1-2 M0	C
IV	Qualquer T, Qualquer N, M1	-

1.1.7 Tratamento

O tratamento do CCR é baseado na localização do tumor e no estágio da doença, sendo mais eficaz quando aplicado numa fase inicial¹⁵.

As abordagens terapêuticas existentes para o CCR são a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, sendo a primeira o tratamento padrão¹⁵. Alguns doentes são submetidos a uma combinação de tratamentos¹⁵.

O cancro do cólon é, por vezes, tratado de forma diferente do cancro do reto¹⁵. Assim, os tratamentos serão descritos de forma individual. A maioria dos doentes com cancro do cólon é tratada com cirurgia, sendo a realização de colostomia rara neste tipo de tumores¹⁵. Alguns são submetidos a quimioterapia adjuvante após a cirurgia¹⁵. Relativamente à radioterapia, é pouco utilizada para tratar o cancro do cólon, sendo

essencialmente aplicada para alívio da dor e de outros sintomas¹⁵. O tratamento do cancro retal é complexo²⁰. Os procedimentos cirúrgicos são complicados devido aos desafios em operar nos limites estreitos da pélvis óssea, cujas estruturas adjacentes ficam em risco de lesão, e aos planos de dissecação que devem ser mantidos, com excisão total do mesorreto e manutenção da integridade da fáscia mesorretal²⁰. Para além disso, a restauração da continuidade do intestino também pode ser difícil devido às complicações relacionadas com o aparecimento de fístulas²⁰. Hoje em dia, os médicos são confrontados com decisões de tratamento complexas sobre os riscos e os benefícios da terapia neoadjuvante e adjuvante²⁰. Essas decisões dependem grandemente da capacidade de realizar exames pré-operatórios de alta qualidade bem como do exame anatomopatológico realizado posteriormente à intervenção cirúrgica²⁰. Ainda assim, nos doentes com cancro retal a cirurgia é a terapêutica padrão com intuito curativo^{15,21}. Em alguns casos, os doentes recebem radioterapia neoadjuvante, com o objetivo de reduzir as dimensões do tumor e o seu estágio. Pode ainda ser administrada depois da cirurgia – radioterapia adjuvante – caso haja invasão da margem cirúrgica ou em estágio patológico superior ao estimado pré-operatoriamente, em doentes que não tenham realizado radioterapia neoadjuvante¹⁸.

O avanço nas técnicas cirúrgicas na quimioterapia e radioterapia têm permitido prolongar o tempo de sobrevivência dos doentes¹². No entanto, a deteção atempada da doença constitui um fator muito importante, permitindo uma resseção cirúrgica completa do tumor¹². De acordo com o local de ação do tratamento, este pode ser classificado como local ou sistémico¹⁵. A radioterapia e a cirurgia são abordagens terapêuticas locais que promovem a remoção do cancro no cólon e no reto ou morte das células tumorais, bem como nas áreas circundantes¹⁵. Quando há disseminação para outras localizações à distância, o tratamento local pode ser aplicado especificamente nessas áreas¹⁵. Já a quimioterapia constitui um tratamento sistémico¹⁵. Os tratamentos aplicados causam normalmente danos nas células e tecidos saudáveis, pelo que é comum a ocorrência de efeitos secundários¹⁵. Estes efeitos dependem do tipo, extensão e número de tratamentos, para além de existir uma variabilidade individual inerente¹⁵. Em qualquer estágio da doença, é fornecido ao doente apoio e cuidados para aliviar os efeitos secundários causados pelo tratamento¹⁵.

1.1.8 Prognóstico

O prognóstico dos doentes com cancro do cólon e do reto está relacionado com diversos fatores, nomeadamente o tamanho do tumor, o seu tipo e subtipo

histológico, a presença de células em anel de sinete, o grau de diferenciação e a invasão de vasos sanguíneos e linfáticos⁷. Para além disso, as margens de resseção e a presença ou ausência de metástases à distância também contribuem para o prognóstico do doente^{7,15}. Tumores pouco diferenciados são habitualmente detetados numa fase avançada da doença, pelo que estão relacionados com um pior prognóstico¹². Níveis elevados do CEA aquando do diagnóstico estão também relacionados com um pior prognóstico¹⁵. Após um tratamento com intuito curativo, um aumento do valor deste marcador permite suspeitar de recidiva tumoral e/ou metastização⁶. Por outro lado, tumores que desencadeiam uma grande resposta inflamatória na região de invasão são tidos como lesões com melhor prognóstico do que lesões sem resposta imunitária¹².

1.2 Radioterapia

A radioterapia consiste numa abordagem terapêutica usada para controlar diversos tumores malignos, utilizando radiação de elevada energia para destruir as células tumorais^{15,22}. Existem tipos diferentes de radioterapia, a radioterapia externa e a braquiterapia¹⁵. Na radioterapia externa, a irradiação é feita por feixes que provêm de uma fonte localizada no exterior do corpo do doente¹⁵. A fonte de radiação mais comum na radioterapia externa denomina-se acelerador linear¹⁵. A braquiterapia consiste na implantação de fontes radioativas seladas, de forma permanente ou temporária, em contacto direto ou na região próxima do tumor¹⁵.

A capacidade de regressão tumoral está relacionada com alguns fatores, nomeadamente a dose de radiação, a combinação com quimioterapia e o intervalo de tempo entre o tratamento neoadjuvante e a cirurgia²³. A aplicação da radioterapia em cancros humanos tem como objetivo eliminar todas as células tumorais, incluindo as células estaminais tumorais²⁴. A eficácia da radioterapia é determinada pelo estabelecimento de um rácio entre os danos no tecido tumoral e os danos em tecidos normais²⁴. Durante muitos anos têm sido investigados os parâmetros biológicos que regulam a resposta celular à radiação com o intuito de melhorar este rácio terapêutico²⁴. A resposta das células *in vivo* à radiação depende de diversos fatores, nomeadamente cinética da proliferação celular, hipoxia, número de células estaminais e radiosensibilidade intrínseca²⁴. A cinética da proliferação tem influência na resposta porque as células sobreviventes podem proliferar entre as várias frações de radiação efetuadas²⁴. A sensibilidade das células à radiação é diretamente afetada pela pressão relativa de oxigénio no tecido e o grau de hipoxia é uma importante influência²⁴. As células estaminais presentes no tecido proliferam e, assim, a sobrevivência do tecido

está dependente do número inicial de células estaminais presentes no tecido²⁴. Para além disso, as células possuem propriedades genéticas intrínsecas que determinam a sua resposta à radiação²⁴. Destaca-se a suscetibilidade das células ao dano no DNA bem como a sua capacidade de reparar esse dano²⁴. Todos estes fatores dizem respeito às células tumorais e às células normais²⁴. Assim, o rácio terapêutico deve depender nas diferenças entre estes parâmetros para os dois tipos de células²⁴.

As melhorias verificadas no tratamento do cancro com radioterapia durante as últimas décadas devem-se sobretudo aos avanços tecnológicos, que conjugam novas metodologias de distribuição das doses com novas ferramentas de imagem e de posicionamento²⁵. Para além disso, os novos conhecimentos sobre oncobiologia e radiobiologia têm sido fundamentais. Têm sido exploradas as técnicas que permitem estudar os genes e sua expressão no sentido de compreender as vias moleculares subjacentes à resposta à radioterapia. Dessa forma, deveria ser possível desenvolver preditores eficazes de quais os tumores com melhor resposta à terapêutica, melhorando a radioterapia individualizada.

A radioterapia está relacionada com diversos efeitos secundários, alguns dos quais graves e relativamente condicionantes²². Os efeitos variam consoante a dose de radiação administrada e a parte do corpo que é irradiada¹⁵. No CCR, os efeitos secundários agudos mais frequentemente verificados são astenia, náusea, vômitos, diarreia, sangue nas fezes e alteração da mobilidade intestinal, bem como disúria e poliaquiúria^{15,26}. Estes efeitos podem desenvolver-se até certo grau na maioria dos doentes, mas desaparecem normalmente dentro de algumas semanas²⁶. A longo prazo, a radioterapia pélvica pode originar cistites e enterites rádicas¹⁵. A disfunção sexual tem sido descrita como um dos efeitos secundários da radioterapia^{20,27}. Estes efeitos são perturbadores pelo que se torna importante a realização de um estadiamento para aplicação da terapia neoadjuvante apenas a doentes adequadamente selecionados²⁰.

1.2.1 Aplicação da Radioterapia no Cancro Colorretal

A radioterapia neoadjuvante aplicada ao cancro retal começou por ser utilizada devido à sua capacidade em regredir o estágio da doença e permitir ressecção cirúrgica²⁸. Algumas instituições têm reportado melhorias em doentes submetidos a radioterapia neoadjuvante, quer em termos de recorrência quer na sobrevivência em 5 anos²⁸. Está provado que o cancro retal regride em resposta à radiação, embora essa resposta possa ser lenta, com uma regressão máxima entre as 8 e as 12 semanas após radioterapia²⁸.

Outros autores também verificaram um melhor controlo local e maior sobrevivência após radioterapia neoadjuvante e cirurgia em relação à cirurgia isolada²⁹. O Grupo Holandês de CCR afirmou que a adição de radioterapia neoadjuvante de curto prazo à excisão total do mesorreto diminuiu a taxa de recorrência local, embora não tivesse melhorado a sobrevivência em 2 anos²⁹. Mais ainda, no Ensaio de Cancro Retal Sueco – *Swedish Rectal Cancer Trial* – foi demonstrado que um regime, com a duração de uma semana, de radioterapia neoadjuvante comparado com cirurgia sozinha reduziu em maior quantidade as taxas de recorrência e melhorou as taxas de sobrevivência durante 5 anos³⁰. Por outro lado, os doentes submetidos a radioterapia apresentaram disfunção intestinal com repercussão nas atividades diárias³⁰. Embora as diferenças verificadas não tenham sido significativas, os doentes submetidos a radioterapia demonstraram uma influência maior do tratamento nas atividades sociais comparativamente aos doentes apenas sujeitos a cirurgia³⁰.

A radioterapia neoadjuvante de curta administração tem sido eficaz na diminuição das taxas de recorrência locais em doentes submetidos a excisão total do mesorreto³⁰. No entanto, esta vantagem deve ser balanceada com os efeitos secundários agudos e crónicos da radiação, pois ocorre um aumento de toxicidade aguda após a aplicação da radioterapia fracionada^{26,30}.

Um número considerável de doentes adquire um controlo do tumor a longo prazo com a radioterapia²⁵. A forma mais eficaz de melhorar as taxas de tratamento, numa escala nacional ou internacional, é assegurar a qualidade na prescrição e administração de radioterapia²⁵.

Nos últimos anos, a crescente utilização de radioterapia neoadjuvante, ou combinada com quimioterapia, bem como o progresso na qualidade da cirurgia do cancro retal, devido à padronização da excisão total do mesorreto, promoveram em conjunto uma melhoria na forma como se aborda o cancro retal³¹.

1.2.2 Combinação com Quimioterapia

A combinação de quimioterapia com radioterapia é descrita há vários anos como abordagem terapêutica no cancro retal^{28,32}. Parece regredir o tumor (removendo as células malignas da parede do reto e dos gânglios adjacentes) e, conseqüentemente, alterar o estadiamento T e N^{23,28}. Para além disso, parece resultar em taxas mais elevadas de resposta patológica completa. O efeito sinérgico da administração de 5-fluorouracilo (5-FU) e radioterapia está bem estabelecido em estudos *in vitro* e em modelos animais²⁸. Vários autores têm reportado uma regressão

tumoral elevada, 74% e 76%, em doentes tratados com quimiorradioterapia²⁸. No entanto, a adição de quimioterapia à radioterapia também elevou a toxicidade a nível gastrointestinal, hematológico e das mucosas²⁸. Num estudo foi reportado uma toxicidade aguda excessiva em doentes com cancros não-operáveis recorrentes, tratados com quimiorradioterapia²⁸. No entanto, há investigações que reportam dados diferentes como é o caso do estudo de Minsky *et al.*²⁸.

As questões que permanecem em aberto são se o preço da maior regressão tumoral tem influência na sobrevivência dos doentes e se o significado prognóstico do estágio residual da doença tem efeito no resultado do tratamento²⁸. Verificou-se que a incidência de gânglios linfáticos positivos diminuiu consideravelmente após radioterapia neoadjuvante e quando combinada com quimioterapia diminuiu para metade.

O fármaco 5-FU combinado com radioterapia parece aumentar de forma significativa a resposta apoptótica das células com mutação no gene *TP53*, sendo que essas células demonstram normalmente resistência à radioterapia²⁸. A quimioterapia e radioterapia neoadjuvantes proporcionam um melhor controlo local em comparação com a quimioterapia e radioterapia pós-operatórias²⁹. Para além disso, as primeiras estão associadas a uma menor toxicidade. No entanto, não se verificaram diferenças em relação à sobrevivência. Num estudo sobre cancro retal localmente avançado, onde se avaliou o efeito do fármaco cetuximab administrado como tratamento pré-cirúrgico em combinação com capecitabina ou 5-FU, e com radioterapia, verificou-se que a taxa de resposta patológica completa foi baixa³³. A quimiorradioterapia neoadjuvante constitui o tratamento padrão para o cancro retal localmente avançado - estágio T3 e T4 ou invasão de gânglios linfáticos^{5,34}, consistindo na administração por infusão de 5-FU ou de fluoropirimidinas orais (exemplo: capecitabina) e posterior radioterapia³⁵⁻³⁸. Esta abordagem providencia um melhor controlo do tumor e um período de sobrevivência maior³⁵⁻³⁷. No entanto, está associada a mortalidade, morbilidade significativa e a sequelas de longo prazo que condicionam a qualidade de vida dos doentes³⁶. Outros estudos indicam também a eficácia da quimiorradioterapia neoadjuvante em doentes com cancro retal em estágio II, permitindo controlo local, diminuição de recorrências após cirurgia bem como aumento da sobrevivência dos doentes³⁹.

1.2.3 Fundamentos da Radioterapia

A radioterapia envolve a distribuição fracionada de radiação que causa um efeito citotóxico indireto, através da produção de radicais livres nos tecidos-alvo^{22,40}. Esses radicais constituem a fonte de espécies reativas de oxigénio (do inglês *Reactive Oxygen Species*, ROS) e de espécies reativas de nitrogénio^{22,40}. Quaisquer destas espécies reativas provocam danos no DNA, formando quebras em uma das cadeias da dupla hélice e/ou nas duas cadeias da dupla hélice de DNA. Existem enzimas que possuem a capacidade de reparar as quebras em só uma das cadeias da dupla hélice²². No entanto, as quebras nas duas cadeias da dupla hélice são mais difíceis de reparar ou até mesmo irreparáveis^{22,41}. A radiação consegue também destruir diretamente bases do DNA, aumentando a complexidade das quebras em uma das cadeias da dupla hélice e nas duas cadeias da dupla hélice de DNA e o subsequente rearranjo²².

Em resposta aos danos causados pela radiação ionizante, é ativada uma resposta que determina o futuro da célula – bloqueio da divisão celular nos *checkpoints* das fases G1 e G2 do ciclo celular, reparação, senescência ou ativação de outros mecanismos de morte celular^{40,42}. Se as células não têm capacidade de reparar os danos, ocorre morte celular programada – apoptose⁴¹. A morte celular ocorre normalmente na próxima tentativa de divisão da célula³¹.

Embora o mecanismo molecular pelo qual a radiação promove apoptose ou perda de capacidade clonogénica não esteja bem descrito, a membrana citoplasmática e o DNA representam os alvos celulares mais importantes⁴³. Para além disso, também pode ocorrer alteração da função das mitocôndrias⁴³. A apoptose é regulada segundo um complexo controlo genético e alguns dos oncogenes e genes supressores tumorais responsáveis pela iniciação tumoral e potencial maligno também interferem na resposta apoptótica ao tratamento²⁴.

A sensibilidade aos efeitos da radiação é complexa, resultando da interação entre vários genes de diferentes vias celulares⁴⁴. Como a radioterapia exerce os seus efeitos citotóxicos através de dano nas células, nas proteínas e no DNA, a capacidade individual de reparar o DNA lesado pode alterar a resposta do tecido normal. Os danos no DNA induzidos pela radiação são diversos e quase todas, senão todas, as vias de reparação de DNA podem estar envolvidas nesse processo. Os mecanismos de reparação de quebras nas duas cadeias da dupla hélice de DNA – recombinação homóloga e junções terminais não homólogas – bem como os de excisão de nucleótidos ou bases são relevantes⁴⁴.

Para além disso, a complexa resposta à radiação ionizante requer a expressão e atividade da via da proteína P53⁴⁴. Quando ativada, esta proteína possui diversos alvos, incluindo genes envolvidos na regulação do ciclo celular, apoptose e reparação

de DNA⁴⁴. A regulação destes processos leva à resposta celular aos danos induzidos pela radiação ionizante⁴⁴. O gene *CDKN1A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) ou *P21* é um importante gene de *checkpoint* do ciclo celular, regulado pela P53⁴⁴. Assim que ocorre algum dano no DNA, a ligação da P53 gera a transcrição do gene *CDKN1A* que impede as células de entrarem na fase S do ciclo celular, retardando assim a progressão do ciclo celular^{44,45}. As proteínas p21 e P53 estão diretamente envolvidas no *checkpoint* G1/S em resposta à radiação ionizante⁴⁴.

1.2.3.1 Mecanismo de ação da radiação ionizante

A irradiação de qualquer sistema biológico origina uma sucessão de processos que diferem muito quanto à cronologia²⁵. Esses processos podem ser divididos em três fases: física, química e biológica. As interações que ocorrem entre a radiação ionizante e os átomos ou moléculas pertencentes ao tecido dizem respeito à fase física²⁵. À medida que os fótons e/ou as partículas carregadas percorrem as células, interagem principalmente com elétrons orbitais, ionizando alguns átomos ou moléculas e excitando outros. Se forem suficientemente energéticos, estes elétrons secundários podem excitar ou ionizar outros átomos ou moléculas, originando uma cascata de ionizações. Este mecanismo leva à ocorrência de muitas ionizações num curto espaço percorrido, acumulando danos em pares de base de DNA próximos.

A fase química corresponde ao período no qual os átomos e as moléculas modificados reagem com outros componentes celulares, através de reações químicas rápidas²⁵. A ionização e a excitação levam à quebra de ligações químicas e à formação de radicais livres. Estas moléculas são altamente reativas e fazem parte de uma sucessão de reações que podem levar à restauração de um equilíbrio. As reações dos radicais livres terminam um milissegundo após a exposição a radiação. A destruição causada por essas espécies pode ocorrer em macromoléculas como o DNA, levando a consequências graves se não for reparado. Como a radiação interage de forma aleatória com o meio percorrido, qualquer molécula celular pode ser afetada. No entanto, é importante ter em conta que existem múltiplas cópias da maioria das moléculas, nomeadamente ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) e proteínas, e que têm uma substituição rápida e contínua, o que limita as consequências dos danos causados pela radiação. O DNA, pelo contrário, possui apenas duas cópias e não é substituído com facilidade. Sendo uma molécula de grandes dimensões, constitui o maior alvo. Os danos permanentes no DNA levam a consequências por vezes letais para a célula.

Por fim, a fase biológica compreende todos os processos posteriores²⁵. Inicialmente ocorrem reações enzimáticas que atuam nos danos químicos residuais e

a maioria das lesões é reparada com sucesso. As lesões sem reparação levam a morte celular; contudo, a morte não é imediata. Mesmo após pequenas doses de radiação, as células têm capacidade de se dividirem várias vezes antes de morrer. Os efeitos agudos nos tecidos normais são a morte celular e a subsequente perda de células que seriam originadas pelas primeiras. Como resposta à morte celular verifica-se proliferação celular compensatória, que ocorre quer em tecidos normais quer em tecidos tumorais. Relativamente aos efeitos tardios, salientam-se a fibrose e a telangiectasia da pele, danos na medula espinal e danos nos vasos sanguíneos. Uma manifestação mais tardia é a formação de tumores secundários. Os efeitos podem surgir até muitos anos após a exposição à radiação.

1.2.4 Resposta dos tecidos à radiação

A resposta de um tumor consiste em regressão e, posteriormente, em recrescimento ou recorrência²⁵. No entanto, este recrescimento pode não ocorrer durante a sobrevivência do doente. Nesse caso, diz-se que se atingiu um controlo local do tumor.

Por sua vez, as respostas do organismo à radioterapia variam desde um desconforto mínimo a complicações graves²⁵. A velocidade a que uma resposta ocorre varia muito de acordo com os tecidos e com a dose da radiação absorvida, como referido anteriormente. Está devidamente estabelecido que múltiplas frações de radiação durante um período de semanas levam a uma resposta melhor do que a exposição a uma única dose de radiação. À medida que a dose efetivaⁱ aumenta, o efeito sobre o tumor aumenta, assim como o dano provocado nos tecidos normais. Para além disso, a adição de um composto citotóxico pode também aumentar o efeito sobre o tumor. No entanto, essa adição pode implicar aumento dos danos nos tecidos normais.

Devido à importância do DNA, as células e os organismos possuem diversos mecanismos de reparação de danos²⁵. A reparação por excisão de uma base, de quebras em uma das cadeias da dupla hélice de DNA, de quebras nas duas cadeias da dupla hélice de DNA, a recombinação homóloga e a recombinação por terminações não-homólogas constituem sistemas de reparação especializados. Também existem outros mecanismos de reparação, como a reparação de erros de emparelhamento e a reparação por excisão de nucleótidos. Estes dois últimos mecanismos não parecem ser tão relevantes na reparação por dano devido a radiação ionizante, uma vez que ocorrem durante a replicação e aquando da formação de aductos de DNA devido a

ⁱ No Anexo I encontram-se descritos os diversos tipos de dose de radiação.

radiação ultravioleta, e que células com mutações ou deleções em genes relativos a estas vias não são mais sensíveis à radiação ionizante. Pelo contrário, mutações ou deleções nas reparações por excisão de base, de quebras de cadeias de DNA ou por terminações não-homólogas podem proporcionar uma radiosensibilidade maior.

Está descrito que uma dose de radiação de 1 Gy causa em cada célula aproximadamente 10^5 ionizações, mais de 1000 danos nas bases do DNA, cerca de 1000 quebras em uma das cadeias da dupla hélice de DNA e 20-40 quebras nas duas cadeias da dupla hélice de DNA²⁵. Noutra perspectiva, numa típica linha celular de mamífero, a dose 1 Gy mata aproximadamente 30% das células. A citotoxicidade relativamente limitada deve-se à eficiente reparação do DNA; sendo que depende da radiosensibilidade e da espécie.

A resposta ao dano no DNA consiste num sistema altamente complexo e coordenado que determina o futuro da célula face ao dano causado pela radiação²⁵. A resposta não é feita apenas por uma via, mas sim um grupo de vias de sinalização interligadas, sendo que cada uma controla efeitos diferentes nas células. As moléculas que identificam e localizam o dano no DNA – sensibilizadores – emitem um sinal para três grandes vias efetoras, desencadeando uma resposta da célula ao dano. Essas vias são as vias de morte celular, de reparação de DNA e de bloqueio temporário do ciclo celular. Um dos eventos primários da sensibilização ao dano é a fosforilação da proteína histona H2AX²⁵. Esta proteína pode ser fosforilada por três cinases distintas – proteína da ataxia telangiectasia mutada (ATM), proteínas cinases dependentes de DNA (DNA-PKcs) e proteína cinase relacionada com ataxia telangiectasia (ATR). Estas proteínas têm a capacidade de fosforilar variados substratos. Pensa-se que a ATM possui o papel mais importante na transmissão dos sinais em resposta ao dano induzido por radiação. Uma vez que os danos podem originar mutações graves, pode ser mais vantajoso para o organismo eliminar a célula em vez de tentar repará-la²⁵. O gene *TP53* é um gene supressor tumoral que regula outros genes que controlam os *checkpoints* da divisão celular e a morte celular programada por apoptose. A ATM tem a capacidade de fosforilar a P53, levando à sua ativação e, por conseguinte, à promoção de apoptose e interrupção do ciclo celular. A resposta ao dano no DNA ativa quatro *checkpoints* distintos, que ocorrem em fases diferentes do ciclo celular: o *checkpoint* em G1, o *checkpoint* na fase S, o *checkpoint* na fase G2 inicial e o *checkpoint* na fase G2 tardia²⁵. Existe alguma evidência de que este último *checkpoint* tem um papel na radiosensibilidade. Inibidores da ATR que previnem o controlo nesse *checkpoint* causam radiosensibilização. Para além disso, parece ocorrer mais morte de células que estão no *checkpoint* da fase G2 tardia e que entram em mitose prematura. A presença de *checkpoints* nas células normais e a ausência dos mesmos

em muitas células tumorais afeta a redistribuição das células nas diversas fases do ciclo celular e a sensibilidade das células às subseqüentes doses de radiação²⁵. Uma vez que as células em fase G1 e S possuem radios sensibilidades diferentes, podem responder de forma distinta à radiação. Dessa forma, os *checkpoints* afetam as respostas à radioterapia administrada em diversas frações.

A reparação de quebras nas duas cadeias da dupla hélice de DNA é feita essencialmente pela recombinação homóloga e pela ligação de extremidades não-homólogas²⁵. Como os próprios nomes indicam, a primeira necessita de DNA homólogo não lesado para reparar as quebras enquanto a segunda não requer seqüências homólogas de DNA para proceder à correção dos erros. Quaisquer mutações nos genes envolvidos nestas reparações comprometem a sua eficácia. A recombinação homóloga ocorre sobretudo nas fases S e G2. Por sua vez, a recombinação de extremidades não-homólogas pode ocorrer em qualquer uma das fases do ciclo celular.

A resposta ao dano no DNA não só determina a sensibilidade das células para a morte como também o tipo de morte e o momento em que ocorre²⁵. Uma vez que a resposta ao dano é diferente nas células normais e nas células tumorais, a morte que ocorre em cada um dos tipos de células pode não se manifestar da mesma forma. Quando falamos em morte celular, pretende-se referir a qualquer processo que leve à incapacidade das células para formar colónias, após irradiação. A apoptose, tipo de morte celular programada, resulta em destruição e remoção rápidas da célula, normalmente após um dano, stresse ou como defesa contra a tumorigénese. A via da apoptose pode ser ativada pela resposta ao dano no DNA, sendo determinante na morte celular induzida por radiação em algumas células. Existem outros mecanismos que podem contribuir para a perda da capacidade clonogénica, como a autofagia, a senescência e a necrose. Nas células malignas, estes mecanismos encontram-se frequentemente alterados.

Para além dos mecanismos referidos, existe ainda o fenómeno de catástrofe mitótica, caracterizado pela impossibilidade de completar a mitose corretamente após exposição a radiação²⁵. Pode ser considerado um tipo de morte celular, na medida em que pode ser grave o suficiente para impedir a mitose completa ou alterar as funções celulares de tal forma que seja impossível a proliferação. Mais ainda, a catástrofe mitótica pode provocar mais danos no DNA e nos cromossomas, levando à ativação de outros tipos de morte celular. A Figura 7 ilustra os diferentes tipos de morte celular causados pela radiação.

É muito difícil inferir a importância de cada um dos mecanismos de morte celular a partir da monitorização da morte de uma determinada célula após

irradiação²⁵. Vários mecanismos de morte celular podem ser ativados na mesma célula. O mecanismo pelo qual a célula morre é o que ocorre de forma mais rápida e não é necessariamente o mais sensível à ativação.

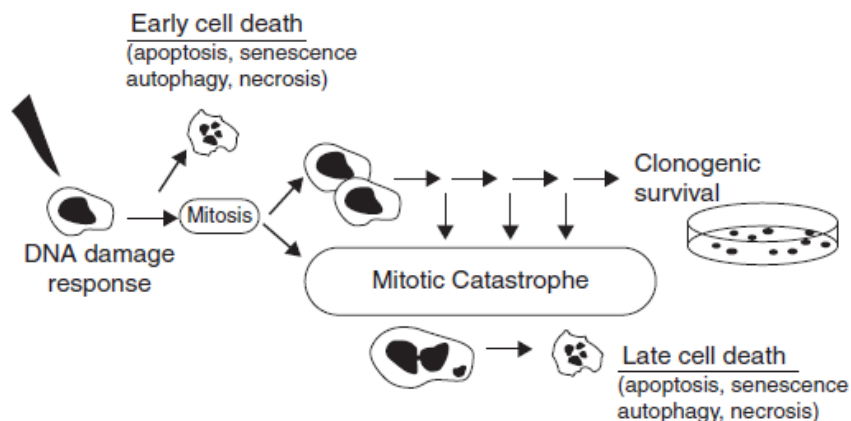


Figura 7 - Esquema representativo da morte celular após exposição a radiação. Retirado de Joiner e Kogel, Basic Clinical Radiobiology, 2009.

De acordo com o momento em que a célula morre, pode utilizar-se a seguinte classificação: morte celular precoce e morte celular tardia²⁵. A morte celular precoce resulta principalmente da ativação de vias em resposta ao dano induzido por radiação. A indução de apoptose, iniciada como resposta ao dano no DNA, constitui um exemplo de morte celular precoce. A resposta é ativada dentro de minutos após irradiação e leva à ativação da P53 que, conseqüentemente, ativa proteínas pró-apoptóticas^{25,46}. Os genes que regulam a apoptose influenciam de forma significativa a radiosensibilidade. A perda de P53 promove defeitos na regulação da apoptose precoce e aumenta a resistência à radiação.

Relativamente à morte celular tardia, a célula morre somente depois de tentar iniciar mitose²⁵. Neste caso, a resposta ao dano no DNA é incapaz de induzir apoptose, mesmo que a P53 e vias pró-apoptóticas tenham sido ativadas. A reparação dos danos tem lugar e pode influenciar a radiosensibilidade da célula. Dessa forma, a maioria das células com capacidade proliferativa mas com defeitos na reparação de quebras das duas cadeias da dupla hélice de DNA, em modelos animais e em doentes, apresenta um aumento na sensibilidade à morte celular induzida por radiação²⁵.

Embora os mecanismos de reparação sejam importantes, a morte celular ocorre algum tempo após a irradiação²⁵. Dessa forma, a célula morre muito depois de os *checkpoints* estarem desativados e de os danos terem sido reparados. A catástrofe mitótica é considerada responsável pela maioria das mortes em células irradiadas. O

sinal para a iniciação de morte não provém dos danos induzidos pela irradiação, mas sim das consequências da falha em ocorrer mitose completa de forma adequada.

Encontra-se ainda descrito um efeito designado por efeito *bystander*²⁵. Este efeito, embora pouco estudado, descreve a morte de uma célula devida à irradiação de células vizinhas. Foi verificado que a transferência de meio de cultura de células irradiadas para células não irradiadas causa morte por este efeito. Este resultado parece sugerir que as células irradiadas secretam substâncias que podem causar danos a células não irradiadas. No entanto, o seu mecanismo ainda não está descrito.

1.2.4.1 Apoptose

A apoptose corresponde a um tipo de morte celular altamente regulado e pode ser iniciada quer como resultado de condições que ocorrem na própria célula ou por sinais gerados externamente, em tecidos adjacentes ou células do sistema imunitário^{25,46}. A apoptose desempenha um papel fundamental e alterações no seu controlo podem originar determinadas doenças, como cancro.

A nível morfológico, ocorrem modificações da membrana citoplasmática com projeções em forma de bolha (*blebs*), condensação cromatídica e degradação do DNA⁴⁷. Também outros componentes da célula são fragmentados, formando-se corpos apoptóticos que são posteriormente fagocitados por células vizinhas.

Existem dois tipos de moléculas na via da apoptose, as moléculas que determinam o início da apoptose – sensibilizadores – e as moléculas que permitem a realização da apoptose – efetores²⁵. A apoptose ocorre segundo a ativação sequencial de diferentes enzimas denominadas de procaspases, reguladas por uma família de inibidores da apoptose^{25,46}. Inicialmente dá-se a ativação dos sensibilizadores, como a caspase 8 e a caspase 9. Estas moléculas geram o sinal inicial, que por sua vez ativa os efetores, que clivam outras proteínas celulares, culminando na morte celular.

A ativação que ocorre a partir da caspase 8 gera uma via apoptótica designada por via extrínseca^{25,46}. Esta é usualmente ativada devido à ligação que ocorre entre um ligando extracelular e um receptor da membrana citoplasmática. Esta via não é desencadeada por radiação, mas pode sê-lo pela combinação de fármacos com radiação. Existe uma segunda via, a via intrínseca, que é despoletada pela ativação da caspase 9^{25,46}. Esta designação deve-se ao facto de a ativação ocorrer dentro da própria célula, sem influência de componentes extracelulares. Diversas formas de danos levam à ativação desta via. A ativação da caspase 9 é controlada grandemente pelo balanço entre proteínas pró e anti-apoptóticas. Após irradiação, o balanço favorece a apoptose devido à ativação da P53 e à indução de proteínas pró-apoptóticas, como a BAX e a PUMA. O balanço é variável entre células de diferentes

tipos e entre tumores. Nos tumores, muitos dos genes que regulam a apoptose estão frequentemente alterados. Dessa forma, a apoptose também é influenciada por esse fator. A sensibilidade à apoptose apresenta-se reduzida no cancro quando comparada com a de tecidos normais.

1.2.4.2 Autofagia

A autofagia é um processo através do qual as células digerem parte dos seus componentes, gerando pequenas moléculas e energia²⁵. Existem mais de 20 proteínas responsáveis pelo controlo da autofagia. Estas proteínas iniciam a formação de uma estrutura que permite a fagocitose de componentes celulares, dando origem a vacúolos ou autofagossomas.

Este processo é ativado em resposta a diversas situações, sendo a principal a remoção de fatores de crescimento ou nutrientes²⁵. A autofagia é controlada pela proteína *mammalian target of rapamycin* (mTOR). Esta proteína é um sensibilizador do estado nutricional, integrando vias de sinalização envolvidas na regulação dos níveis de energia, oxigénio e fatores de crescimento.

A autofagia também tem sido observada após tratamento com agentes anti-tumorais, como a radiação²⁵. Essa observação sugere que a autofagia pode constituir um importante mecanismo de morte celular como resposta a esses agentes. No entanto, ainda não está claro se a autofagia corresponde a uma resposta própria da célula ou se é induzida pelos agentes anti-tumorais. A contribuição da autofagia para a morte celular parece ser altamente específica.

1.2.4.3 Necrose

A morte celular por necrose ocorre devido a alterações extremas de pH, perda de energia e desequilíbrio iónico, sendo um processo desordenado e irreversível²⁵. A necrose também é observada em tumores humanos e pode ser induzida após tratamento com certos fármacos que provocam danos no DNA, bem como após irradiação.

A indução de necrose parece estar dependente de reservas de energia (como o dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD) e a adenosina trifosfato (ATP), assim como do stresse celular, de vias de sinalização, dos níveis de cálcio e da ativação da P53²⁵. Todos estes fatores provocam a permeabilização da membrana citoplasmática que, por sua vez, leva a acidificação intracelular e libertação de diversas enzimas que promovem a necrose. Ainda não se conhece o modo como a célula controla a necrose após irradiação, mas tem-se verificado que a necrose é variável entre diferentes tipos celulares.

1.2.4.4 Senescência

A senescência diz respeito à perda permanente da capacidade de divisão celular^{25,46}. Está relacionada com o envelhecimento e com o encurtamento gradual dos telômeros nas extremidades dos cromossomas durante a fase de crescimento exponencial. Também pode verificar-se senescência prematura, induzida por diversos stresses celulares como os que são provocados pela ativação de oncogenes ou pelo dano no DNA induzido pela radiação²⁵. As células que entram em senescência após irradiação perderam a sua capacidade proliferativa e não contribuem para a recuperação do tecido ou do tumor.

Assim como na apoptose, a propensão para diferentes células e diferentes tumores entrarem em senescência é variável²⁵. A senescência prematura e por envelhecimento constituem barreiras ao desenvolvimento tumoral e os mecanismos que as regulam estão usualmente alterados no cancro. Os dois tipos de senescência partilham características que estão alteradas na carcinogénese. Assim, as células tumorais possuem uma capacidade variável para iniciar este processo após irradiação, dependendo de alterações genéticas presentes em cada célula tumoral.

1.2.4.5 Catástrofe mitótica

A catástrofe mitótica consiste num tipo de morte celular que resulta de uma divisão celular aberrante²⁵. As células prosseguem a mitose de uma forma inapropriada, contendo danos no DNA. Isso acontece com frequência após exposição a radiação. A palavra morte, neste contexto, significa perda de potencial replicativo, ocorrendo devido à incapacidade de a célula se replicar e separar o material genético de forma adequada ou à perda de material genético durante a replicação.

Para além de constituir um tipo de morte celular, a catástrofe mitótica pode por si levar a morte celular por apoptose, senescência, autofagia ou necrose²⁵.

Uma vez que muitos dos genes envolvidos na resposta ao dano no DNA e os *checkpoints* estão alterados no cancro, a propensão para catástrofe mitótica pode também variar de forma significativa entre diferentes tumores²⁵.

1.3 Resistência à Radioterapia no Cancro Colorretal

A sensibilidade à quimiorradioterapia constitui um importante fator para a probabilidade de controlo local da doença e, por conseguinte, para a sobrevivência

sem doença³⁸. Como a quimiorradioterapia constitui a abordagem terapêutica neoadjuvante padrão no CCR, a predição de sensibilidade e de resistência tem grande importância³¹. Existem evidências de que a forma como o tumor responde à radiação é dinâmica, variando consoante a regulação dos genes no período inicial do tratamento^{31,48}. Um estudo apontou regressão completa em cerca de 4 a 30% dos doentes e diminuição do estágio da doença em 30% a 61%⁴⁸. A resposta varia com os esquemas de fracionamento e com o tempo decorrido entre a radioterapia e cirurgia. Para além disso, varia significativamente entre tumores tratados com o mesmo protocolo. Este facto pode estar relacionado com as diferenças no tamanho e estágio tumoral assim como nas características biológicas de cada um dos tumores.

Nem todos os doentes adquirem benefício através do tratamento com radioterapia, na medida em que as células tumorais podem ser resistentes ao tratamento ou desenvolvem resistência ao longo do mesmo^{22,35-37}. Este facto pode manifestar-se por ausência de resposta ao tratamento, ou seja, sem diminuição do tumor ou diminuição do estágio, por disseminação metastática assim como recorrência tumoral no local inicial²². A radiorresistência representa um grande problema no que diz respeito ao tratamento eficaz do cancro. Por outro lado, outros tumores respondem bem e, na altura da cirurgia, demonstram regressão parcial ou completa³⁵. Em alguns casos, as peças operatórias não possuem células tumorais, o que resulta num prognóstico favorável³⁶.

A compreensão dos fatores intrínsecos ao tumor que permitem prever maior sensibilidade à abordagem terapêutica neoadjuvante constitui um grande objetivo da investigação no CCR, na medida em que esse conhecimento poderia originar uma terapêutica personalizada³¹. Além disso, a identificação de marcadores moleculares que predigam a resposta à quimiorradioterapia é de extrema relevância para a prática clínica^{37,38}. Atualmente, não existe capacidade de prever a resposta à quimiorradioterapia³⁶. Em primeiro lugar, este tratamento é moroso, dispendioso e aumenta a morbidade perioperatória^{31,36,48}. A possibilidade de prever a resposta ao tratamento anteriormente à sua aplicação poderia fazer com que os doentes com baixa resposta do tratamento fossem privados do mesmo, pois não lhes seria vantajoso^{31,36}. Para além disso, a capacidade de prever adequadamente uma boa resposta poderia alterar a vigilância subsequente com os doentes^{31,36}. Por fim, a hipótese recentemente levantada de que doentes com cancro retal cujo tumor regrediu totalmente após a radioterapia não necessitam de ser submetidos a cirurgia, reforça a importância clínica da resposta à radiação⁴⁸. O benefício para esses doentes relativamente à sua qualidade de vida seria significativo³⁶.

Os mecanismos subjacentes à radiorresistência continuam, porém, desconhecidos²². Têm sido realizados diversos estudos com o intuito de elucidar esses mecanismos e identificar quais os marcadores moleculares preditivos em câncros humanos²³.

Diversos autores têm começado a comparar a expressão de algumas proteínas em linhas celulares sensíveis e em linhas celulares resistentes à radioterapia²². No entanto, verificam-se algumas discrepâncias nos resultados obtidos com técnicas distintas. Um estudo reportou um conjunto de genes relacionados com a sensibilidade à quimiorradioterapia, de diversas linhas celulares de CCR³⁷. Os autores desse estudo identificaram os genes *signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)*, *RASSF1*, *docking protein 3 (DOK3)* e *ERBB2* como potenciais alvos para sensibilizar as células tumorais resistentes. Para além disso, comprovaram a importância da via de sinalização *mitogen-activated protein kinase (MAPK)*, bem como as vias da insulina e Wnt.

Foi demonstrado noutro estudo que a via de sinalização *phosphoinositide 3-kinase (PI3K)* está associada à radiorresistência *in vitro* e *in vivo* em diversos câncros humanos, como da laringe, do colo do útero, da cabeça e pescoço, da bexiga, do cólon e da mama²². Alguns autores provaram que proteínas relacionadas com a apoptose podem prever uma regressão tumoral e sobrevivência sem doença após quimiorradioterapia no cancro retal²³. A família de proteínas *B-cell lymphoma (BCL-2)* desempenha um importante papel na capacidade de uma célula entrar em apoptose após irradiação⁴¹. Os membros da família BCL-2 anti-apoptóticos estão significativamente associados a tumores radiorresistentes. A sua sobre-expressão pelas células tumorais pode constituir um bloqueio à apoptose induzida pela radioterapia. Dessa forma, o tumor torna-se relativamente radiorresistente. A associação da proteína específica BCL-2 (anti-apoptótica) com radiorresistência também está bem documentada²². Parece que a inibição da BCL-2 e a restauração da via de sinalização da P53 representam uma estratégia promissora para superar a resistência à quimiorradioterapia de células tumorais⁴⁰. A inativação do gene *TP53* tem contribuído para a resistência ao tratamento *in vitro* e *in vivo*⁴⁸. Esta observação sugere que a quimiossensibilidade e a radiosensibilidade no cancro retal podem ser negativamente moduladas por mutações no gene *TP53*. Diversos estudos demonstraram uma associação significativa entre a expressão da P53 e a radiosensibilidade do cancro retal. A proteína P53 é considerada por muitos autores a guardiã do genoma, uma vez que desempenha uma função determinante – regula os *checkpoints* em G1/S e G2/M do ciclo celular. Mais especificamente, a P53 detecta células lesionadas ou mutadas, que pretendem entrar em divisão celular, iniciando

uma via de sinalização que leva à eliminação dessas células através de apoptose^{7,35}. No entanto, outros autores não confirmaram esta correlação. A p21 também constitui um marcador de radiosensibilidade tumoral em doentes com cancro retal⁴⁸. A p21 é ativada pela P53 após dano celular devido a radiação, levando a célula a entrar em apoptose³¹. No entanto, a expressão de p21 está muito diminuída nas células tumorais que resistem à radioterapia. Em três de quatro estudos, a expressão desta proteína indicou uma associação com a resposta demonstrada à terapêutica.

Considera-se que o desequilíbrio existente entre as ROS e os mecanismos de defesa antioxidantes é relevante para a carcinogénese e para as respostas ao tratamento³⁵. Para além disso, diversos estudos têm demonstrado que a sobre-expressão de peroxirredoxina I aumenta a resistência ao stresse oxidativo e, pelo contrário, o seu silenciamento conduz a um aumento da sensibilidade à radiação³⁵.

A capacidade de cada tecido em reparar o DNA lesado pode alterar a resposta à radioterapia, como referido anteriormente³⁹. Uma fraca capacidade de reparação nos tecidos favorece a carcinogénese, mas pode assegurar a sensibilidade do tumor ao fármaco ou tratamento ionizante. Tumores com instabilidade de microssatélites parecem ter um melhor prognóstico do que tumores com sistemas de reparação intactos³¹. Outro aspeto relevante no que diz respeito à resistência à quimiorradioterapia é a hipoxia tumoral. A hipoxia tumoral pode desencadear resistência ao privar as células de oxigénio, essencial para as ações citóticas destes tratamentos³¹. A hipoxia tumoral também promove a estimulação de fatores de sobrevivência angiogénicos e tumorais, aumentando a proliferação, a radiorresistência e a angiogénese³¹.

A desregulação da sinalização do recetor do fator de crescimento epidérmico (do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) constitui um dos mecanismos de resistência elevada a agentes citotóxicos como a radioterapia, pois esta proteína possui um papel determinante no crescimento tumoral, regulando a proliferação celular, angiogénese, invasão e metastatização^{7,39,49-51}. Níveis elevados de EGFR foram associados a uma diminuição da capacidade de indução de regressão tumoral por parte da radioterapia. A radiação demonstrou ser menos eficaz na inibição do crescimento das células com níveis elevados de EGFR do que em células com níveis baixos de EGFR. Os níveis de expressão de EGFR parecem pois estar correlacionados de forma significativa com a radiorresistência apresentada pelo tumor. No entanto, Shin *et al.* e Lamas *et al.* salientaram o facto de essa associação não estabelecer necessariamente uma relação causal, uma vez que outros fatores, quer genéticos quer epigenéticos, também demonstram estar envolvidos na sensibilidade das células tumorais à radioterapia^{39,50}. A exposição das células tumorais à radiação

ionizante pode ativar o EGFR e, conseqüentemente, ativar a sua via de transdução de sinal. Alguns autores demonstraram que essa ativação se devia aos níveis elevados da fosforilação de substratos, incluindo RAF1 e MAPK. Mais ainda, a ativação da sinalização do EGFR parece estar associada a uma proliferação celular aumentada entre frações de radiação e esta proliferação é devida à repopulação de células tumorais durante a radioterapia fracionada.

Outra molécula com interesse é a ciclo-oxigenase 2 (COX-2), uma vez que as células tumorais utilizam a COX-2 para produzir prostaglandinas – em especial a prostaglandina E2 – após exposição a radiação³¹. As prostaglandinas são utilizadas pelas células tumorais como fatores de sobrevivência, protegendo-as contra a morte celular induzida por radiação³¹. Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a inibição da COX-2, em combinação com radiação, aumenta significativamente a resposta tumoral, bloqueando a liberação de prostaglandinas³¹. Doentes com sobre-expressão de COX-2 apresentaram pior resposta à terapêutica quando comparados com doentes com expressão normal de COX-2³¹. A sobre-expressão de COX-2 foi associada a uma pior resposta à terapêutica e, por conseguinte, a um prognóstico desfavorável. Noutro estudo onde se avaliou a expressão de COX-2 em tumores irradiados e não-irradiados, foi demonstrado que tumores irradiados com expressão aumentada de COX-2 estão associados a níveis reduzidos de apoptose⁵². Por outras palavras, uma expressão elevada de COX-2 diminui a apoptose induzida pela radioterapia. Para além disso, tumores irradiados com níveis elevados de COX-2 apresentaram maior taxa de recorrência à distância⁵². Estes dados indicam que a avaliação da expressão de COX-2 após tratamento com radioterapia poderá ser útil para identificar doentes com mau prognóstico⁵². A adição de inibidores da COX-2 a radioterapia neoadjuvante poderá contribuir para a redução de recorrências à distância e melhorar a sobrevivência dos doentes⁵².

A atividade proliferativa aumentada está associada a um maior potencial maligno no CCR⁴⁸. As células proliferativas têm maior capacidade de resposta aos danos causados pela radiação e tumores com diferentes índices proliferativos podem responder de forma distinta à radioterapia. As observações sobre o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (que como o próprio nome indica, é um marcador de proliferação celular) são contraditórias, sendo que uns autores afirmam não existir associação entre o PCNA e a resposta à radioterapia neoadjuvante, enquanto outros demonstraram que a expressão de PCNA diminuiu após o tratamento^{48,53}.

O fator de crescimento do endotélio vascular (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) é o principal promotor de angiogénese no CCR⁷. A sua sobre-expressão tem sido identificada em cerca de 50% dos casos. A maioria dos estudos

sobre o envolvimento do VEGF no CCR sugere que está associado a um prognóstico adverso⁷.

Um estudo que comparou a expressão de componentes do proteossoma 26S em linhas radiorresistentes derivadas de linhas parentais sensíveis à radioterapia concluiu que as primeiras demonstravam uma expressão diminuída dos componentes do proteossoma 26S relativamente às segundas²².

Existem estudos que demonstram que a expressão de peroxirredoxina I pode ser responsável pela resistência à quimioterapia e à radioterapia em doentes com cancro³⁵. Relativamente ao cancro retal, a expressão de peroxirredoxina I demonstrou ser elevada e estar associada a uma resposta fraca à quimioterapia e radioterapia³⁵. Para além disso, a supressão da proteína levou à inibição do crescimento tumoral quer em estudos *in vitro* quer em experimentação animal³⁵.

Alguns estudos apontam para que a anexina e a survivina possuam algum envolvimento na resistência demonstrada por alguns tumores à terapêutica³⁸. A sobre-expressão de survivina foi associada a uma taxa diminuída de apoptose em doentes com cancro retal avançado, submetidos a quimiorradioterapia³⁸. Esta proteína demonstrou ainda expressão diferenciada no tecido tumoral de doentes com boa capacidade de resposta e de doentes com má capacidade de resposta após quimiorradioterapia.

Outro foco de interesse prognóstico no CCR é a presença de células tumorais circulantes⁷. Recentemente a sua deteção na circulação sanguínea tem sido alvo de estudos⁷.

Em suma, são diversas as moléculas relacionadas com a sensibilidade e com a resistência à radioterapia. No entanto, na prática clínica ainda nenhuma é utilizada como alvo terapêutico devido à inexistência de métodos validados para a avaliação da radiosensibilidade do CCR. Dessa forma, a pesquisa de marcadores moleculares e a sua identificação como alvos para sensibilizar os tumores colorretais *a priori* resistentes é de extrema importância para direcionar a melhor abordagem terapêutica para os doentes com este cancro.

2. Objetivos

A presente tese tem como objetivo geral identificar marcadores moleculares preditivos de resistência à radioterapia no CCR. Para podermos concretizar este objetivo geral, foram formulados os seguintes objetivos secundários:

- Estabelecer linhas celulares humanas de CCR resistentes à radioterapia;
- Avaliar a resposta das linhas radiosensíveis e radorresistentes após exposição a radioterapia e a quimiorradioterapia;
- Estabelecer um protocolo para caracterizar o perfil de expressão proteica das linhas sensíveis e resistentes à radioterapia;
- Estabelecer um modelo animal de CCR radorresistente;
- Avaliar a resposta à terapêutica em modelos animais com xenotransplante com as linhas celulares sensíveis e resistentes à radioterapia.

3. Material e Métodos

3.1 Estudos *In Vitro*

As linhas celulares apresentam muitas características de tumores primários, nomeadamente perfis genómicos e transcriptómicos³⁷. Por este motivo, as linhas celulares são atualmente válidas como modelos *in vitro* para estudos de oncobiologia³⁷. Investigações recentes têm demonstrado o valor de culturas celulares na predição de radiosensibilidade e na resposta a agentes quimioterápicos como o 5-FU³⁷.

Embora se saiba que as culturas celulares não permitem a avaliação e/ou perceção do ambiente extracelular nem a interligação entre os vários sistemas dos organismos vivos, estas possuem grande replicabilidade e constituem uma forma de substituição muito importante em investigação.

3.1.1 Caracterização das Linhas Celulares

Nesta tese foram utilizadas duas linhas celulares de CCR – a linha celular WiDr e a linha celular C2BBe1. Ambas as linhas celulares foram obtidas na *American Type Culture Collection* (ATCC®).

A linha celular WiDr (ATCC® CCL-218™) foi estabelecida a 26 de maio de 1971, a partir de uma porção de adenocarcinoma primário do cólon retosigmóide removida de uma doente com 78 anos^{54,55}. Esta linha celular tem sido amplamente utilizada para estudos de tumorigénese⁵⁵. As células possuem morfologia epitelial e foi identificada a expressão de diversos antigénios leucocitários humanos (HLA) A e B^{54,55}. Para além disso, sabe-se que expressa o CEA, o antigénio específico do cólon (CSAp) e o fator de crescimento de transformação beta (TGF-β)⁵⁴. Foi ainda verificada marcação positiva para queratina através de imunocitoquímica⁵⁴. As células apresentam ainda EGFR e expressam o gene *TP53*, sendo que a P53 traduzida possui uma mutação G→A, resultando em Arg→His na posição 273⁵⁴. Mais ainda, a linha celular WiDr apresenta tumorigenicidade na maioria dos animais inoculados^{54,55}.

Por sua vez, a linha celular C2BBe1 (ATCC® CRL-2102™) constitui um clone da linha celular Caco-2 (ATCC® HTB-37™)⁵⁴. O clone foi criado em 1988, a partir de uma seleção de células com homogeneidade morfológica e com exclusiva localização apical das vilosidades⁵⁴. Estas células foram estabelecidas a partir de biópsia de um homem de raça caucasiana com 72 anos, com adenocarcinoma colorretal⁵⁴. Tal como na linha celular WiDr, as células C2BBe1 possuem morfologia epitelial⁵⁴. Formam uma monocamada polarizada com bordo apical em forma de escova, comparável ao observado no cólon humano⁵⁴. As células expressam níveis substanciais de miosina I

pertencente aos bordos em forma de escova, semelhantes aos dos enterócitos humanos⁵⁴. Também expressam o EGFR⁵⁴.

3.1.2 Manutenção Celular

Ambas as linhas celulares foram mantidas em cultura aderente, de acordo com as indicações do fornecedor. Para todos os procedimentos as linhas celulares WiDr e C2BBe1 foram mantidas a 37°C numa incubadora (Binder®), com atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de dióxido de carbono. Para além das condições ambientais ideais, foi necessário assegurar condições de assepsia rigorosas e utilizar meio de cultura apropriado. O meio usado foi *Dulbecco's Modified Eagles's Medium* (DMEM, Sigma Aldrich®), suplementado com soro bovino fetal (do inglês *Fetal Bovine Serum*, FBS, Ref. F7524, Sigma®) a 10%, piruvato de sódio a 100 µM (*Sodium Pyruvate*, Ref. 11360-039, Gibco®) e antibiótico a 1% (*Antibiotic Antimycotic Solution*, Ref. A5955, Sigma Aldrich®). O meio de cultura foi filtrado em unidades de filtração autoclaváveis (Thermo Scientific™ Nalgene™), armazenado em frascos autoclaváveis (Schott DURAN), testado antes de usado, por forma a evitar contaminações por microrganismos nas culturas celulares, e armazenado a 4°C até à sua utilização.

As subculturas de ambas as linhas estudadas foram efetuadas quando os frascos de cultura atingiram uma confluência de 80-90%. Tratando-se de células de propagação aderente, foi necessário destacar as células dos frascos de cultura. Para isso, removeu-se o meio de cultura dos frascos e procedeu-se a uma lavagem com solução salina de tampão fosfato (do inglês *Phosphate Buffer Saline*, PBS) (1X), composto por cloreto de sódio a 137 mM (Ref. 746398, Sigma®), cloreto de potássio a 2,7 mM (Ref. P9333, Sigma®), fosfato de sódio monohidratado a 10 mM (Ref. 131965.1211, Panreac) e fosfato de potássio monobásico a 1,8 mM (Ref. P0662, Sigma®) com pH=7,4. Adicionaram-se 2 mL de uma solução de tripsina e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 0,25% (*Trysin-EDTA solution*, Ref. T4049, Sigma Aldrich®) aos frascos de 75 cm² (médios) (Ref. CORNING Flask 430641, Corning) e 1 mL da mesma solução aos frascos de 25 cm² (pequenos) (Ref. CORNING Flask 430639, Corning), durante aproximadamente 5 minutos, a 37°C. A enzima tripsina é proteolítica, clivando ligações entre células e entre as células e a matriz extracelular. Para verificar se as células se encontravam destacadas, os frascos foram observados ao microscópio ótico (Eclipse TS 100, Nikon). Posteriormente adicionou-se meio de cultura para inativar a tripsina, num volume 2 a 3 vezes superior ao volume da solução de tripsina-EDTA. As suspensões celulares foram divididas por

um número de frascos adequado, consoante os estudos a realizar, e adicionou-se meio de cultura novo até perfazer o volume adequado.

Para a execução dos estudos *in vitro*, foi sempre necessário proceder à contagem das células, usando o método do azul de tripano. Para isso adicionou-se azul de tripano a uma alíquota de cada suspensão celular, colocando-a numa câmara *Neubauer* (Hirschmann® Techcolor). A câmara foi colocada na platina do microscópio ótico e contabilizaram-se as células vivas dos quatro quadrantes da câmara *Neubauer*, representado na Figura 8.

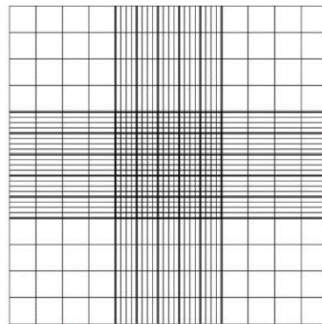


Figura 8 - Esquema representativo dos quadrantes utilizados para a contagem do número de células vivas.

A partir da contagem realizada, preparam-se suspensões celulares com as concentrações pretendidas, ajustando o volume com meio de cultura novo para cada estudo.

3.1.3 Indução de Resistência à Radioterapia

Por forma a obter linhas celulares resistentes à radioterapia, derivadas das linhas celulares nativas WiDr e C2BBe1, foi necessário proceder à irradiação das duas linhas em frascos de cultura pequenos com raios-X, segundo a adaptação de um método utilizado por Smith *et al.*²². Tendo por base os protocolos de irradiação fracionada aplicados nos tratamentos de doentes oncológicos, a cada linha celular foi administrada uma dose de 2 Gy, em frações cumulativas ao longo de várias semanas. Nesse sentido, a linha celular WiDr foi submetida a 10 frações cumulativas de 2 Gy, num período de 10 semanas e a linha celular C2BBe1 foi submetida a 18 frações cumulativas de 2 Gy, num período de 20 semanas.

Os frascos foram preenchidos com meio de cultura até ao topo, para eliminar a presença de ar nos mesmos, imediatamente antes da irradiação²². A irradiação foi realizada no Serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra por Especialistas em Física Médica, num acelerador linear Varian Clinac 600 C (*Varian*

Medical Systems, Estados Unidos da América (EUA)) com um feixe de fótons de 4 MV, utilizado na rotina clínica para tratamento.

Por forma a irradiar os frascos, é necessário o seu acondicionamento numa caixa para irradiação especialmente desenhada para o efeito. Esta caixa foi construída no Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e tem sido utilizada para estudar os efeitos da radioterapia em culturas celulares. A caixa é feita de acrílico e as suas paredes possuem 1 cm de espessura. As dimensões da caixa e as referências de posicionamento que possui permitem garantir condições de posicionamento e acondicionamento reproduzíveis bem como garantir a homogeneidade da dose de radiação⁵⁶. Inicialmente foi necessário realizar um estudo dosimétrico, tendo sido realizada uma tomografia computadorizada (TC) à caixa para irradiação. Foi feito um planeamento tridimensional utilizando o sistema de planeamento *Eclipse™* (*Varian Medical Systems*, EUA), para garantir uma homogeneidade de distribuição da dose de radiação. As dimensões da caixa para irradiação e do campo de irradiação (40 cm x 40 cm), bem como a distância da fonte do feixe ao centro da caixa permitem calcular o tempo de irradiação necessário para administrar a dose pretendida, sendo este tempo medido em unidades de monitor (MU, do inglês *Monitor Units*). A Figura 9 demonstra o planeamento tridimensional descrito baseado em TC de planeamento, assim como o perfil da dose administrada na irradiação celular.

Para se proceder à irradiação de células, a caixa para irradiação é inicialmente colocada na mesa de tratamento. Os frascos que contêm as células são colocados dentro da caixa e o espaço vazio restante é preenchido com água destilada, previamente aquecida a 37°C. De seguida procede-se ao posicionamento da caixa utilizando as referências de posicionamento e um sistema ortogonal de *lasers* presente na sala de tratamento, utilizados como referência. A administração da dose pretendida é feita com recurso a dois campos laterais, posicionando-se a *gantry* a 90° e 270°, de modo a garantir uma distribuição de dose homogênea, de acordo com o planeado. As MU necessárias para a irradiação celular com a dose de 2 Gy encontram-se representadas na Tabela 3.

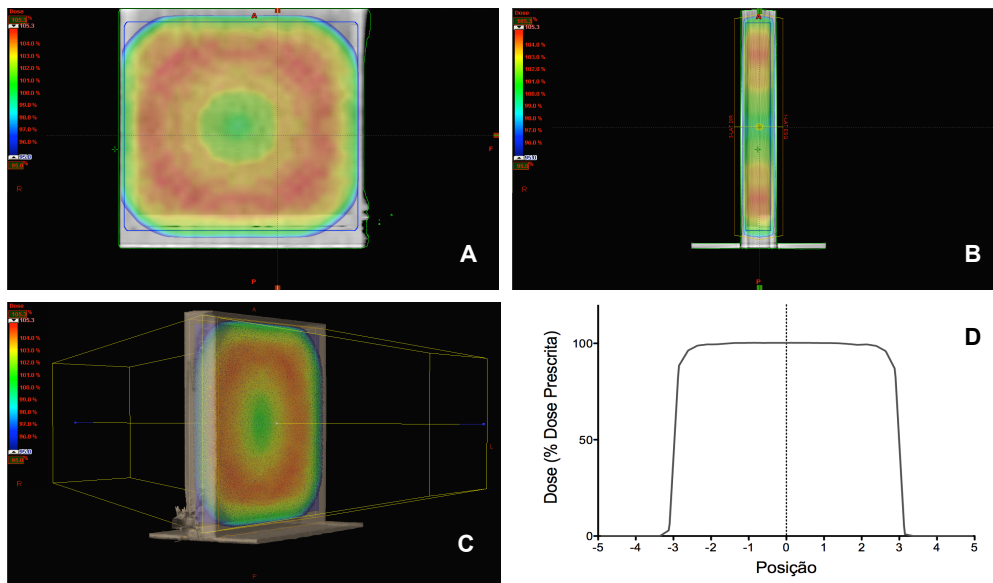


Figura 9 – Planejamento realizado para irradiação das células: (A) representação lateral, (B) representação frontal e (C) representação tridimensional da caixa para irradiação. A distribuição de dose encontra-se representada por esquema de cor, variando de um mínimo de 95% (azul) a um máximo de 105,3% (vermelho); (D) perfil de dose administrada ao longo da espessura da caixa.

Tabela 3 - Esquema representativo da administração da dose 2 Gy às células, tendo em conta o posicionamento da *gantry* do acelerador linear.

Dose total administrada (Gy)	Posicionamento da <i>gantry</i>	
2	90°	270°
	93 MU	92 MU

À medida que se obtiveram células com 1 fração de 2 Gy, 2 frações de 2 Gy e assim sucessivamente, essas células foram sendo mantidas em cultura, tal como as linhas nativas que lhes deram origem. A Tabela 4 ilustra as designações atribuídas às linhas que foram mantidas em cultura, ao longo das semanas de indução de resistência.

Tabela 4 - Esquema representativo das sucessivas linhas celulares com doses cumulativas mantidas em cultura, após irradiação com 2 Gy ("X" é representativo das duas linhas parentais WiDr e C2BBe1).

Designação da Linha Celular	N.º de Frações Cumulativas de 2 Gy	Dose Cumulativa (Gy)
X/1r	1	2
X/2r	2	4
X/3r	3	6
X/4r	4	8
X/5r	5	10
...
X/10r	10	20

3.1.3.1 Avaliação da Resposta das Linhas Celulares à Radioterapia

A avaliação da resposta das linhas celulares à radioterapia foi feita com a realização de ensaios clonogénicos. O ensaio clonogénico permite avaliar a capacidade das células em estudo formarem colónias²⁵. Células que possuem esta capacidade são designadas por células clonogénicas e consideram-se colónias grupos com 50 ou mais células num determinado ambiente de crescimento²⁵.

Após um período de tempo estabelecido para a avaliação da resposta, as colónias formadas são contadas e determina-se a eficiência da placa e o fator de sobrevivência, de acordo com a Equação 1 e a Equação 2, respetivamente^{50,57}:

$$Eficiência\ da\ placa\ (EP)(\%) = \frac{Número\ de\ colónias\ contadas}{Número\ de\ células\ distribuído\ por\ poços} \times 100 \quad (Eq.\ 1)$$

$$Fator\ de\ sobrevivência\ (FS)(\%) = \frac{EP\ da\ placa\ com\ tratamento}{EP\ da\ placa\ controlo} \times 100 \quad (Eq.\ 2)$$

Através dos resultados obtidos, é possível estabelecer uma curva de sobrevivência celular que relaciona o fator de sobrevivência com a dose de radiação²⁵. Dessa forma, é possível avaliar a resposta da linha celular nativa e das linhas celulares derivadas no que diz respeito à sua resposta a diferentes doses de radiação (administradas numa só fração).

Os resultados dos ensaios clonogénicos foram ajustados a um modelo linear quadrático, de acordo com a Equação 3:

$$FS = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde D corresponde à dose administrada e α e β correspondem aos parâmetros linear e quadrático, respetivamente. Os dados experimentais podem, no entanto, ajustar-se melhor a um modelo de um só alvo e um só toque, onde $\beta = 0$, caracterizado por curvas de sobrevivência exponenciais. De acordo com este modelo, o cálculo da sobrevivência é feito segundo a Equação 4:

$$FS = e^{-\frac{D}{D_0}} \quad (\text{Eq. 4})$$

onde D_0 representa a dose letal média.

No contexto do presente trabalho, prepararam-se suspensões celulares das linhas celulares nativas, C2BBe1 e WiDr, e das linhas celulares derivadas, WiDr/1x e C2BBe1/1x e assim sucessivamente, ao longo das semanas de indução de resistência, com uma concentração de 500.000 células/mL em microtubos (Eppendorf®) de 1,5 mL de volume, após destacamento das células dos frascos de cultura (como descrito na secção 3.1.2). Os tubos foram devidamente identificados com o nome da linha e com a dose de radiação a administrar e posteriormente irradiados com doses únicas de 2, 4, 6, 8 e 10 Gy de raios-X, exceto o tubo controlo, de acordo com o esquema ilustrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Esquema representativo da administração das doses 2 a 10 Gy, tendo em conta o posicionamento da *gantry* do acelerador linear.

Dose a administrar (Gy)	Posicionamento da <i>gantry</i>	
	90°	270°
2	93 MU	92 MU
4	185 MU	185 MU
6	278 MU	277 MU
8	370 MU	370 MU
10	463 MU	462 MU

Após a irradiação, um determinado número de células foi distribuído por poços em placas quadruplicadas de seis poços (Ref. costar® 3516, Corning) para células aderentes, como ilustrado na Figura 10, adicionando-se 3 mL de meio de cultura a cada poço.

As placas foram mantidas na incubadora a 37°C e no quinto dia procedeu-se à mudança do meio de cultura dos poços. No décimo segundo dia de incubação, removeu-se o meio de cultura dos poços, lavou-se cada poço com solução de PBS (1X), garantindo uma completa remoção do meio de cultura, e adicionaram-se 2 mL de metanol a 100% (Ref. 20847.360, VWRProlabo®), durante 5 minutos à temperatura ambiente. A incubação com metanol a 100% foi repetida uma vez, para promover uma correta fixação das células. De seguida, removeu-se o metanol a 100% e adicionaram-se 2 mL de solução de violeta de cristal (Ref. C3886, Sigma-Aldrich®) a 0,5% em metanol durante 5 minutos à temperatura ambiente, para corar as colónias formadas. Após coloração das colónias, a solução corante foi aspirada e as placas foram lavadas com água tépida para remover o excesso de corante. Deixaram-se secar as placas à temperatura ambiente para se proceder à contagem das colónias. Posteriormente efetuaram-se os cálculos da eficiência das placas e do fator de sobrevivência.

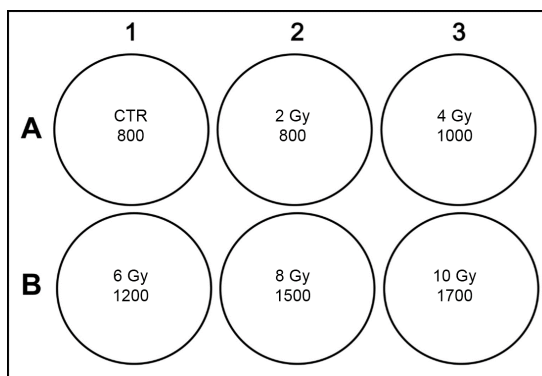


Figura 10 - Esquema ilustrativo das placas de 6 poços utilizadas para distribuir as células. Cada poço corresponde a uma condição – CTR, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy e 10 Gy; e o valor em baixo corresponde ao número de células colocadas em cada poço, que aumenta com a dose de radiação administrada uma vez que se prevê que as células submetidas a uma dose mais elevada morrem em maior número.

3.1.4 Tratamento de Radioterapia e Quimiorradioterapia nas Linhas Celulares Radiossensíveis e Radiorresistentes

De modo a caracterizar e comparar as linhas celulares sensíveis, C2BBe1 e WiDr, e resistentes à radioterapia, WiDr/6x e WiDr/10x (obtidas pelos procedimentos anteriormente descritos), avaliou-se a resposta à radioterapia e à quimiorradioterapia. Para tal estudou-se a atividade metabólica e a capacidade em formar colónias. Também se estudou a viabilidade/morte celular, a capacidade de formação de ROS, a presença de defesas antioxidantes e o potencial de membrana mitocondrial. As condições de tratamento de radioterapia e de quimiorradioterapia utilizadas nos estudos referidos estão esquematizadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Condições de tratamento utilizadas nos estudos *in vitro* para caracterizar o comportamento das linhas celulares sensíveis e resistentes à radioterapia, após tratamento com radioterapia isolada (RT) e com quimiorradioterapia (QRT).

Condições de estudo					
Sem tratamento (CTR)	RT		QRT		
		2 Gy	10 Gy	5-FU (20 µM)	5-FU (20 µM) + 2 Gy (3 horas após)

3.1.4.1 Ensaio do MTT

O ensaio de sobrevivência celular que utiliza o sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil)tetrazólio (MTT) é comumente usado para avaliar o crescimento de culturas celulares sujeitas a um determinado tratamento²⁵. O sal MTT, solúvel em água, é reduzido pelas células metabolicamente ativas, levando à formação de cristais de formazano de cor violeta⁵⁷. Após a realização do tratamento, as células são incubadas de modo a permitir a sua proliferação num certo período de tempo. A adição do sal MTT promove a reação de redução, desencadeada por desidrogenases mitocondriais. Como os cristais de formazano formados são insolúveis em soluções aquosas, adicionam-se solventes orgânicos para posterior quantificação dos mesmos⁵⁷. Os valores de absorvância obtidos estão relacionados com o número de células metabolicamente ativas⁵⁷.

A realização do ensaio do MTT teve como finalidade avaliar a atividade metabólica das linhas celulares nativas e derivadas após radioterapia e quimiorradioterapia. Para o efeito, foi necessário administrar 5-FU (Ref. F6627, Sigma[®]) às linhas celulares C2BBe1, WiDr, WiDr/6x e WiDr/10x para o tratamento de quimiorradioterapia. O meio de cultura dos frascos foi aspirado, lavaram-se os frascos com 3 mL de solução de PBS (1X) para remover completamente o meio de cultura e células mortas e adicionaram-se 8 mL de meio de cultura. O fármaco 5-FU foi administrado numa concentração de 20 µM, com o auxílio de uma micropipeta (VWR[®]). Segundo Shelton *et al.* este valor corresponde a uma concentração de radiosensibilização⁵⁸. O intervalo de tempo entre a exposição das células ao 5-FU e a irradiação foi de 3 horas, tal como realizado por Khalaj *et al.* e por Abdi *et al.*^{59,60}.

Após a exposição ao fármaco, foram preparadas suspensões celulares de todas as linhas celulares de interesse. Em primeiro lugar, procedeu-se ao destacamento das células dos frascos de cultura, como descrito previamente. As suspensões celulares foram colocadas em microtubos numa concentração de 400.000 células/mL, num volume de 1,5 mL. Cada microtubo foi devidamente identificado com o tratamento a aplicar. Nesta fase foram preparados microtubos para

quimiorradioterapia e radioterapia, a partir de frascos de cultura independentes. Seguidamente, os tubos foram irradiados com as doses 2 e 10 Gy, da forma descrita na secção 3.1.4.

Após a irradiação colocou-se um volume de 100 µL de cada suspensão celular, por forma a obter uma concentração de 80.000 células/mL, em três poços de placas de 48 poços (Ref. costar[®] 3516, Corning), adicionando de seguida 400 µL de meio de cultura. A distribuição das suspensões celulares está representada na Figura 11.

A análise da atividade metabólica foi realizada 24, 48, 72 e 96 horas após a irradiação das suspensões celulares. Terminados os períodos de tempo estabelecidos, removeu-se o meio de cultura dos poços e lavou-se cada poço com 500 µL de solução PBS (1X). De seguida, colocaram-se 100 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL) (Ref. M2128, Sigma[®]) em PBS, previamente aquecida a 37°C no banho-maria (Ref. 11005005, GFL[®]), em cada poço com o auxílio de um dispensador (Eppendorf[®]) e incubaram-se as placas no escuro a 37°C durante, pelo menos, 4 horas. Após a formação de cristais de formazano em todos os poços adicionaram-se 100 µL de solução de isopropanol ácido (constituída por 3,34 mL de ácido clorídrico 37% fumante (Ref. 258148, Sigma[®]) e 996,66 mL de isopropanol (Ref. 278475, Sigma[®])) a cada poço e colocaram-se as placas num agitador próprio (*Diagnostic Products Corporation*) o tempo suficiente para a solubilização dos cristais. O conteúdo de cada poço foi posteriormente homogeneizado e transferido para uma placa de 96 poços (VWR[®]) para posterior leitura no espectrofotómetro (Biotek[®] Synergy HT). A absorvância foi medida a 570 nm, com um filtro de referência de 620 nm, e os resultados da atividade metabólica foram calculados em percentagem, relativamente ao controlo.

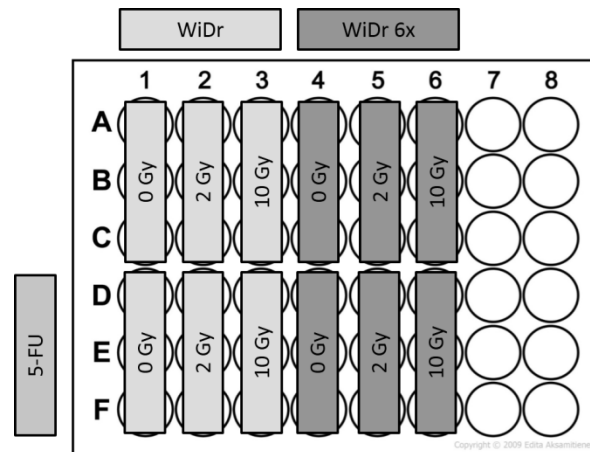


Figura 11 - Esquema representativo da preparação de placas de 48 poços para o ensaio do MTT. A título de exemplo estão representadas as duas linhas celulares WiDr e WiDr/6x. As três primeiras linhas da placa (A, B e C) correspondem às suspensões apenas irradiadas enquanto as três últimas linhas (D, E e F), correspondem às suspensões com administração de 5-FU e posterior irradiação.

3.1.5 Ensaio Clonogénico

O ensaio clonogénico foi realizado com o intuito de avaliar a capacidade de as células sensíveis e resistentes formarem colónias após exposição a radioterapia e a quimiorradioterapia. Assim, procedeu-se ao tratamento das linhas celulares C2BBE1, WiDr, WiDr/6x e WiDr/10x. Após a realização dos tratamentos, as células foram distribuídas em placas de 6 poços, consoante o número de células pretendidas por poço. No décimo segundo dia de incubação, as colónias foram coradas de acordo com o que foi descrito na secção 3.1.3.1.

3.1.6 Ensaio Cometa

Existem inúmeras técnicas para a deteção de danos no DNA, utilizadas para identificar substâncias com capacidade citotóxica⁶¹. Uma delas é o ensaio cometa, do inglês *Comet Assay* ou *Single-cell Gel Electrophoresis*⁶¹. O termo “cometa” é usado para identificar os padrões de migração do DNA de células individuais, obtidos pela técnica⁶¹.

Esta técnica foi descrita pela primeira vez em 1984 e tem sido alvo de alterações⁶¹. De um modo global, as células são embebidas em agarose e posteriormente colocadas em lâminas⁶¹. Depois de lisadas, as células são submetidas a uma eletroforese⁶¹. Células com maior quantidade de quebras nas duas cadeias da dupla hélice de DNA demonstram uma migração superior do DNA no sentido do ânodo⁶¹. A migração é quantificada pela coloração com brometo de etídeo e subsequente intensidade de fluorescência⁶¹.

Na variante da técnica que envolve uma eletroforese alcalina, com valor de pH superior a 13 (introduzida em 1988), a migração aumentada do DNA está associada a quebras de uma das cadeias da dupla hélice do DNA, severas ou associadas a regiões de incompleta reparação por excisão e a locais lábeis alcalinos⁶¹. Uma vez que a maioria dos agentes citotóxicos provoca maior número de quebras de uma das cadeias da dupla hélice do DNA do que quebras nas duas cadeias da dupla hélice, esta versão do ensaio cometa possui maior sensibilidade para a identificação de agentes citotóxicos⁶¹.

Os parâmetros comumente usados no ensaio cometa para a avaliação dos danos no DNA são o comprimento da cauda, a percentagem de DNA na cauda e o momento de cauda (que corresponde ao produto entre o comprimento da cauda e a percentagem de DNA na cauda)⁶¹.

Para verificar a presença ou ausência de danos no DNA nas células sensíveis e resistentes à radioterapia, após administração de 5-FU e subsequente irradiação e após irradiação isolada, foi realizado o ensaio cometa. Em primeiro lugar, foi necessário revestir lâminas de vidro (Starfrost[®]) com solução de agarose de ponto de fusão normal a 1% (Ref. A2790, Sigma-Aldrich[®]). Este passo foi realizado com a devida antecedência para que a solução de agarose solidificasse.

Este ensaio foi realizado imediatamente após os tratamentos, pelo que foram obtidas novas suspensões celulares de todas as condições em estudo, com uma concentração de 50.000 células/mL num volume de, pelo menos, 2 mL em microtubos devidamente identificados. Neste ensaio, preparou-se também uma lâmina de controlo positivo para garantir que o ensaio seria realizado de forma correta. Para tal, a partir da suspensão celular controlo, preparou-se uma nova suspensão onde se adicionaram 0,8 µL de solução de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (Ref. 121076, Panreac) na concentração de 20 nM por cada mililitro de suspensão celular. Homogeneizou-se a suspensão e incubou-se a 4°C durante 15 minutos. No fim da incubação, centrifugou-se a suspensão a 300 G durante 5 minutos. O sedimento foi ressuspenso em solução de PBS (1X) num volume igual ao inicial, mantendo assim a mesma concentração de células.

Preparou-se uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (Ref. A9414, Sigma-Aldrich[®]) a 1% e aqueceu-se até atingir a temperatura 37°C. Para cada condição em estudo foi necessário preparar um tubo com 500 µL de solução de agarose de baixo ponto de fusão a 1% e 500 µL de suspensão celular. Após homogeneizar, colocou-se todo o conteúdo do tubo sobre a respetiva lâmina, previamente identificada, como ilustrado na Figura 12. Logo de seguida, cobriu-se a lâmina com uma lamela. Neste passo foi de extrema importância verificar se a lamela

se encontrava paralela à lâmina. As lâminas foram incubadas a 4°C durante 30 minutos, para que a solução de agarose solidificasse. Após esse período, as lamelas foram removidas das lâminas e estas foram incubadas em solução de lise alcalina a 4°C durante a noite. A solução de lise contém cloreto de sódio a 2,5 M, EDTA a 100 mM (Ref. E9884, Sigma®), Trizma base a 10 mM (Ref. T6066, Sigma®), dimetil-sulfóxido (DMSO) a 10% e Triton X-100 a 1% (Ref. K34979403, Merck).



Figura 12 - Esquema representativo da identificação das lâminas para o ensaio cometa, com as condições CTR, CTR +, 2 Gy, 10 Gy, 5-FU, 5-FU + 2 Gy e 5-FU + 10 Gy.

No dia seguinte, as lâminas foram submersas em solução tampão de eletroforese, preparada extemporaneamente, com hidróxido de sódio a 300 mM (Ref. S5881, Sigma-Aldrich®) e EDTA a 1 mM e pH superior a 13, numa tina de eletroforese (Wide Mini-Sub® Cell GT, BIORAD). A incubação teve a duração de, pelo menos, uma hora, de modo a equilibrar as lâminas com o pH da solução de eletroforese.

A eletroforese foi realizada numa tina adequada, com 500 mL de solução tampão de eletroforese, onde se colocaram as lâminas. O programa de eletroforese teve a duração de 15 minutos, com uma diferença de potencial de 25 V e intensidade de corrente de 1 A. Após a eletroforese, as lâminas foram submersas três vezes em solução de neutralização de Trizma base a 0,4 M durante 5 minutos cada. De seguida, as lâminas foram embebidas em metanol a 100% durante 10 minutos e no fim foram armazenadas à temperatura ambiente, até ao momento de coloração e posterior visualização ao microscópio ótico.

A coloração das lâminas foi realizada com a solução de brometo de etídeo (Ref. 161-0433, BIORAD) em água ultrapura (20 µg/mL). Colocaram-se algumas gotas sobre as lâminas, garantindo que toda a superfície fosse coberta com o corante e incubou-se no escuro, à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com água ultrapura, removendo-se o excesso de corante.

A visualização das lâminas foi executada num microscópio de fluorescência invertido (moticom 5000 AE31, Moticom®), com uma ampliação de 250x, com um filtro de

excitação a 546 nm e uma lâmpada de mercúrio de 100 W. A emissão de fluorescência foi a 580 nm, com um filtro a 590 nm. A aquisição das imagens foi feita com o programa informático *Motic Images* (Versão 2) e o processamento das imagens foi efetuado no programa informático *CometScore™* (Versão 1.5).

3.1.7 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo (CF) consiste numa técnica de análise de múltiplos parâmetros de células individualizadas⁶²⁻⁶⁴. A sua aplicação ocorre maioritariamente no diagnóstico, prognóstico e vigilância de doentes com neoplasias hematológicas e linfóides^{65,66}. No entanto, também tem vindo a ser usada em investigação, visando sobretudo o estudo da sinalização celular, viabilidade e apoptose⁶⁷.

Os aparelhos utilizados – citómetros de fluxo – têm uma ampla gama de funções, como avaliação da morfologia e contagem celulares, imunofenotipagem, análise de ploidia, entre outros^{63,64}. Os dados obtidos podem ser analisados com recurso a programas informáticos de CF, reportando de forma rápida as propriedades biológicas das células.

As principais componentes do citómetro de fluxo, representadas na Figura 13, são o sistema de fluido, os lasers, o sistema ótico, os detetores e o sistema electrónico e computacional⁶⁴. O primeiro permite a passagem de todos os elementos da suspensão celular pelo *laser* e a remoção dos desperdícios (lixo e detritos celulares)⁶⁴. Os *lasers* correspondem à fonte de luz e o sistema ótico reúne e direciona a luz⁶⁴. Os detetores, como o próprio nome indica, detetam a luz dispersa pelas células aquando da sua passagem pelo feixe do laser e as componentes electrónica e computacional convertem os sinais fornecidos pelos detetores em dados digitais, permitindo a sua análise por programas informáticos⁶⁴.

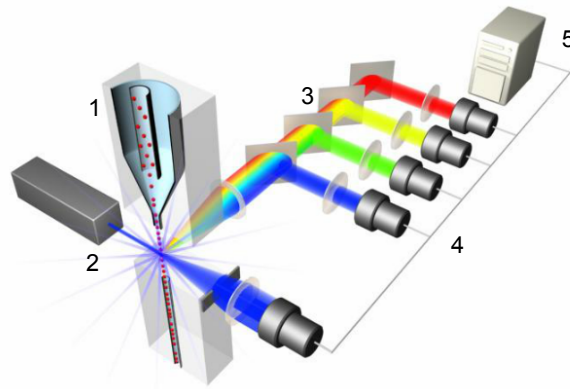


Figura 13 - Componentes do citômetro de fluxo: 1 – sistema de fluido; 2 – *laser*; 3 – sistema ótico; 4 – detectores; 5 – sistema eletrônico e computacional. Adaptado de *Fluorescence Tutorials*, Life Technologies™ 2014.

De uma forma mais detalhada, as partículas em suspensão atravessam um canal segundo um fluxo unidirecional, de modo que intersejam com o feixe do *laser* uma a uma⁶⁴. Ao passar pelo feixe, a célula/partícula dispersa luz em todos os ângulos⁶⁴. A dispersão da luz que ocorre segundo a direção do feixe – *forward scatter* – é proporcional ao tamanho da célula e este dado pode ser utilizado para quantificar este parâmetro⁶⁴. A luz dispersa é quantificada por um detetor que converte a intensidade de corrente em diferença de potencial⁶⁴. No entanto, a dispersão da luz ocorre também noutras direções⁶⁴. A essa dispersão dá-se o nome de dispersão lateral – *side scatter* – e deve-se à granularidade e à complexidade estrutural da célula⁶⁴. Esta luz é alcançada por um detetor localizado a 90° do *laser*⁶⁴. Os sinais colhidos por este detetor também podem ser analisados, fornecendo informação sobre a complexidade celular⁶⁴. Para além da dispersão frontal e lateral da luz, as células emitem fluorescência quando acopladas com anticorpos marcados com compostos fluorescentes – os fluorocromos⁶⁴. Os anticorpos são previamente adicionados à suspensão celular, ligando-se especificamente a uma determinada molécula na superfície ou no interior da célula⁶⁴. A fluorescência emitida pelos anticorpos marcados quando atravessam o feixe de luz pode ser quantificada através de detetores específicos que se encontram paralelamente ao detetor da luz dispersa lateralmente⁶⁴.

No âmbito deste trabalho, o recurso à técnica de CF teve como finalidade a avaliação da morte celular, do estado oxidação-redução e do potencial de membrana mitocondrial das linhas celulares WiDr sensíveis e resistentes à radioterapia, 96 horas após a radioterapia e a quimiorradioterapia. O número de células utilizado para cada marcação foi aproximadamente $1,0 \times 10^6$. Após os tratamentos, as suspensões celulares foram transferidas para placas de Petri (Ref. CORNING 430167, Corning), que foram colocadas na incubadora até ao dia da marcação.

3.1.7.1 Avaliação da morte celular

O tipo de morte celular pode ser avaliado de acordo com as alterações na membrana plasmática⁶⁸. Cada célula necessita de manter uma membrana plasmática intacta para preservar as suas funções fisiológicas⁶⁸. A manutenção da integridade da membrana plasmática até estádios tardios da desintegração celular constitui uma característica de morte celular por apoptose⁶⁸.

As células saudáveis possuem uma distribuição assimétrica de fosfolípidos na bicamada fosfolipídica da membrana citoplasmática⁶⁸. Os fosfolípidos de colina estão expostos na camada externa enquanto os aminofosfolípidos estão exclusivamente localizados na camada interna⁶⁸. Essa assimetria é alterada durante a morte celular por apoptose⁶⁸. Mais concretamente, a fosfatidilserina, um aminofosfolípido, muda de localização, passando a estar exposta na camada externa da bicamada fosfolipídica⁶⁸.

A análise da morte celular foi feita com recurso a dupla marcação, com anexina V (An V) e iodeto de propídeo (IP) sendo possível diferenciar morte celular por apoptose e por necrose. A morte celular por apoptose foi identificada através da marcação com An V acoplada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), com grande capacidade de ligação à fosfatidilserina. Por outro lado, a necrose foi identificada através da marcação com IP, pois este corante intercala-se no DNA, exposto em células em necrose e em apoptose tardia.

A dupla-marcação permite obter quatro grupos diferentes de células. Células vivas que, quando marcadas com An V e IP, não apresentam alteração da constituição dos folhetos da membrana citoplasmática nem permeabilização da mesma e, portanto, a fluorescência emitida é mínima⁶⁸. Por outro lado, nos estádios iniciais de apoptose, a marcação é positiva para a An V e negativa para o IP⁶⁸. Nas fases finais da apoptose, as células apresentam marcação positiva para ambas as sondas⁶⁸. As células com danos severos nas suas membranas e em estádios muito tardios de apoptose apresentam uma marcação com IP e podem não exibir marcação com An V⁶⁸. Estas classificações estão esquematizadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Esquema que evidencia os diferentes grupos de células de acordo com a dupla-marcação com Anexina V e Iodeto de propídeo. A ausência de marcação está representada por (-) enquanto a presença de marcação está representada por (+).

Classificação	Anexina V	Iodeto de propídeo
Células vivas	-	-
Células em apoptose inicial	+	-
Células em apoptose tardia/necrose	+	+
Células em necrose	-	+

Para efetuar a marcação com as sondas acima referidas, procedeu-se à separação das células e obtenção das suspensões celulares. Colocaram-se as suspensões em tubos de citómetro e centrifugaram-se a 300 G durante 5 minutos. Após a centrifugação, decantou-se o sobrenadante e adicionaram-se 100 µL de tampão de ligação (1X). Para além do tampão, adicionaram-se 5 µL de An V e 2 µL de IP (KIT Immunotech, Beckman Coulter). Homogeneizaram-se os tubos no vórtex (ZX3, VELP®SCIENTIFICA) e incubaram-se durante 15 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Após a incubação, adicionaram-se 400 µL de tampão de ligação (1X) e agitou-se suavemente no vórtex. Por último, os tubos foram armazenados a 4°C até à sua posterior leitura no citómetro de fluxo. Os resultados foram obtidos em percentagem de células em cada um dos grupos descritos na Tabela 7.

3.1.7.2 Avaliação da produção intracelular de peróxidos

Os peróxidos constituem um tipo de ROS que fornece uma indicação sobre o estado oxidativo das células. As ROS são produtos do metabolismo celular e, de acordo com a sua concentração, podem ser benéficas ou prejudiciais ao funcionamento normal das células⁶⁹. O aumento de H₂O₂, assim como de outras ROS, origina modificações oxidativas nas moléculas celulares, inibe a função proteica e promove a morte celular⁶⁹. Um método muito usado para a avaliação da produção intracelular de peróxidos é a oxidação da sonda não fluorescente 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂)⁷⁰. A sua forma acetilada, DCFH₂-DA, atravessa facilmente a membrana citoplasmática e, na presença de peróxidos, é oxidada, levando à formação de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF)⁷⁰. Este composto é fluorescente a 520 nm, quando excitado a 480 nm⁷⁰.

Para executar a marcação com DCFH₂-DA, as suspensões celulares em estudo foram colocadas em tubos de citómetro e centrifugadas a 200 G durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de solução de PBS (1X)

e 1 µL de solução de DCFH (Ref. D6883, Sigma®) na concentração de 5 mM, ficando no tubo a uma concentração de 5 µM. Homogeneizaram-se os tubos no vórtex e incubaram-se no escuro, a 37° C durante 45 minutos. Após a incubação, adicionaram-se 2 mL de solução de PBS (1X) e centrifugou-se a 300 G durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 400 µL de solução de PBS (1X). As suspensões foram homogeneizadas no vórtex. Por último, os tubos foram armazenados a 4°C até leitura no citómetro de fluxo. Os resultados foram padronizados à condição controlo, para cada linha celular, e calculou-se a razão entre a medição da condição experimental e do respetivo controlo.

3.1.7.3 Avaliação da produção intracelular do radical superóxido

O anião superóxido, tal como o H₂O₂, faz parte das ROS e é indicativo do estado oxidativo das células⁶⁹. A produção intracelular de anião superóxido é comumente avaliada com recurso à sonda de dihidroetídio (DHE)⁷¹. Este composto penetra as células e é convertido a etídio pelo anião superóxido, podendo intercalar-se com o DNA e permanecer no interior da célula⁷¹.

Relativamente à marcação, as suspensões celulares também foram colocadas nos respetivos tubos de citómetro. Realizou-se uma centrifugação de 300 G durante 5 minutos, após a qual se descartou o sobrenadante e se adicionou 1 mL de solução de PBS (1X). Adicionaram-se ainda 5 µL de solução de DHE (Ref. D7008, Sigma®) na concentração de 1 mM, de modo a que a solução no tubo ficasse com uma concentração de 5 µM. Homogeneizou-se no vórtex e incubou-se no escuro a 37°C, durante 15 minutos. Após o período de incubação, adicionaram-se 2 mL de solução de PBS (1X) e centrifugou-se a 300 G durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 400 µL de solução de PBS (1X). As suspensões foram homogeneizadas no vórtex e armazenadas a 4°C até leitura no citómetro. Os resultados obtidos foram posteriormente padronizados ao controlo, como referido na secção 3.1.7.2.

3.1.7.4 Avaliação da produção intracelular de glutatona reduzida

A glutatona representa o tiol livre mais abundante nas células eucarióticas e é responsável pela manutenção do estado oxidativo ótimo das células, possibilitando o correto funcionamento das proteínas celulares⁶⁹. É particularmente importante em oncologia, devido ao seu papel na resistência a agentes citotóxicos que danificam o DNA através da formação de ROS⁷². A glutatona protege as células ao remover radicais livres e ao reduzir H₂O₂ ou peróxidos orgânicos⁷².

A forma reduzida da glutathiona (GSH) é a forma ativa, que é oxidada durante o stresse oxidativo dando origem à glutathiona oxidada (GSSG)⁶⁹. Dessa forma, o rácio entre GSH e GSSG pode ser utilizado para avaliar a expressão de stresse oxidativo⁶⁹. Sob condições fisiológicas normais, há maior quantidade de GSH intracelular do que GSSG⁶⁹. Pelo contrário, durante stresse oxidativo e morte celular por apoptose, verifica-se uma diminuição de GSH⁶⁹.

A marcação de GSH pode ser realizada de diversas formas, sendo que uma delas consiste na utilização de um corante fluorescente designado por alaranjado de mercúrio⁷². O corante foi inicialmente usado para corar grupos sulfidril de proteínas mas, mais tarde, comprovou-se a sua reação mais rápida com a GSH⁷². A ligação que se estabelece entre a GSH e o corante dá origem a um produto que emite fluorescência vermelha quando excitado com um laser de árgon a 488 nm⁷².

De forma a avaliar a produção intracelular de GSH, procedeu-se a uma centrifugação a 300 G durante 5 minutos das suspensões celulares, previamente colocadas nos tubos de citómetro. De seguida, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de solução de PBS (1X). Adicionaram-se também 4 µL de solução de alaranjado de mercúrio (Ref. M7750, Sigma[®]) na concentração de 10 mM de modo que a concentração da solução no tubo ficasse igual a 40 µM. Homogeneizou-se no vórtex e realizou-se uma incubação no escuro a 37°C, durante 15 minutos. Adicionaram-se 2 mL de solução de PBS (1X) e centrifugou-se a 300 G durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 400 µL de solução de PBS (1X). A suspensão foi homogeneizada no vórtex e, por fim, armazenada a 4°C até à leitura no citómetro. O processamento dos dados foi feito da mesma forma descrita na secção 3.1.7.2.

3.1.7.5 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A mitocôndria é um organelo celular responsável pela sensibilização e integração de sinais de stresse celular e distúrbios mitocondriais ocorrem normalmente em fases precoces de morte celular⁶⁸. A deteção do potencial de membrana mitocondrial tem por base a utilização de sondas catiónicas lipofílicas que são metabolizadas por células vivas⁶⁸. A acumulação destas sondas na mitocôndria é medida através da intensidade da fluorescência emitida e é proporcional ao potencial de membrana mitocondrial⁶⁸. Em estádios precoces de morte celular, o potencial de membrana mitocondrial está reduzido⁷³.

Um catião lipofílico comumente usado na avaliação do potencial de membrana mitocondrial é o fluorocromo iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,18,3,3-tetraetil-benzimidazol-carbocianina (JC-1)⁷³. Quando é interiorizado pela membrana

mitocondrial pode formar monómeros, apresentando cor verde, a 527 nm, ou agregados, para um potencial de membrana mitocondrial maior, adquirindo cor vermelha, a 590 nm⁷³. Assim, o resultado do quociente entre a fluorescência verde e a fluorescência vermelha do JC-1 permite estimar o potencial de membrana mitocondrial⁷³.

Tal como descrito no ponto anterior, as suspensões celulares foram colocadas em tubos de citómetro. Efetuou-se uma centrifugação a 300 G, durante 5 minutos. De seguida, decantou-se o sobrenadante e adicionou-se a cada tubo 1 mL de solução de PBS (1X) bem como 1 µL de solução de JC-1 (Ref. T4069, Sigma®) em DMSO na concentração de 5 mg/mL, obtendo uma concentração no tubo de 5 µg/mL. Os tubos foram homogeneizados no vórtex e posteriormente incubados no escuro a 37°C, durante 15 minutos. Após a incubação, adicionaram-se 2 mL de solução de PBS (1X). Procedeu-se a uma centrifugação de 300 G, durante 5 minutos. O sobrenadante foi decantado e adicionaram-se 400 µL de solução de PBS (1X). Homogeneizou-se no vórtex e no fim os tubos foram armazenados a 4°C até leitura no citómetro. Os resultados foram apresentados como a razão entre a formação de monómeros e agregados, para cada condição.

3.1.8 Eletroforese Bidimensional

As técnicas de proteómica são utilizadas para determinar níveis de expressão de misturas complexas de proteínas e têm vindo a ser aplicadas em diversos estudos de oncologia⁷⁴. A eletroforese bidimensional (2D) representa uma técnica de proteómica valiosa e de grande resolução⁷⁵. Pode ser usada em quase todos os tipos de células eucarióticas e extratos derivados, células e organelos, fluidos biológicos, entre outros⁷⁵. Devido ao seu poder de elevada resolução, assim como à sua grande capacidade de carregamento de amostras, a eletroforese 2D permite a disposição de inúmeras proteínas num só gel, em simultâneo⁷⁵. Assim, cada gel pode demonstrar centenas ou milhares de *spots* de várias formas, tamanhos e intensidades, representando cada um, uma proteína específica⁷⁵.

De uma forma sucinta, as proteínas são separadas nos géis por focagem isoeléctrica, de acordo com os seus pontos isoeléctricos, na primeira dimensão, e por eletroforese em géis de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE), segundo a sua massa molecular, na segunda dimensão⁷⁶.

Para permitir a visualização das proteínas nos géis, são utilizados diversos corantes⁷⁶. Os mais comuns são o azul de Coomassie, corantes com nitrato de prata ou fluorescentes⁷⁶.

Os pontos de interesse dos géis são excisados e sujeitos a um conjunto de procedimentos que visam o seu posterior processamento por espectrometria de massa, para identificação das proteínas⁷⁶. Embora com algumas limitações como a dificuldade em solubilizar e analisar proteínas hidrofóbicas com pesos moleculares ou pontos isoeléctricos extremos, a eletroforese 2D constitui uma ferramenta útil para separar proteínas com modificações traducionais ou isoformas específicas⁷⁶.

Com o intuito de caracterizar o perfil proteico das linhas celulares sensíveis e resistentes à radioterapia, realizaram-se eletroforeses 2D com as linhas celulares WiDr e WiDr/10x.

3.1.8.1 Obtenção de extratos de proteínas

O método usado para preparação de amostras para posterior utilização em proteómica foi o método do ácido tricloroacético (do inglês *Trichloroacetic Acid*, TCA, Ref. T8657, Sigma-Aldrich®). Uma vez que as linhas celulares WiDr e WiDr/10x são aderentes, foi necessário descartar o meio de cultura dos frascos e lavar os mesmos com solução de PBS (1X) três vezes. Após descartar a solução de PBS (1X) da última lavagem, adicionou-se 1 mL de solução de TCA a 20% e destacaram-se as células dos frascos com o auxílio de um raspador (utilizou-se 1 mL de solução para cada frasco médio).

Após o destacamento das células, colocou-se o conteúdo de cada frasco num microtubo devidamente identificado, com uma micropipeta. Homogeneizou-se no vórtex e, de seguida, procedeu-se à sonicação das amostras dez vezes ($A=30$ kHz), cada uma durante 1 a 2 segundos, garantindo uma correta rutura das membranas citoplasmáticas. As amostras foram distribuídas por diversos tubos, de modo a adicionar-se a cada, um volume de acetona (Ref. 537748, Sigma-Aldrich®) à temperatura de -20°C quatro vezes superior ao da amostra. A acetona promove a precipitação das proteínas presentes nas amostras. A suspensão foi homogeneizada no vórtex e incubaram-se os microtubos a -80°C durante 30 minutos. Após a incubação, procedeu-se a uma centrifugação de 14.000 G, durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado com o auxílio de uma micropipeta. Repetiu-se duas vezes a adição de acetona, a homogeneização e a posterior centrifugação, com o intuito de remover o máximo de TCA presente no sedimento das amostras. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se a acetona evaporar, sem deixar que a amostra secasse demasiado. Seguidamente, ressuspendeu-se em 200 μL de solução tampão de

reidratação ReadyPrep™ 2-D Starter Kit (Ref. 163-2108, BIO-RAD) e a amostra foi colocada num só microtubo. Homogeneizou-se a amostra no vórtex e armazenou-se a -80°C até posterior utilização.

3.1.8.2 Quantificação de proteínas

A realização de uma eletroforese 2D requer a quantificação de proteínas presentes nas amostras em estudo. Para tal, recorreu-se ao Kit 2-D Quant (GE Healthcare). Inicialmente preparou-se uma curva padrão utilizando uma solução de albumina sérica de bovino (BSA) (2 mg/mL), fornecida com o Kit. Aos microtubos foram adicionados diferentes volumes: 0, 5, 10, 15, 20 e 25 µL de solução de BSA, de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8 - Esquema ilustrativo dos volumes usados para estabelecer a curva padrão da quantificação de proteína dos extratos.

Número do tubo	1	2	3	4	5	6
Volume da solução de BSA (µL)	0	5	10	15	20	25
Quantidade de proteína correspondente (µg)	0	10	20	30	40	50

Para além dos microtubos da curva padrão, preparam-se os microtubos das amostras a quantificar, com cerca de 10 µL. Adicionaram-se a cada microtubo, incluindo aos da curva padrão, 500 µL de precipitante. Homogeneizaram-se os microtubos no vórtex e incubaram-se durante 2-3 minutos à temperatura ambiente. De seguida, adicionaram-se 500 µL de co-precipitante e homogeneizou-se no vórtex. Os tubos foram centrifugados a 10.000 G durante 5 minutos, por forma a sedimentar a proteína. Após a centrifugação verificou-se a presença de sedimento e removeu-se todo o sobrenadante com auxílio de uma micropipeta. Adicionaram-se posteriormente 100 µL de solução de cobre e 400 µL de água ultrapura a cada microtubo. Homogeneizou-se seguidamente para dissolver a proteína precipitada e adicionou-se 1 mL da solução corante, previamente preparada. A solução corante é composta por uma mistura de dois reagentes do Kit – reagentes A e B –, sendo que por cada 100 µL do reagente A, deve ser adicionado 1 µL do reagente B. Agitaram-se os tubos por inversão e incubaram-se à temperatura ambiente durante 15-20 minutos. No fim, 200 µL de cada microtubo foram transferidos para uma placa de 96 poços, incluindo os microtubos para a obtenção da curva padrão, para subsequente medição da absorvância a 480 nm no leitor. Após a leitura, estabeleceu-se uma curva padrão,

através da criação de um gráfico de pontos que relacionou a absorvância com a quantidade de proteína.

3.1.8.3 Reidratação

Antes de realizar a eletroforese propriamente dita, é necessário realizar uma reidratação das *strips* (Ref. 163-2000, ReadyStrip™ IPG Strips, BIORAD) no aparelho PROTEAN® i12™ IEF cell (BIORAD). Para tal, procedeu-se inicialmente à limpeza do material, nomeadamente o tabuleiro de focagem – *focusing tray* – com uma solução de limpeza de SDS (Ref. L3771, Sigma®) a 10% e água destilada. A temperatura do laboratório foi ajustada para 20°C e o trabalho foi desenvolvido numa área limpa, evitando contaminações. Preparou-se também a solução tampão de reidratação ReadyPrep™ e descongelaram-se as *strips*. As amostras, depois de descongeladas, foram centrifugadas a 14.000 G durante 15 minutos. De cada amostra pipetou-se o volume equivalente a 20 µg de proteína. Foi necessário perfazer o volume total até atingir um volume de 125 µL, com ReadyPrep™. A amostra foi sujeita a agitação durante 30 minutos e a um breve *spin* imediatamente antes de utilizar. As amostras foram colocadas em diferentes corredores do tabuleiro de focagem. Removeu-se de cada *strip* a película protetora de plástico, com o auxílio de uma pinça. As *strips* foram colocadas em cada linha, por cima de cada amostra, sendo que o gel presente na *strip* ficou voltado para a amostra – gel *side-down*. Para além disso, a *strip* foi colocada segundo os respetivos pólos do tabuleiro. Qualquer bolha de ar foi removida e para que todo o gel ficasse submerso na amostra e agitou-se levemente o tabuleiro. Os elétrodos foram montados no tabuleiro e este foi colocado no aparelho. Adicionaram-se 4 mL de óleo mineral (Ref. 163-2129, BIORAD) às *strips*, de modo a não secarem durante o processo. Os *strip retainers* (Ref. 1646040, PROTEAN®i12™ IEF Cell IPG Strip Retainers) foram colocados sobre as *strips* e após fechar o equipamento, foi programada a reidratação, por um período de 12 horas, com uma diferença de potencial de 50 V e a uma temperatura de 20°C.

3.1.8.4 Primeira dimensão – focagem isoelétrica

Após o período de reidratação, procedeu-se à desmontagem do suporte das *strips*. Cada *strip* foi virada ao contrário, no sentido de colocar o lado do gel virado para cima – gel *side-up*. Humedeceram-se *electrode wicks* (Ref. 1646030, PROTEAN®i12™ IEF Cell Gel-Side Up Electrode Wicks) com água destilada e colocaram-se os mesmos entre as extremidades das *strips* e os elétrodos do tabuleiro de focagem. Cobriram-se novamente as *strips* com óleo mineral. Programou-se o

equipamento para a realização da focagem isométrica com diversos passos, esquematizados na Tabela 9.

Tabela 9 - Passos da focagem isométrica - primeira dimensão.

Passo	Diferença de potencial (V)	Gradiente	Intensidade de corrente (A)	Duração
1	250	Rápido	50	0:20 (h:min)
2	4000	Gradual	50	1:00 (h:min)
3	4000	Rápido	50	15.000 (V h)
4	500	-	50	-

3.1.8.5 Equilíbrio SDS

Posteriormente ao passo de focagem isométrica, reconstituiu-se a solução tampão de equilíbrio (Ref. 163-2108, ReadyPrep™ 2-D Starter Kit, Equilibration Buffer II, BIORAD), por adição de 13,35 mL de glicerol a 30% (Ref. G2025, Sigma®) e 0,5 g de iodoacetamida (Ref. 8.04744.0100, Merck). As *strips* foram removidas do tabuleiro de focagem, escorrendo o excesso de óleo mineral e colocadas num tabuleiro de equilíbrio, com o gel voltado para cima. Adicionaram-se 10 mg de *DL-Dithiothreitol* (DTT, Ref. 43815, Sigma-Aldrich®) por cada 1 mL de tampão de equilíbrio e cada *strip* foi incubada em solução tampão de equilíbrio, durante 15 minutos à temperatura ambiente com agitação leve. De seguida, adicionaram-se 40 mg de iodoacetamida por 1 mL de tampão de equilíbrio e procedeu-se a uma incubação igual à anterior.

3.1.8.6 Segunda dimensão – SDS-PAGE

Durante o período de equilíbrio das *strips*, procedeu-se à polimerização de um gel de acrilamida a 10%, para a subsequente eletroforese. O gel foi composto por 4,1 mL de água ultrapura, 3,3 mL de acrilamida (Ref. MB15601, nzy-tech) a 30%, 2,5 mL de solução de Tris-HCl a 1,5 M a pH igual a 8,8 e 100 µL de solução de SDS a 10%. Imediatamente antes da polimerização do gel foram adicionados 100 µL de solução de persulfato de amónio (do inglês *Ammonium Persulphate*, AMPS, Ref. A3678, Sigma®) e 10 µL de solução de N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina (TEMED, Ref. T9281, Sigma®). A solução foi colocada entre os dois vidros do sistema e permitiu-se a sua polimerização. Preparou-se ainda uma solução de agarose a

0,5% em tampão de eletroforese (10 mg em 2 mL), tendo sido aquecida a 100°C em banho seco.

Terminado o equilíbrio das *strips*, estas foram submersas rapidamente em solução tampão de eletroforese (Ref. P1610772, 10X Tris/Glycine/SDS, BIORAD). Após a polimerização do gel de acrilamida, adicionaram-se 5 µL de padrão de bandas (Ref. 161-0374, Precision Plus Protein™ Standards Dual Color, BIORAD), no lado esquerdo do gel. Cada *strip* foi gentilmente colocada no topo do respetivo gel, com a extremidade acídica virada para o lado esquerdo do gel e com o lado do gel voltado para a frente do sistema. A *strip* foi coberta com a solução de agarose a 0,5% em tampão de eletroforese previamente arrefecida, com cuidado para evitar a formação de quaisquer bolhas de ar, e deixou-se solidificar durante alguns minutos. Os sistemas com os géis montados foram colocados na tina de eletroforese (Mini Trans-Blot® Cell, BIORAD). Fecharam-se as tinas e procedeu-se à programação das eletroforeses, com um passo de 15 minutos, 80 V, permitindo a passagem das proteínas das *strips* para os respetivos géis, e um segundo passo de aproximadamente 2 horas, 160 V, no qual ocorre a separação das proteínas de acordo com a sua massa molecular. Após a eletroforese, os sistemas foram desmontados e identificaram-se os géis.

A par com a eletroforese 2D, realizou-se uma eletroforese unidimensional com as mesmas amostras, para verificar a sua qualidade. Para isso, foi necessário desnaturar as mesmas antes da eletroforese, através da adição de 5 µL de solução desnaturante durante 8 minutos a 100°C, no banho seco, bem como preparar mais um gel, da mesma forma descrita em cima.

3.1.8.7 Coloração dos géis

A coloração dos géis obtidos, para revelação das proteínas, foi realizada segundo o protocolo de coloração com prata de géis de *SDS-PAGE* do BIOCANT (Centro de Inovação em Biotecnologia).

Inicialmente as *strips* foram colocadas em tinas de vidro e adicionou-se uma solução de metanol a 25% e ácido acético (Ref. 33209, Sigma-Aldrich®) a 5%. Incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente e em agitação leve. Este passo teve como finalidade fixar as proteínas nos géis. A solução de fixação foi substituída pela solução de etanol (Ref. 3000, REDUR) a 50%, atuando durante 10 minutos em agitação. De seguida, descartou-se a solução e adicionou-se solução de etanol a 30%, incubada durante 10 minutos com manutenção dos géis em agitação. O passo seguinte correspondeu a um passo de sensibilização do gel, sendo que se removeu a solução anterior e se adicionou solução de tiosulfato de sódio (Ref. 217263, Sigma-Aldrich®) a 0,2 g/L durante 1 minuto. Este período de incubação

deve ser respeitado o máximo possível, pelo que imediatamente após esse tempo se descartou a solução e se procedeu a três lavagens de 5 minutos cada com água ultrapura, em agitação. Prosseguiu-se com a coloração propriamente dita, removendo a água e incubando os géis com solução de nitrato de prata (Ref. 3013308, Merck) a 2,0 g/L durante 20 minutos em agitação constante. Também foi necessário não ultrapassar o período de incubação desta solução, pelo que terminados os 20 minutos se removeu a solução de prata e se adicionou a solução de revelação de carbonato de sódio anidro (Ref. 451614, Sigma-Aldrich®) a 30 g/L, tiosulfato de sódio a 10 mg/L e formaldeído a 37% (Ref. 90240.9025, VWRProlabo®) em água ultrapura a 0,7 mL/L. Os géis permaneceram nesta solução até se verificar a presença de *spots* castanhos nos géis, correspondendo às proteínas presentes. Foi necessário um correto controlo da incubação para evitar a sobrecoloração dos géis. Para interromper a revelação, isto é, as reações entre a solução e as proteínas, removeu-se a solução e adicionou-se uma solução de Trizma base a 50 g/L em ácido acético a 2,5% durante 1 minuto em agitação. Por fim, os géis foram armazenados numa câmara fria, em sacos de plástico com fecho, contendo água ultrapura para manter os géis hidratados.

3.2 Estudos *In Vivo*

Realizaram-se estudos *in vivo* com a finalidade de reproduzir um modelo animal heterotópico de CCR resistente à radioterapia e avaliar a resposta dos xenotransplantes das linhas celulares sensível e resistente – WiDr e WiDr/10x – após tratamento com quimiorradioterapia. Os modelos animais possuem um importante papel em oncobiologia, na medida em que permitem a realização de estudos não reprodutíveis *in vitro*. A combinação de fármacos e de radiação tem vindo a ser investigada em modelos animais de CCR^{77,78,79,80}.

Todos os procedimentos descritos de seguida foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

3.2.1 Modelo Experimental

O modelo animal escolhido para a realização dos estudos *in vivo* foi um modelo de xenotransplantes subcutâneos, obtido através da inoculação de células tumorais das linhas celulares WiDr e WiDr/10x em murganhos *balb/c nu/nu*. Este modelo possui como vantagens a rapidez, a facilidade de utilização e a possibilidade de uso de células tumorais humanas.

No sentido de estudar o comportamento das linhas celulares sensíveis e resistentes à radioterapia após administração de quimiorradioterapia construiu-se um

desenho experimental com a linha nativa WiDr e a linha resistente à radioterapia WiDr/10x, com 16 murganhos *balb/c nu/nu* para cada uma das linhas. Os murganhos foram adquiridos nos Laboratórios Charles River, Inc., e submetidos a um período de quarentena, mantidos numa sala própria climatizada, sujeitos a ciclos de 12 horas de luz diárias e com acesso livre a ração para murinos *nude* (Mucedola 4RFN) e água devidamente filtrada. Os estudos tiveram início quando os animais atingiram aproximadamente 4 semanas de idade, com um peso compreendido entre 16 e 20 g, tentando estabelecer a maior homogeneidade possível.

3.2.2 Desenvolvimento de Xenotransplantes

Para a realização dos xenotransplantes procedeu-se à injeção subcutânea de 10×10^6 células tumorais em suspensão em soro fisiológico, com o auxílio de uma seringa de 1 mL (TERUMO®) acoplada de uma agulha hipodérmica de calibre 25Gx1' (TERUMO®), no dorso direito de cada murganho. Esta região anatómica permite um crescimento relativamente rápido do tumor e monitorização acessível.

Após a inoculação, procedeu-se à monitorização diária de todos os animais. Esta consistiu na medição do peso dos animais e das dimensões do tumor. A avaliação da saúde e bem-estar dos animais foi constante. O peso foi registado com recurso a uma balança digital e as dimensões tumorais foram medidas com o auxílio de um paquímetro eletrónico. O volume tumoral foi calculado segundo a Equação 5, comumente utilizada para monitorização dos animais de laboratório com xenotransplantes de células tumorais^{77,81,82}:

$$V = \frac{L \times S^2}{2} \quad (\text{Eq. 5})$$

onde V corresponde ao volume tumoral, L corresponde ao diâmetro maior do tumor e S corresponde ao diâmetro menor.

3.2.3 Desenho Experimental

Quando o volume tumoral atingiu 300 mm^3 , o período experimental teve início – D0. Para cada tipo de xenotransplante, sensível e resistente à radioterapia, estabeleceram-se 4 grupos experimentais, cada um com 4 animais: o grupo controlo, o grupo submetido a administração de 5-FU em concentração radiosensibilizante, o grupo de quimiorradioterapia com dose baixa de radiação – 2 Gy – e o grupo de quimiorradioterapia com dose elevada radiação – 10 Gy. Mais especificamente, o

grupo controlo não foi sujeito a qualquer intervenção durante o período experimental – do dia zero ao dia 20 (D0 a D20) (último dia do período experimental). Por sua vez, ao grupo submetido a administração de 5-FU isolada, procedeu-se à injeção intraperitoneal de 5-FU a 66,6 mg/kg, diluído em soro fisiológico. A concentração máxima de 5-FU tolerada por murganhos que tem sido reportada é de 100 mg/kg⁸³. Como se pretendia utilizar uma concentração com efeito radiosensibilizante, aplicou-se a proporção utilizada na prática clínica: $\frac{2}{3}$ da concentração de 5-FU administrado como único agente terapêutico (quimioterapia adjuvante isolada)¹⁸. Os dois grupos restantes foram submetidos a administração de 5-FU a 66,6 mg/kg no D0 e irradiação com 2 e 10 Gy seis horas após a administração de 5-FU, como descrito por Urick *et al.*⁷⁹.

Tal como aconteceu nos estudos *in vitro*, foi necessária a realização de uma TC ao animal para poder ser feito um planeamento com uma distribuição de dose homogénea. O animal foi anestesiado através da administração subcutânea de cetamina a 100 mg/kg (Cetamina, Hikma, 500 mg/10 mL), e foi posicionado em decúbito lateral, utilizando um sistema de imobilização construído para o efeito. Como as células foram inoculadas a nível subcutâneo os respetivos tumores são superficiais, pelo que se tornou necessário colocar um material equivalente a tecido (bólus) em contacto com o animal na localização do tumor, por forma a permitir uma deposição da dose pretendida à superfície.

Após a realização da TC, foi realizado um planeamento tridimensional utilizando o sistema de planeamento *Eclipse™* (Varian Medical Systems, EUA), por forma a ser administrada a dose prescrita de uma forma homogénea a nível do tumor. A Figura 14 ilustra o posicionamento do animal e o respetivo planeamento. De acordo com o planeamento realizado, foram determinadas as posições da mesa e da *gantry*, bem como as dimensões dos campos e as MU necessárias para administração da dose pretendida. Para a irradiação, procedeu-se à anestesia dos murganhos de acordo com o descrito anteriormente e o posicionamento e a irradiação foram realizados de acordo com o planeado.

Durante o período experimental, o volume tumoral foi estimado segundo a Equação 5, tendo sido determinado o volume tumoral relativo (VTR) segundo a Equação 6:

$$VTR = \frac{V_x}{V_0} \quad (\text{Eq. 6})$$

onde V_x corresponde ao volume tumoral no dia x e V_0 ao volume no dia inicial do período experimental.

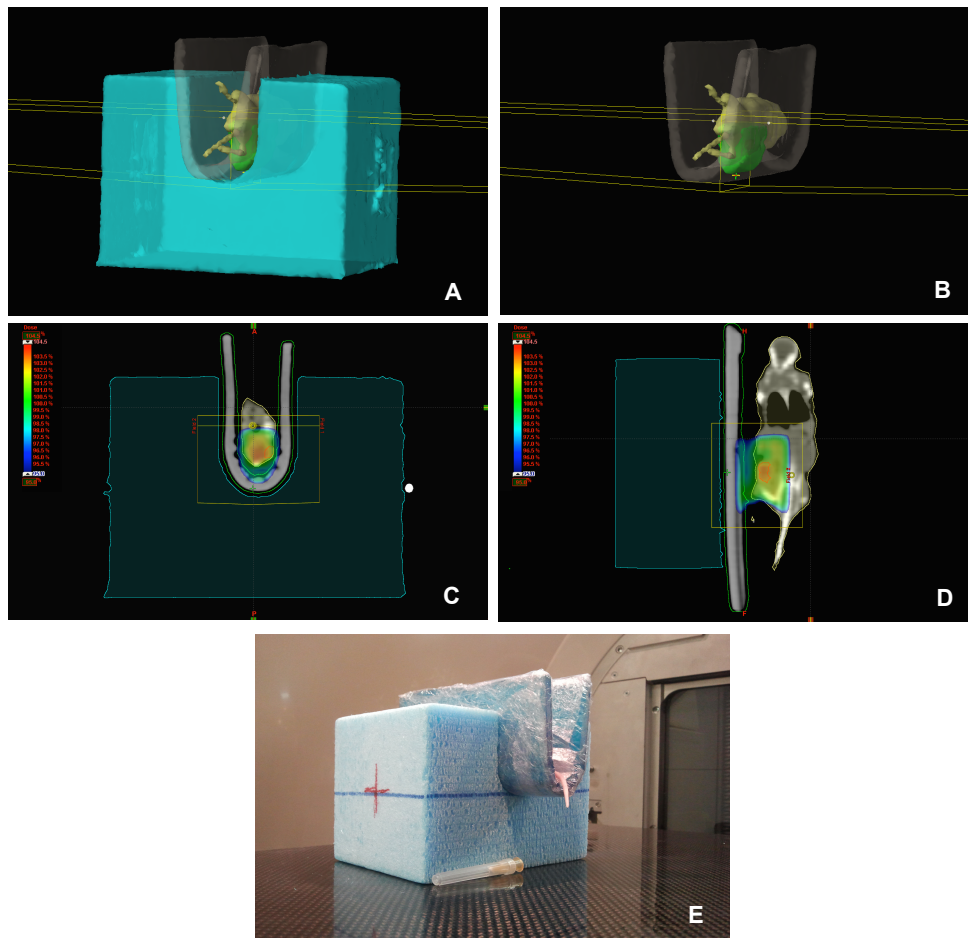


Figura 14 – Representação do planeamento para irradiação de tumores de murganços: (A e B) representação tridimensional do posicionamento do animal em decúbito lateral direito (a azul encontra-se representado o sistema de imobilização, a cinzento o bólus e a verde a isodose de 95%); (C e D) secções axial e coronal, respetivamente, a nível do tumor (a distribuição de dose encontra-se representada por esquema de cor, variando de um mínimo de 95% (azul) a 104,5% (vermelho)); (E) fotografia ilustrativa de um murganço anestesiado (cauda visível) e corretamente posicionado na mesa de tratamento para irradiação do tumor.

3.3 Estudos *Ex Vivo*

Terminado o período experimental – D20, os animais foram ocisados com a finalidade de avaliar os efeitos do tratamento e comparar o ambiente tumoral de cada linha celular. A ocisão foi executada por deslocamento cervical, procedendo-se de imediato à colheita de sangue por punção intracardíaca, com o auxílio de uma seringa acoplada de uma agulha 25G, e colheita do tumor.

3.3.1 Colheita de Sangue

A colheita de sangue teve como objetivo obter plasma sanguíneo para posterior estudo de proteínas circulantes, através de eletroforese 2D. O sangue colhido foi colocado num microtubo contendo solução de EDTA anticoagulante. De seguida,

procedeu-se a uma centrifugação de 1.800 G durante 20 minutos, para separação do plasma sanguíneo⁸⁴. O plasma foi transferido para um microtubo novo, devidamente identificado. Os microtubos com sangue e com plasma foram armazenados a -80°C até posterior utilização.

3.3.2 Colheita de Tumor

3.3.2.1 Extração de proteínas

A extração de proteínas do tumor foi feita de acordo com o protocolo de extração proteica a partir de tecido de mamífero da BIORAD (*2-D Electrophoresis Workflow How-To Guide*, 4ª Edição). Resumidamente, foi necessário triturar pequenos fragmentos de tumor em azoto líquido. Após a trituração, 60 mg do tumor em pó foram transferidos para um microtubo, onde se adicionou 1 mL de solução tampão ReadyPrep™. As amostras foram sonicadas 5 vezes (A=30 kHz), durante 2 segundos cada e incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos, homogeneizando no vórtex de tempos em tempos. Por fim, realizou-se uma centrifugação de 35.000 G durante 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, devidamente identificado, e armazenado a -80°C até posterior utilização.

3.3.2.2 Análise histológica

Aquando da ocisão, foi efetuado um registo macroscópico que incluiu a anotação do peso do tumor, as suas dimensões, a forma, a cor, o brilho, a consistência, o aspecto da superfície do tumor e da superfície da secção, bem como de todas as observações consideradas pertinentes. Após avaliação macroscópica do tumor, procedeu-se à imersão do mesmo em solução de formol tamponado a 10% (solução composta por 100 mL de formol a 37%, 900 mL de água ultra-pura, 4,5 g de fosfato de sódio monobásico e 3,6 g de hidróxido de sódio, com pH = 7,4) para posterior realização da técnica histológica. A fixação do tumor foi realizada *overnight*. Posteriormente realizou-se o processamento histológico, que compreendeu três fases: desidratação em concentrações crescentes de etanol – etanol a 70%, etanol a 95% e etanol a 100%; diafanização em xileno e impregnação em parafina. De seguida, o tumor foi incluído em parafina para obtenção de blocos. Os períodos de incubação foram estabelecidos de acordo com um protocolo previamente testado e mostrado na Tabela 10.

A microtomia foi realizada no Serviço de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Os cortes histológicos foram obtidos com a espessura de 3 µm, num micrótomo (Ref. AS325, Shandon) após arrefecimento dos

blocos em parafina numa placa fria (Ref. EG1130, Leica). Utilizou-se a coloração de hematoxilina e eosina (HE), a coloração histológica mais comumente usada⁸⁵. Esta coloração permite obter um bom contraste das estruturas celulares, uma vez que a hematoxilina possui afinidade para diversos componentes como o núcleo, corando-os de azul, o que proporciona detalhe intranuclear; e a eosina possui afinidade para componentes como o citoplasma e diversas fibras do tecido conjuntivo, corando-as em diversas intensidades de rosa. Para proceder à coloração dos cortes histológicos foi necessário colocar as lâminas numa estufa a 60°C, no mínimo 30 minutos, permitindo uma correta adesão do corte à lâmina. O protocolo utilizado foi um protocolo de coloração manual, usado diariamente no Serviço. As lâminas foram imersas em xileno (Ref. I520081005, Merck) durante 20 minutos, e de seguida imersas em soluções de etanol (Ref. 3000, REDUR) com concentrações decrescentes – 100, 70 e 30% – para hidratar os tecidos. Após lavagem em água, as lâminas foram imersas em hematoxilina (Ref. 26110, BDH) durante 15 minutos. Procedeu-se de seguida a uma lavagem em água corrente, para remover o excesso de corante. O passo de coloração com eosina (Ref. 4382, Sigma®) teve a duração de 5 minutos. As lâminas foram imersas em soluções de etanol com concentrações crescentes – 70 e 100% e em xileno. Por fim colocou-se a lamela sobre a lâmina com meio de montagem adequado.

A observação das lâminas foi realizada num microscópio ótico (Nikon), com câmara fotográfica acoplada. A análise histológica constitui um método que possibilita avaliar a resposta ao tratamento, através das alterações histológicas provocadas pelo mesmo.

Tabela 10 - Protocolo Padrão da Técnica Histológica, que inclui os períodos de incubação de cada etapa.

Protocolo Padrão da Técnica Histológica		
Fixação	Formol 10% - <i>Overnight</i>	
Processamento	Etanol 70% - 30 min	
	Etanol 95% - 30 min	
	Etanol 95% - 1h	
	Etanol 100% - 1h	
	Etanol 100% - 1h	
	Diafanização	Xileno - 30 min
		Xileno - 60 min
	Impregnação	Parafina - 60 min
		Parafina - 120 min
Inclusão	Parafina	

3.4 Análise Estatística dos Dados

A análise estatística foi realizada com recurso ao programa informático IBM® SPSS® Statistics, versão 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, EUA). A análise descritiva das variáveis quantitativas em estudo foi realizada pelo cálculo de estimadores de tendência central, de dispersão e de localização.

As curvas de sobrevivência celular foram ajustadas aos modelos previamente mencionados, de acordo com as Equações 3 e 4, utilizando o programa informático OriginPro (OriginLab Corporation, Northampton, EUA), versão 8.0.

Na análise inferencial, a normalidade de distribuição das variáveis quantitativas foi avaliada segundo o teste de Shapiro-Wilk.

A comparação entre as condições experimentais para cada linha celular, no que respeita à viabilidade celular, potencial de membrana mitocondrial e parâmetros obtidos no ensaio cometa, foi realizada segundo o teste *Analysis of Variance* (ANOVA) de um fator (no caso de distribuição normal e homogeneidade de variâncias) ou segundo o teste Kruskal-Wallis (caso contrário). As comparações múltiplas foram realizadas segundo a correção de Bonferroni.

Na comparação da atividade metabólica, da produção de ROS e GSH e dos resultados de ensaios clonogénicos com o controlo, foi utilizado o teste t de Student para uma média, comparando com o valor de padronização (100% para a atividade metabólica e 1 para as restantes variáveis mencionadas). Na comparação entre as restantes condições experimentais, foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes no caso de haver normalidade da distribuição dos valores ou o teste de Mann-Whitney em caso contrário. As comparações foram corrigidas pelo método de Bonferroni.

A comparação entre linhas celulares foi realizada utilizando o teste ANOVA de um fator ou o teste Kruskal-Wallis (de acordo com os critérios mencionados previamente). As comparações múltiplas foram realizadas segundo a correção de Bonferroni.

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

4. Resultadosⁱⁱ

ⁱⁱ Os resultados apresentados nesta tese foram obtidos em co-autoria com o Mestre João Casalta Lopes.

Os métodos descritos anteriormente foram utilizados para estabelecer linhas celulares humanas de CCR resistentes à radioterapia. Obtidas as linhas celulares, pretendeu-se avaliar a sua resposta após tratamento com radioterapia e quimiorradioterapia, com o fármaco 5-FU; definir um protocolo de caracterização da expressão proteica das linhas sensíveis e resistentes; e desenvolver um modelo animal de CCR resistente à radioterapia, através da implantação heterotópica de células tumorais humanas de CCR radorresistentes.

4.1 Indução de Resistência à Radioterapia

Com a realização de ensaios clonogénicos com a linha celular nativa C2BBe1 e com as linhas celulares derivadas (com frações cumulativas de 2 Gy) verificou-se que não foi possível induzir resistência à radioterapia. Quando sujeitas às doses 2, 4, 6, 8, e 10 Gy, as linhas nativa e derivadas apresentam fatores de sobrevivência entre os quais não há diferenças significativas. A Figura 15 ilustra as curvas dose-resposta das linhas celulares parental e C2BBe1/18x, sendo possível constatar que a linha derivada possui um comportamento semelhante ao da linha parental, para todas as doses de radiação estudadas.

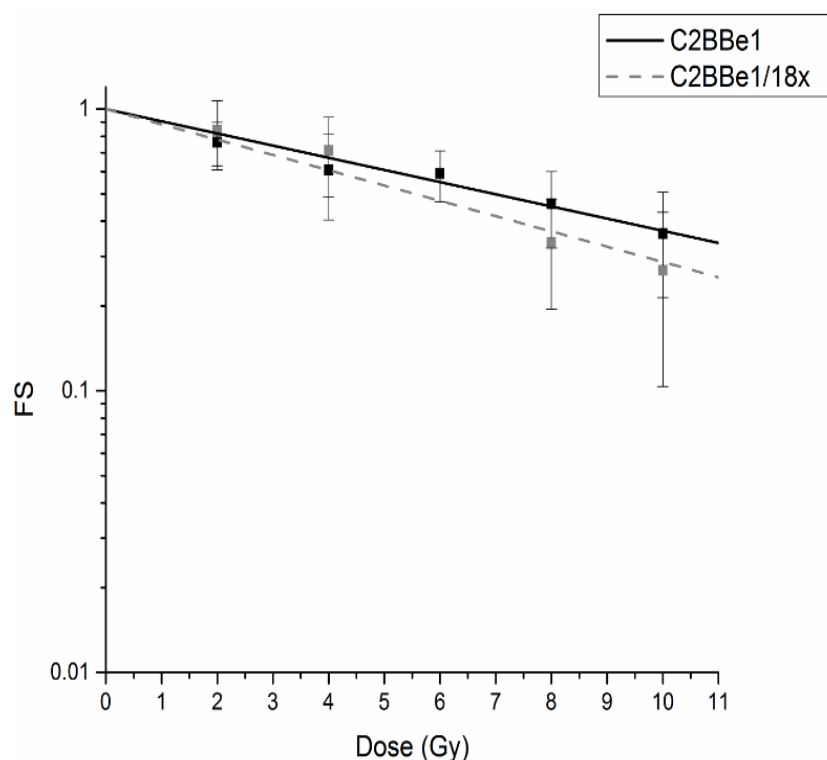


Figura 15 - Curvas dose-resposta das linhas celulares C2BBe1 (representada a preto) e C2BBe1/18x (representada a tracejado cinzento). Os valores representados correspondem à média e desvio-padrão de $n \geq 8$, para cada condição em estudo.

Ajustando os resultados obtidos nos ensaios clonogénicos das linhas C2BBe1 e C2BBe1/18x a um modelo linear-quadrático, obtemos $\beta=0$, pelo que o modelo que melhor se ajusta é o de um só alvo e um só toque. Os valores referentes ao parâmetros obtidos para as linhas celulares C2BBe1 e C2BBe1/18x estão representados na Tabela 11.

Tabela 11 – Parâmetros obtidos aquando do ajuste das curvas das linhas celulares C2BBe1 e C2BBe1/18x ao modelo um só alvo e um só toque. EP significa erro-padrão, R^2 corresponde ao coeficiente de determinação e DL50 à dose letal média.

Linha Celular	Parâmetros						R^2	DL50 (Gy)
	α	EP de α	β	EP de β	D0	EP de D0		
C2BBe1	0,099	0,006	-	-	10,055	0,647	0,918	6,968
C2BBe1/18x	0,125	0,011	-	-	8,000	0,734	0,934	5,545

Desta forma, prosseguiram-se os estudos apenas com a linha celular nativa C2BBe1 por forma a caracterizar o seu comportamento após tratamento com radioterapia e quimiorradioterapia e a compará-lo com a linha celular WiDr.

Relativamente à indução de resistência à radioterapia na linha celular WiDr, verificou-se que as linhas derivadas com 6 e 10 frações apresentam fatores de sobrevivência significativamente superiores aos da linha parental WiDr nas doses 4 ($p<0,001$), 6 ($p=0,006$ para WiDr/6x e $p<0,001$ para WiDr/10x), 8 ($p<0,001$) e 10 Gy ($p<0,001$). No entanto, as diferenças entre os fatores de sobrevivência para as mesmas doses nas linhas WiDr/6x e WiDr/10x não são estatisticamente significativas. A Figura 16 representa as curvas dose-resposta das três linhas celulares, que foram ajustadas ao modelo linear quadrático. Através do ajuste foi possível determinar os seus parâmetros, apresentados na Tabela 12. Uma vez que a linha WiDr parental apresentou fatores de sobrevivência significativamente inferiores aos das linhas com 6 e 10 frações cumulativas de 2 Gy e, portanto, aparenta ser mais sensível à radioterapia que essas linhas celulares, prosseguiram-se os estudos com as três linhas celulares.

Tabela 12 - Parâmetros obtidos aquando do ajuste das curvas das linhas celulares WiDr, WiDr/6x e WiDr/10x ao modelo linear-quadrático. EP significa erro-padrão.

Linha Celular	Parâmetros						R ²	DL50 (Gy)
	α	EP de α	β	EP de β	α/β	EP de α/β		
WiDr	0,231	0,066	0,019	0,012	11,983	8,151	0,955	2,482
WiDr/6x	0,188	0,042	0,003	0,005	57,935	98,355	0,934	3,473
WiDr/10x	0,114	0,035	0,006	0,005	18,118	14,385	0,944	4,801

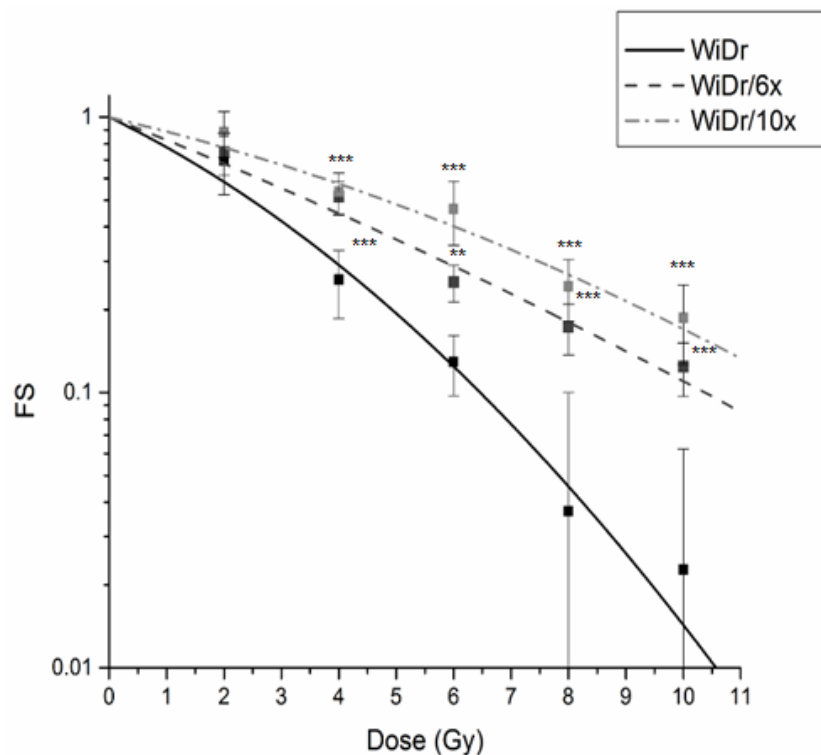


Figura 16 - Curvas dose-resposta das linhas celulares WiDr (representada a preto), WiDr/6x (representada a tracejado cinzento escuro) e WiDr/10x (representada a tracejado cinzento claro). Os valores representados correspondem à média e desvio-padrão de $n \geq 6$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$).

4.2 Avaliação das Linhas Celulares após Tratamento com Radioterapia e com Quimiorradioterapia

4.2.1 Atividade Metabólica

No que diz respeito à atividade metabólica da linha celular C2BBe1, o tratamento com 2 Gy não apresentou alterações em relação ao controlo. Com 10 Gy, verificou-se uma diminuição significativa da atividade metabólica, às 72 horas ($p < 0,001$) e às 96 horas ($p = 0,045$) após o tratamento. A administração de 5-FU promoveu a diminuição da atividade metabólica, nomeadamente nos tempos mais longos, face ao controlo. O tratamento com 5-FU + 2 Gy também diminuiu a atividade

metabólica das células, de forma significativa às 72 horas e às 96 horas. A combinação 5-FU + 10 Gy teve maior efeito na atividade metabólica, verificando-se uma diminuição significativa da mesma em relação ao controle em todos os tempos avaliados; sendo igual a $66,2 \pm 13,8\%$, $49,8 \pm 13,5\%$, $54,7 \pm 11,3\%$ e $40,1 \pm 14,8\%$ às 24, 48, 72 e 96 horas, respectivamente. Estes resultados são apresentados na Figura 17.

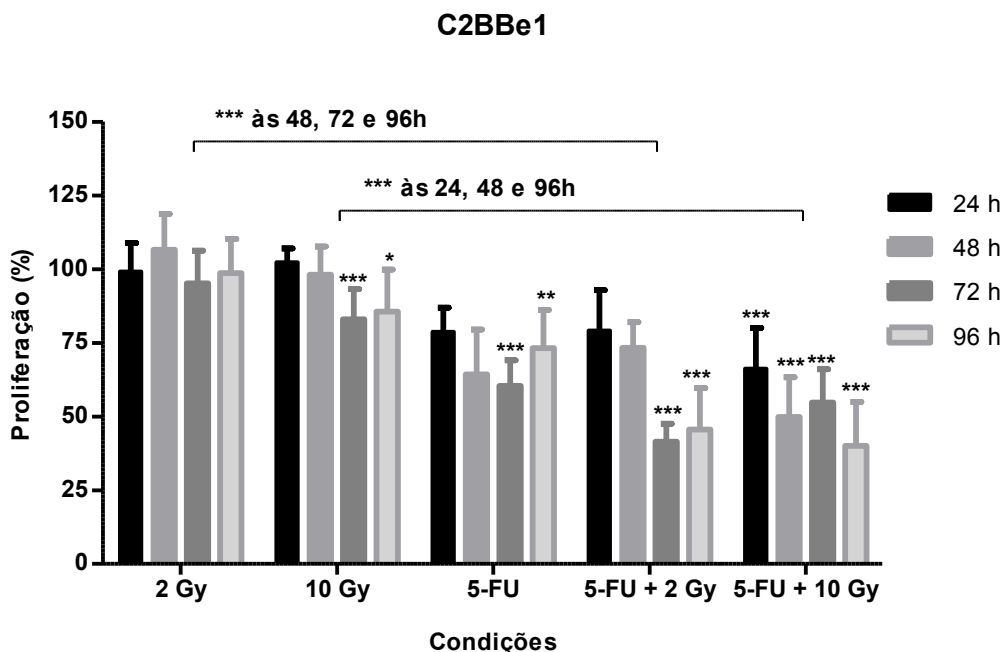


Figura 17 - Proliferação da linha celular C2BBe1, após tratamento com radioterapia e com quimiorradioterapia. Os resultados apresentam-se em percentagem relativamente ao controlo. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 4$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). As chavetas com significâncias correspondem a comparações entre condições de estudo, estando assinalado o tempo em que essa significância se verifica.

Estabelecendo uma comparação entre as condições de tratamento, salienta-se a diminuição significativa da atividade metabólica com o tratamento 5-FU + 2 Gy em comparação com a radioterapia sozinha (2 Gy), às 48, 72 e 96 horas ($p < 0,001$ em todos os tempos); bem como a diminuição significativa da atividade metabólica com o tratamento 5-FU + 10 Gy em comparação com 10 Gy, às 24, 48 e 96 horas ($p < 0,001$ em todos os tempos).

A atividade metabólica da linha nativa WiDr decresceu com o aumento da dose de radiação, sendo a diminuição significativa às 72 e 96 horas após o tratamento com 10 Gy ($p = 0,045$ e $p < 0,001$, respetivamente), como ilustrado na Figura 18.

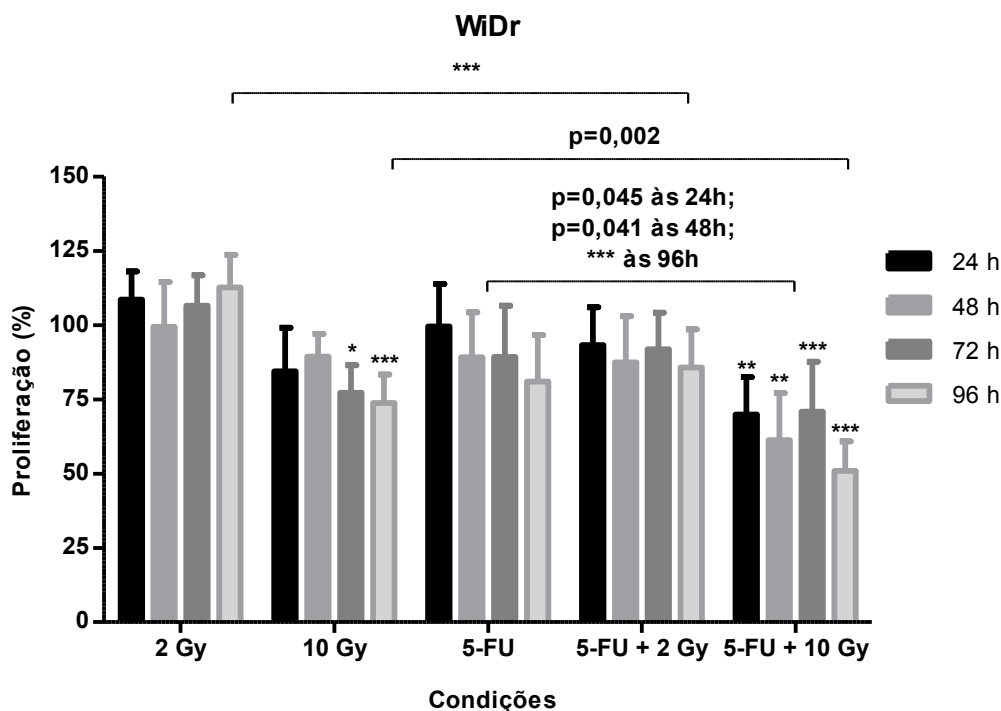


Figura 18 - Proliferação da linha celular WiDr, após tratamento com radioterapia e com quimiorradioterapia. Os resultados apresentam-se em porcentagem relativamente ao controlo. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 4$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). As chavetas com significâncias correspondem a comparações entre condições de estudo, estando assinalado o tempo em que essa significância se verifica, sempre que existe significância para mais do que um tempo de estudo.

Para além disso, o tratamento combinado com quimiorradioterapia 5-FU + 10 Gy levou a uma menor atividade metabólica, diminuindo de forma significativa a atividade face às células não tratadas, em todos os tempos estudados. Os resultados obtidos foram $69,9 \pm 12,6\%$ ($p = 0,009$), $61,3 \pm 15,8\%$ ($p = 0,009$), $70,8 \pm 16,9\%$ ($p < 0,001$) e $50,9 \pm 9,9\%$ ($p < 0,001$) às 24, 48, 72 e 96 horas, respetivamente. Comparando as condições de radioterapia e quimiorradioterapia para a mesma dose de radiação, verificou-se que às 96 horas ocorreu uma diminuição significativa entre 2 Gy e 5-FU + 2 Gy ($p < 0,001$) e entre 10 Gy e 5-FU + 10 Gy ($p = 0,002$). Verificou-se também uma diminuição significativa da atividade metabólica com 5-FU + 10 Gy comparativamente à administração de 5-FU isolada às 24 ($p = 0,045$), 48 ($p = 0,041$) e 96 horas ($p < 0,001$).

A atividade metabólica da linha WiDr/6x não foi alterada com o tratamento com 2 Gy, como é possível confirmar na Figura 19. Com 10 Gy verificou-se apenas uma diminuição significativa da atividade metabólica às 96 horas, $75,2 \pm 11,7\%$ ($p < 0,001$). Relativamente ao tratamentos com quimiorradioterapia, apenas se verificou uma diminuição com significado estatístico da atividade metabólica com a dose mais alta de radiação, às 72 horas, $82,1 \pm 16,0\%$ ($p = 0,018$) e às 96 horas, $65,5 \pm 7,7\%$ ($p < 0,001$).

após o tratamento. Salienta-se ainda às 96 horas a diminuição significativa da atividade metabólica após tratamento com 5-FU + 10 Gy em relação a 5-FU, $90,6 \pm 10,4\%$ ($p=0,021$); bem como a diminuição significativa após tratamento com 5-FU + 2 Gy, $90,2 \pm 12,6\%$, relativamente a 2 Gy, $106,1 \pm 10,9\%$ ($p=0,028$).

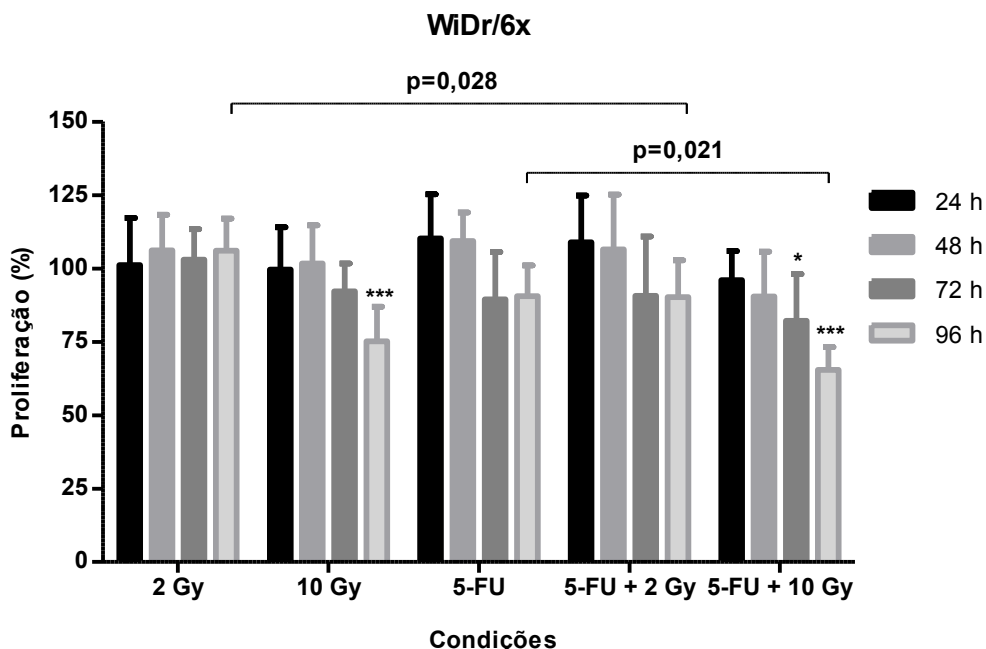


Figura 19 - Proliferação da linha celular WiDr/6x, após tratamento com radioterapia e com quimiorradioterapia. Os resultados apresentam-se em percentagem relativamente ao controlo. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 6$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com * ($p < 0,05$) e *** ($p < 0,001$). As chavetas com significâncias correspondem a comparações entre condições de estudo, verificadas às 96 horas.

A linha WiDr/10x apresentou atividade metabólica elevada após tratamento com radioterapia e com quimiorradioterapia, nunca inferior a 75% relativamente ao controlo, para todos os períodos estudados, como é possível visualizar na Figura 20. Verificou-se que a atividade metabólica 24 horas após o tratamento é superior à do controlo, embora sem significado estatístico, em todas as condições – 2 Gy, $106,4 \pm 10,4\%$, 10 Gy, $108,1 \pm 14,9\%$ e 5-FU, $115,1 \pm 12,1\%$, com exceção da condição 5-FU + 10 Gy, em que a atividade metabólica se mantém igual à das células sem tratamento, e da condição 5-FU + 2 Gy, que proporcionou um aumento significativo da atividade metabólica, $120,8 \pm 6,5\%$ ($p=0,009$). Às 96 horas, o tratamento 5-FU + 10 Gy levou a uma diminuição significativa da atividade metabólica, $77,6 \pm 11,9\%$ ($p=0,009$). Para além disso, promoveu uma diminuição significativa da atividade metabólica, em relação ao tratamento 5-FU, no qual se obteve uma atividade metabólica igual a $109,5 \pm 11,7\%$ ($p=0,027$).

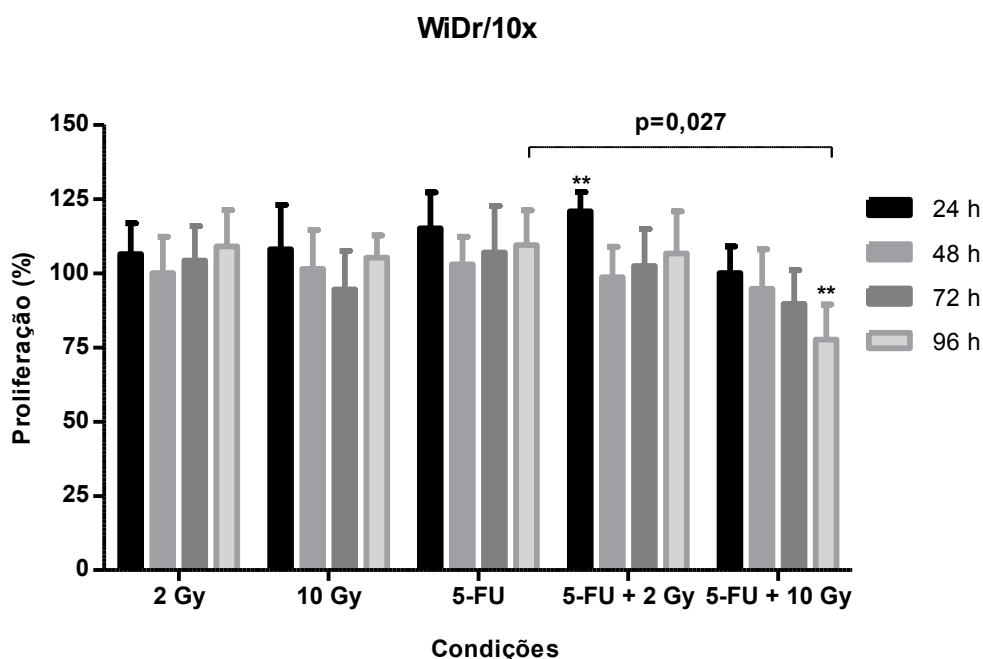


Figura 20 - Proliferação da linha celular WiDr/10x, após tratamento com radioterapia e com quimiorradioterapia. Os resultados apresentam-se em percentagem relativamente ao controlo. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 5$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$). A chave com significância corresponde à comparação entre as condições 5-FU e 5-FU + 10 Gy, às 96 horas.

Comparando a atividade metabólica da linha celular WiDr com a das linhas WiDr/6x e WiDr/10x, destaca-se o aumento da mesma nas linhas resistentes nos tratamentos 5-FU, $90,6 \pm 10,4\%$ e $109,5 \pm 11,7\%$ respetivamente, e 5-FU + 10 Gy, $65,5 \pm 7,7\%$ e $77,6 \pm 11,9\%$ respetivamente, às 96 horas. No entanto, esse aumento é apenas significativo entre as linhas parental e WiDr/10x ($p = 0,013$ em 5-FU e $p = 0,008$ em 5-FU + 10 Gy).

Estabelecendo uma comparação entre as duas linhas celulares nativas C2BBE1 e WiDr, constatou-se que a atividade metabólica de ambas é semelhante quando submetidas a 2 Gy, embora com 10 Gy a linha C2BBE1 apresente atividade metabólica superior (sem significado estatístico). Por outro lado, a linha C2BBE1 apresentou atividade metabólica inferior no que diz respeito aos tratamentos de quimiorradioterapia (sem significado estatístico).

4.2.2 Sobrevivência Celular

A sobrevivência celular foi avaliada 12 dias após os tratamentos, através do ensaio clonogénico. A linha celular C2BBE1, representada na Figura 21, quando submetida a 2 e 10 Gy demonstrou uma diminuição significativa do fator de

sobrevivência, $72,2 \pm 12,4\%$ ($p < 0,001$) e $21,2 \pm 5,3\%$ ($p < 0,001$), respectivamente. Quanto aos tratamentos de quimiorradioterapia, verificou-se também uma diminuição significativa da sobrevivência celular, sendo os fatores de sobrevivência para a condição 5-FU $62,8 \pm 12,6$ ($p = 0,009$), para a condição 5-FU + 2 Gy $44,4 \pm 13,0\%$ ($p < 0,001$) e para 5-FU + 10 Gy $25,2 \pm 11,8\%$ ($p < 0,001$). Salienta-se ainda a diminuição significativa do fator de sobrevivência comparando as condições 5-FU e 5-FU + 10 Gy ($p = 0,027$).

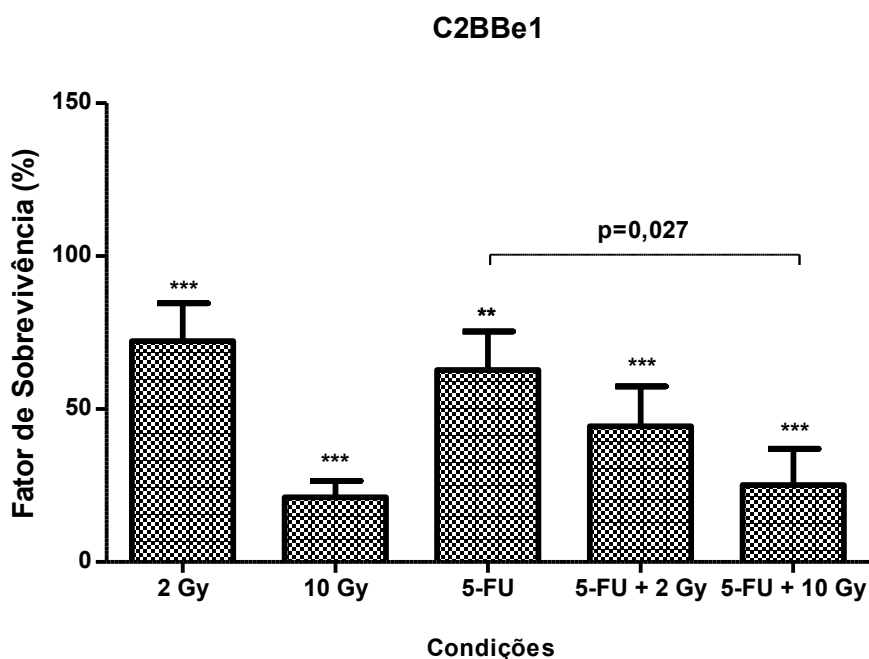


Figura 21 - Sobrevivência da linha celular C2BBe1, após tratamento com radioterapia e com quimiorradioterapia. Os resultados apresentam-se em percentagem relativamente ao controlo. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 6$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). A chave com significância corresponde à comparação entre as condições 5-FU e 5-FU + 10 Gy.

Quanto à linha nativa WiDr, o fator de sobrevivência foi significativamente inferior na condição 2 Gy, $77,4 \pm 12,0\%$ ($p = 0,027$), e nas condições 10 Gy, $10,3 \pm 2,8\%$, 5-FU + 2 Gy, $85,0 \pm 8,2\%$, e 5-FU + 10 Gy, $14,4 \pm 3,9\%$ ($p < 0,001$ em todas as condições enumeradas), relativamente ao controlo, como ilustra a Figura 22. Para além disso, comparando o tratamento 5-FU com o tratamento 5-FU + 10 Gy verificou-se uma diminuição significativa do fator de sobrevivência, de $92,1 \pm 16,5\%$ para $14,4 \pm 3,9\%$ ($p < 0,001$). Não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos com radioterapia e os respetivos tratamentos com quimiorradioterapia.

Relativamente à linha WiDr/6x, representada na Figura 23, também se verificou uma diminuição significativa do fator de sobrevivência com ambos os tratamentos de radioterapia – 2 Gy, $61,0 \pm 12,1\%$ e 10 Gy, $25,0 \pm 5,8\%$ ($p < 0,001$ em ambos os casos) e

com os tratamentos combinados de quimiorradioterapia – 5-FU + 2 Gy, $78,9 \pm 9,1\%$ e 5-FU + 10 Gy, $18,8 \pm 3,6\%$ ($p < 0,001$ em ambos os casos). A diferença entre os fatores de sobrevivência das condições 5-FU e 5-FU + 10 Gy foi significativa, sendo de $80,4 \pm 10,9\%$ e de $18,8 \pm 3,6\%$ ($p < 0,001$) respectivamente. Constatou-se que entre os tratamentos de radioterapia e de quimiorradioterapia com as mesmas doses de radiação não se verificaram diferenças significativas.

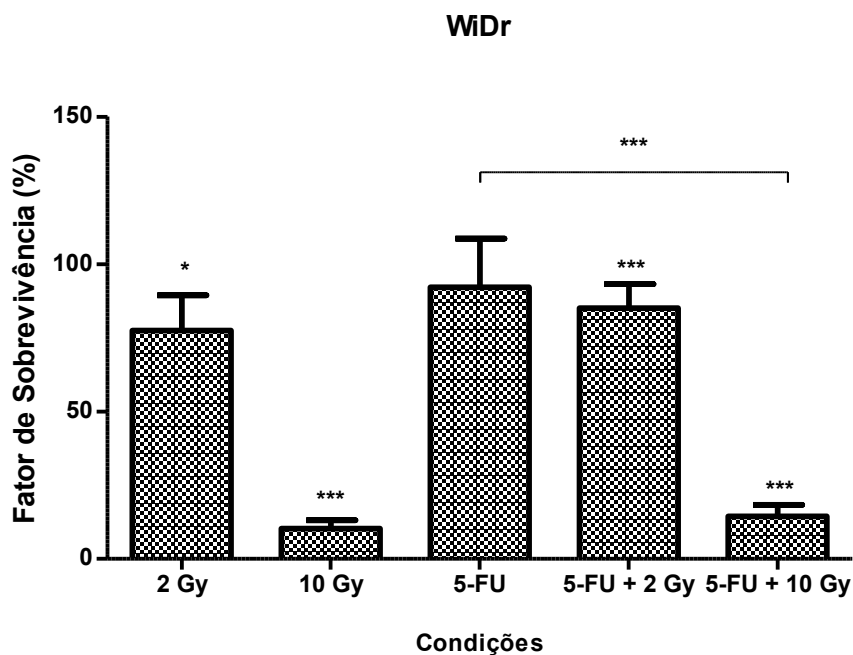


Figura 22 - Sobrevivência da linha celular WiDr, após tratamento com radioterapia e com quimiorradioterapia. Os resultados apresentam-se em porcentagem relativamente ao controle. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 7$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com * ($p < 0,05$) e *** ($p < 0,001$). A chave com significância corresponde à comparação entre as condições 5-FU e 5-FU + 10 Gy.

No que diz respeito à linha WiDr/10x, o fator de sobrevivência celular foi significativamente inferior nos tratamentos 2 Gy, $69,2 \pm 15,6\%$ ($p < 0,001$), 10 Gy, $27,1 \pm 16,5\%$ ($p < 0,001$), 5-FU + 2 Gy, $83,5 \pm 15,4\%$ ($p = 0,045$) e 5-FU + 10 Gy, $30,7 \pm 17,2\%$ ($p < 0,001$) face ao das células sem tratamento. Para além disso, a diferença obtida entre os fatores de sobrevivência após tratamento com 5-FU e com 5-FU + 10 Gy foi significativa ($p = 0,009$). No entanto, não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos de radioterapia e os tratamentos de quimiorradioterapia com as mesmas doses de radiação. Estes resultados são apresentados na Figura 24.

Estabelecendo uma comparação entre as três linhas celulares WiDr, verificou-se que com a dose de radiação 10 Gy, as linhas WiDr/6x e WiDr/10x obtiveram um fator de sobrevivência significativamente superior ao da linha parental ($p < 0,001$). A

linha WiDr/10x apresentou também um fator de sobrevivência significativamente superior ao da sua linha parental com o tratamento 5-FU + 10 Gy, sendo os valores $30,7 \pm 17,2\%$ e $14,4 \pm 3,9\%$ ($p < 0,001$), respetivamente.

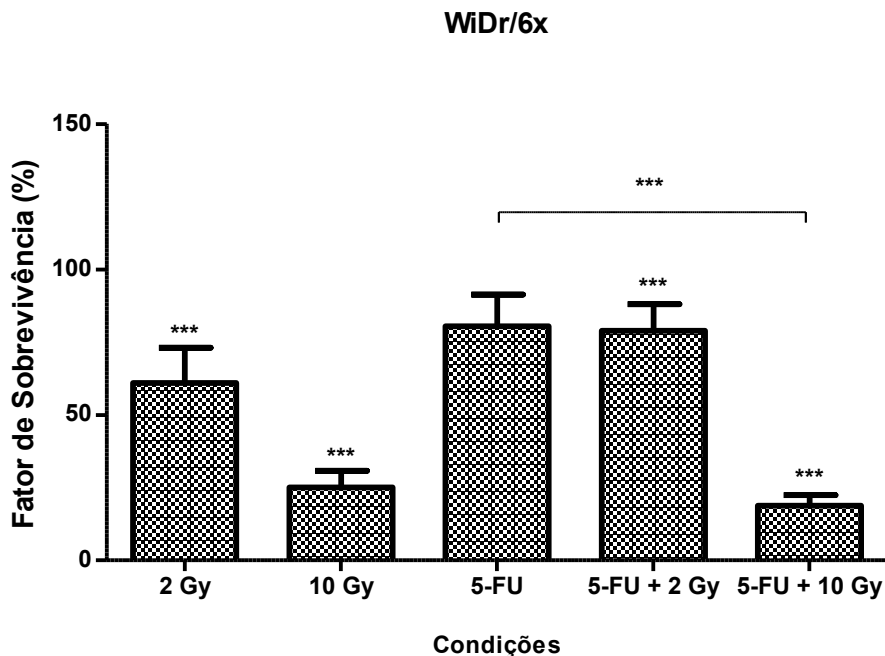


Figura 23 - Sobrevivência da linha celular WiDr/6x, após tratamento com radioterapia e com quimiorradioterapia. Os resultados apresentam-se em percentagem relativamente ao controlo. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 8$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com *** ($p < 0,001$). A chaveta com significância corresponde à comparação entre as condições 5-FU e 5-FU + 10 Gy.

Comparando as duas linhas celulares nativas, verificou-se que a linha C2BBE1 apresentou um fator de sobrevivência significativamente superior ao da linha WiDr nas condições 10 Gy ($p = 0,02$) e 5-FU + 10 Gy ($p = 0,001$). No entanto, relativamente ao tratamentos 5-FU e 5-FU + 2 Gy, a linha C2BBE1 obteve fatores de sobrevivência significativamente inferiores aos da linha WiDr ($p = 0,008$ e $p < 0,001$, respetivamente).

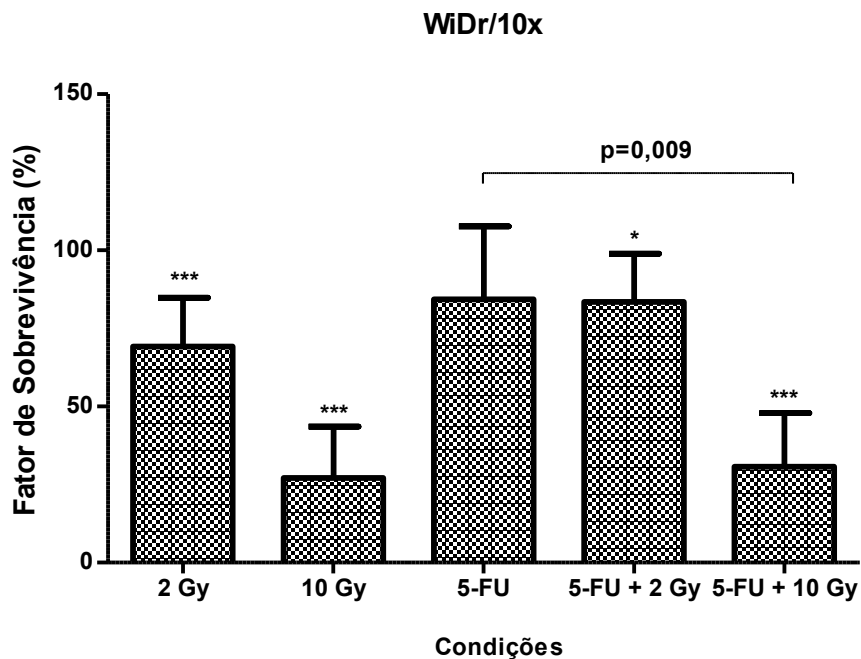


Figura 24 - Sobrevivência da linha celular WiDr/10x, após tratamento com radioterapia e com quimiorradioterapia. Os resultados apresentam-se em percentagem relativamente ao controlo. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 5$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com * ($p < 0,05$) e *** ($p < 0,001$). A chaveta com significância corresponde à comparação entre as condições 5-FU e 5-FU + 10 Gy.

4.2.3 Avaliação dos danos no DNA

A realização do ensaio cometa permitiu avaliar diversos parâmetros relativamente aos danos no DNA, nomeadamente o comprimento da cauda, a percentagem de DNA na cauda, bem como o momento de cauda (quantidade de DNA e sua distribuição na cauda). Sendo que este último parâmetro relaciona os dois primeiros, os resultados apresentados seguidamente dizem apenas respeito ao momento da cauda.

Na linha celular C2BBe1, verificou-se que todos os tratamentos induziram danos no DNA, pois ocorreram diferenças estatisticamente significativas para todas condições relativamente ao controlo ($p \leq 0,001$). Também se verificou que o momento de cauda é significativamente superior em 5-FU + 2 Gy, em comparação com o tratamento isolado de 2 Gy ($p = 0,002$), bem como foi significativamente superior em 5-FU + 10 Gy em relação ao tratamento isolado com 10 Gy ($p < 0,001$). As comparações entre 5-FU e 5-FU + 2 Gy e entre 5-FU e 5-FU + 10 Gy também revelaram diferenças significativas entre si ($p < 0,001$). A Figura 25 representa a distribuição de valores para cada condição em estudo, e a Figura 26 ilustra fotografias captadas de cada condição.

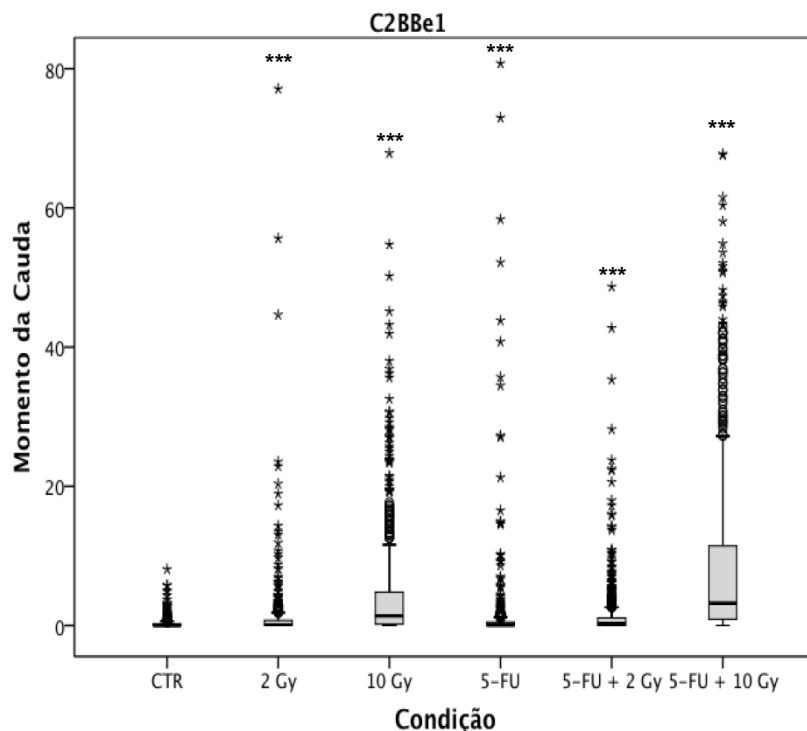


Figura 25 – Distribuição do momento de cauda nas condições em estudo para a linha celular C2BBe1, com um número de células analisadas por condição ≥ 96 , em 4 ensaios realizados. As diferenças significativas estão assinaladas com *** ($p < 0,001$).

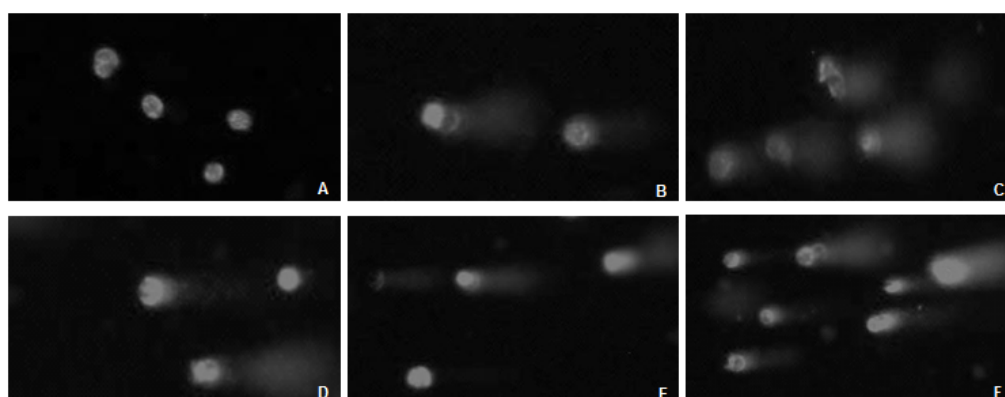


Figura 26 - Fotografias ilustrativas dos cometas obtidos na linha celular C2BBe1 para a condição controlo (A), 2 Gy (B), 10 Gy (C), 5-FU (D), 5-FU + 2 Gy (E) e 5-FU + 10 Gy (F), em escala de cinzento. Ampliação 100X.

Quanto aos danos no DNA provocados na linha celular WiDr, verificou-se um aumento significativo do momento de cauda nas condições 10 Gy e 5-FU + 10 Gy ($p < 0,001$), comparativamente ao controlo. O aumento do momento de cauda entre as condições 10 Gy e 5-FU + 10 Gy também é significativo ($p < 0,001$). Para além disso, as células submetidas a 5-FU + 10 Gy apresentaram um momento de cauda significativamente superior ao das células submetidas a 5-FU ($p < 0,001$). A Figura 27 representa os valores do momento de cauda desta linha celular, para todos os

tratamentos estudados, e a Figura 28 ilustra fotografias captadas de cada um dos tratamentos.

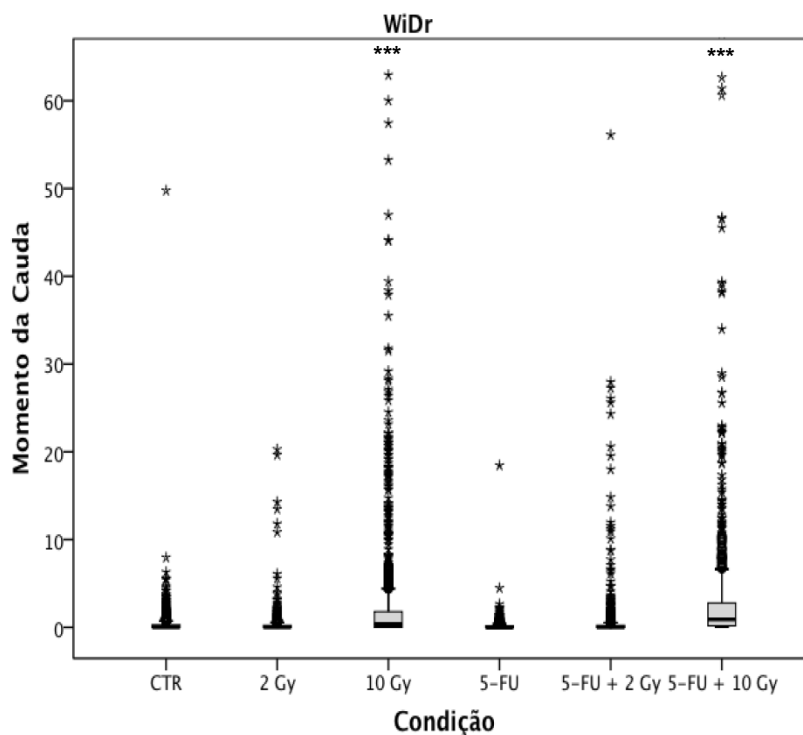


Figura 27 - Distribuição do momento de cauda nas condições em estudo para a linha celular WiDr, com um número de células analisadas por condição ≥ 101 , em 5 ensaios realizados. As diferenças significativas estão assinaladas *** ($p < 0,001$).

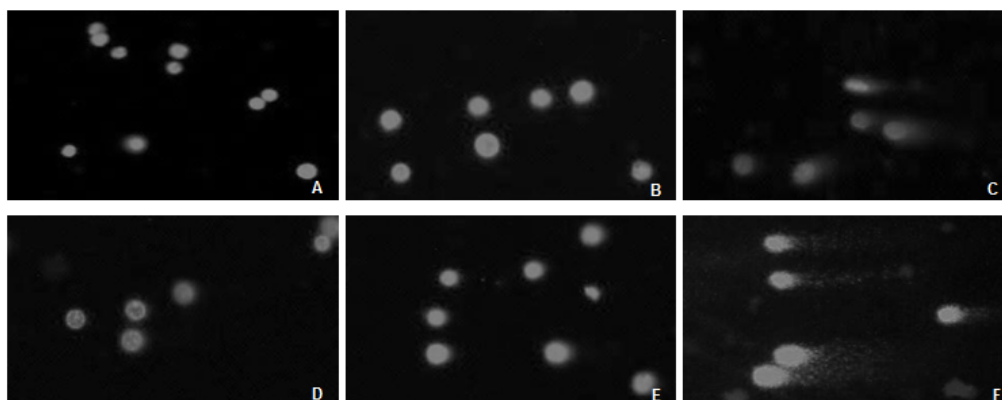


Figura 28 - Fotografias ilustrativas dos cometas obtidos na linha celular WiDr para a condição controlo (A), 2 Gy (B), 10 Gy (C), 5-FU (D), 5-FU + 2 Gy (E) e 5-FU + 10 Gy (F), em escala de cinzento. Ampliação 100X.

No que diz respeito à linha celular WiDr/6x, obtiveram-se diferenças significativas para todas as condições em relação ao controlo ($p < 0,001$), exceto a condição 5-FU ($p = 0,423$), como é possível visualizar na Figura 29. As comparações estabelecidas entre 2 Gy e 5-FU + 2 Gy e entre 10 Gy e 5-FU + 10 Gy permitiram verificar um aumento significativo do momento de cauda nos tratamentos combinados,

em relação aos tratamentos de radioterapia isolada ($p=0,006$ e $p<0,001$, respetivamente). Entre o tratamento 5-FU e os tratamentos combinados também se verificou um aumento significativo do momento de cauda nos últimos ($p<0,001$). A Figura 30 representa fotografias captadas para cada condição em estudo.

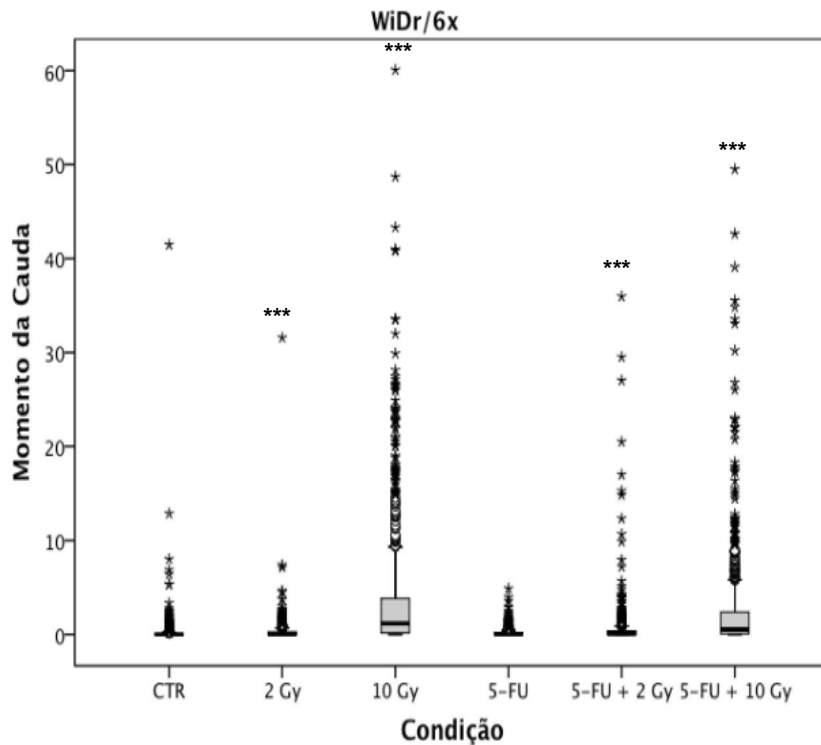


Figura 29 - Distribuição do momento de cauda nas condições em estudo para a linha celular WiDr/6x, com um número de células analisadas por condição ≥ 77 , em 4 ensaios realizados. As diferenças significativas estão assinaladas com *** ($p<0,001$).

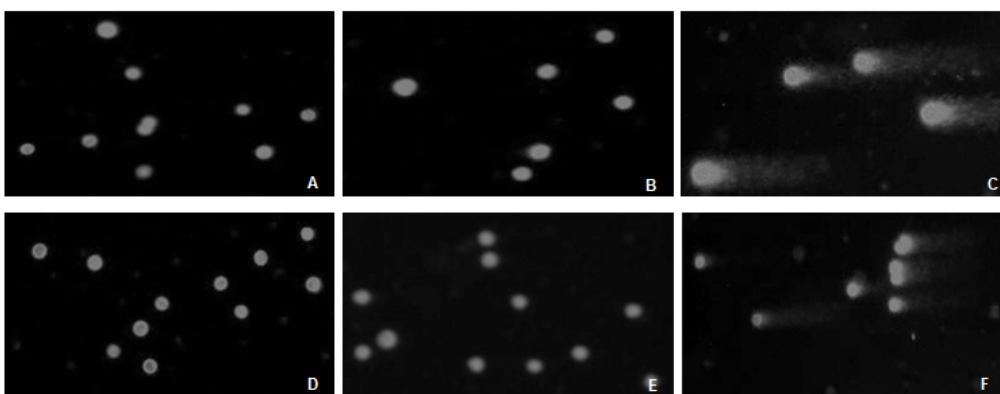


Figura 30 - Fotografias ilustrativas dos cometas obtidos na linha celular WiDr/6x para a condição controlo (A), 2 Gy (B), 10 Gy (C), 5-FU (D), 5-FU + 2 Gy (E) e 5-FU + 10 Gy (F), em escala de cinzento. Ampliação 100X.

Por fim, a linha WiDr/10x também apresentou danos no DNA, verificando-se diferenças significativas entre todas as condições e o controlo ($p<0,001$), exceto a

condição 5-FU. A Figura 31 representa a distribuição dos valores de momento de cauda desta linha, em todos os tratamentos estudados. As comparações estabelecidas entre 2 Gy e 5-FU + 2 Gy e entre 10 Gy e 5-FU + 10 Gy apresentaram diferenças significativas ($p < 0,001$ e $p = 0,036$, respetivamente). Relativamente às comparações entre as condições 5-FU e respetivas combinações, também se verificaram diferenças significativas ($p < 0,001$), sendo o momento de cauda superior nos tratamentos combinados, face ao 5-FU isolado. É possível visualizar os danos no DNA para os diversos tratamentos na Figura 32.

Estabelecendo uma comparação entre as duas linhas celulares nativas, verificou-se que a linha C2BBE1 apresentou um momento de cauda significativamente superior ao da linha WiDr, em todas as condições de tratamento ($p < 0,001$), como é possível visualizar na Tabela 13.

Quanto à comparação entre a linha nativa WiDr e a linha WiDr/6x, verificou-se um aumento significativo do momento de cauda com 10 Gy ($p < 0,001$) e 5-FU + 2 Gy ($p < 0,001$) da linha celular parental para linha WiDr/6x, embora com uma diminuição significativa após tratamento com 5-FU + 10 Gy ($p = 0,003$). As comparações efetuadas entre a linha nativa e a linha WiDr/10x permitiram verificar que houve um aumento significativo do momento de cauda em todas as condições da linha celular parental para a linha WiDr/10x ($p < 0,001$). Comparando ainda o momento de cauda obtido nas linhas WiDr/6x e WiDr/10x, constatou-se que este foi significativamente superior na última linha, em todas as condições em estudo ($p < 0,001$).

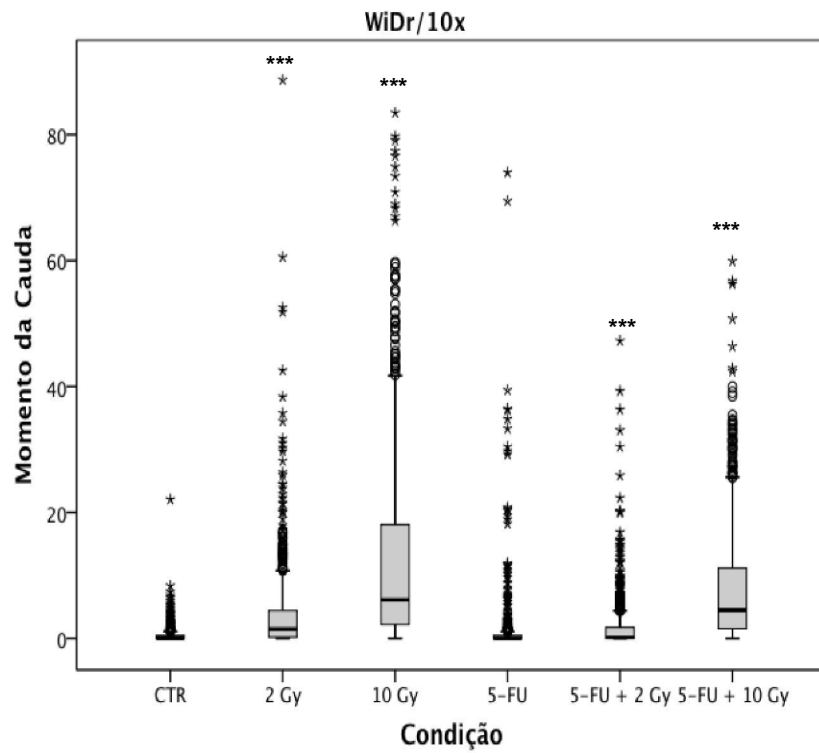


Figura 31 - Distribuição do momento de cauda nas condições em estudo para a linha celular WiDr/10x, com um número de células analisadas por condição ≥ 128 , em 3 ensaios realizados. As diferenças significativas estão assinaladas com *** ($p < 0,001$).

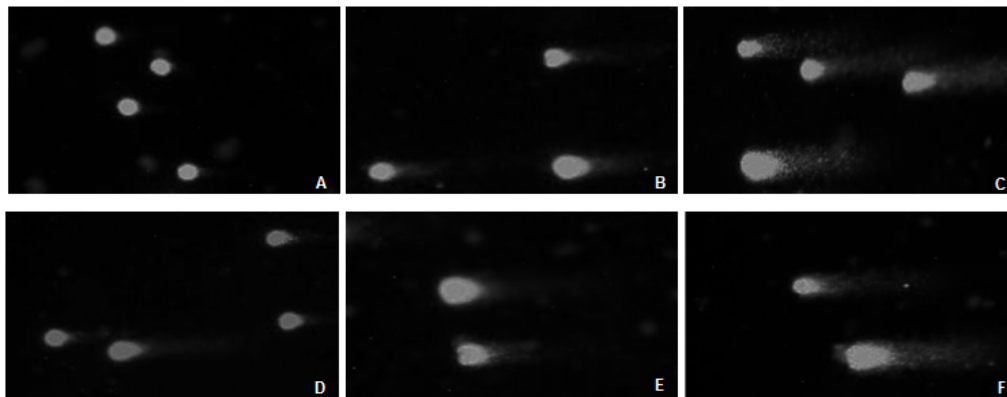


Figura 32 - Fotografias ilustrativas dos cometas obtidos na linha celular WiDr/10x para a condição controlo (A), 2 Gy (B), 10 Gy (C), 5-FU (D), 5-FU + 2 Gy (E) e 5-FU + 10 Gy (F), em escala de cinzento. Ampliação 100X.

Tabela 13 - Valores de mediana (Med) e percentil 90 (P90) do momento de cauda para as quatro linhas celulares em estudo.

Condições	C2BBe1		WiDr		WiDr/6x		WiDr/10x	
	Med	P90	Med	P90	Med	P90	Med	P90
CTR	0,03	0,77	0,02	0,87	0,00	0,40	0,06	1,76
2 Gy	0,12	2,18	0,03	0,77	0,02	0,76	1,47	12,77
10 Gy	1,38	15,70	0,35	8,07	1,17	11,89	6,13	39,94
5-FU	0,05	1,74	0,01	0,52	0,01	0,59	0,04	2,37
5-FU + 2 Gy	0,25	3,73	0,02	0,87	0,05	1,26	0,17	5,74
5-FU + 10 Gy	3,22	28,46	0,91	7,89	0,52	6,05	4,49	23,47

4.2.4 Avaliação de viabilidade e de tipos de morte celular

No que diz respeito à viabilidade da linha celular nativa WiDr, verificou-se uma diminuição significativa do número de células vivas nas condições 10 Gy, 5-FU + 2 Gy e 5-FU + 10 Gy, tendo como valores, respetivamente $49,1 \pm 5,0\%$ ($p < 0,001$), $62,7 \pm 2,9\%$ ($p = 0,009$) e $50,9 \pm 2,4\%$ ($p < 0,001$). Constatou-se ainda que o número de células em morte celular por necrose foi significativamente superior nas condições 10 Gy, 5-FU e 5-FU + 10 Gy ($p < 0,001$ em todos os casos). Não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos de radioterapia isolada e os tratamentos de quimiorradioterapia com a respetiva dose de radiação, quer na viabilidade celular quer nos tipos de morte. Foi possível verificar que entre da condição 5-FU para 5-FU + 2 Gy e da condição 5-FU para 5-FU + 10 Gy, houve um aumento significativo de células em apoptose ($p = 0,045$ e $p = 0,027$, respetivamente). A Figura 33 representa os valores de viabilidade e morte celular após os tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia, da linha celular WiDr.

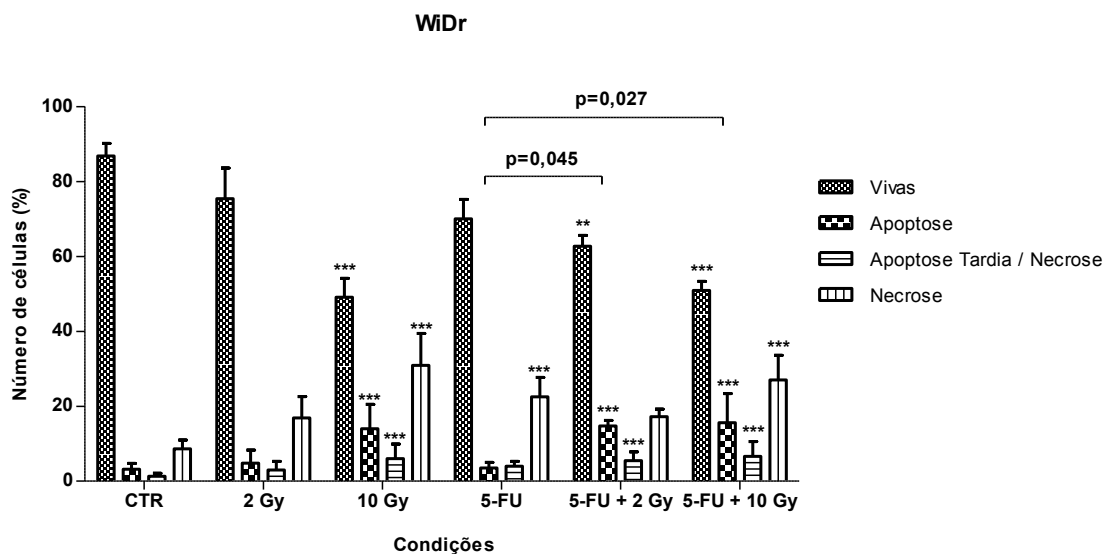


Figura 33 - Representação da viabilidade e das vias de morte da linha celular WiDr, após tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 6$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). As chavetas com significância correspondem a comparações entre condições de tratamento, no que diz respeito à apoptose.

Quanto à viabilidade celular da linha WiDr/6x, apenas se verificou uma diminuição significativa de células vivas nos tratamentos 10 Gy, $67,0 \pm 7,3\%$, e 5-FU + 10 Gy, $62,6 \pm 5,1\%$ ($p < 0,001$ em ambos os casos), como é possível visualizar na Figura 34. Relativamente aos tipos morte celular, foi possível constatar que os tratamentos com 10 Gy e com 5-FU + 10 Gy obtiveram um aumento significativo do número de células em apoptose, em relação ao controlo ($p < 0,001$ em ambos os casos). O tratamento com 10 Gy provocou também um aumento significativo do número de células em apoptose tardia/necrose ($p = 0,036$) e o tratamento com 5-FU + 10 Gy levou também a um aumento significativo do número de células em necrose ($p < 0,001$). Tal como na linha WiDr, não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos 2 Gy e 5-FU + 2 Gy e entre 10 Gy e 5-FU + 10 Gy. No entanto, comparando o tratamento 5-FU com o tratamento combinado 5-FU + 10 Gy, foi possível constatar que no último houve uma diminuição significativa do número de células vivas ($p = 0,018$) e um aumento significativo de células em apoptose ($p < 0,001$).

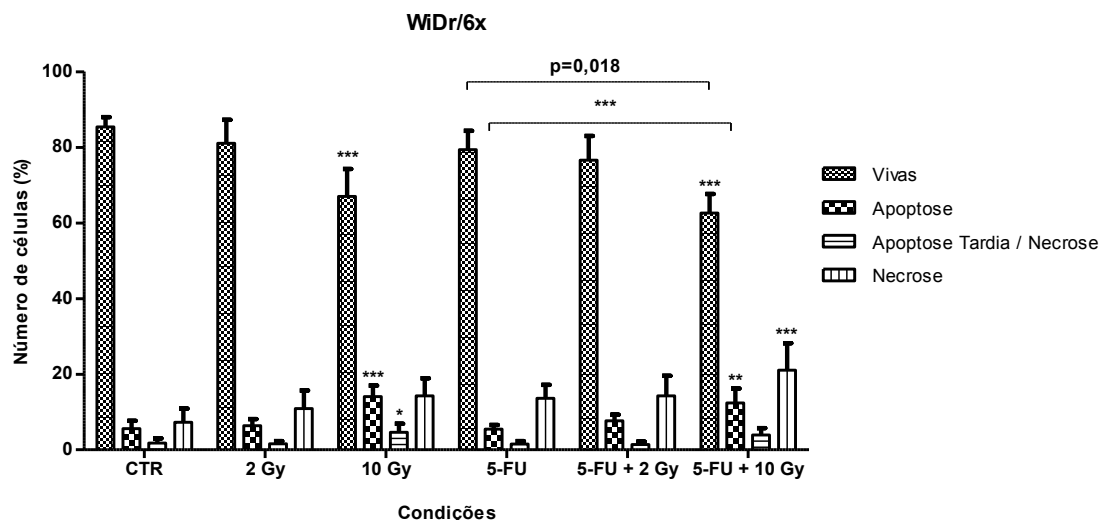


Figura 34 - Representação da viabilidade e das vias de morte da linha celular WiDr/6x, após tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 7$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). As chavetas com significância correspondem a comparações entre condições de tratamento, em relação ao número de células vivas e ao número de células em apoptose.

A linha WiDr/10x quando submetida aos tratamentos 10 Gy, 5-FU + 2 Gy e 5-FU + 10 Gy apresentou uma diminuição significativa de células vivas, $66,0 \pm 8,1\%$, $71,6 \pm 2,9\%$ e $63,8 \pm 4,2\%$, respectivamente ($p < 0,001$ em 10 Gy e 5-FU + 10 Gy, e $p = 0,027$ em 5-FU + 2 Gy). A Figura 35 apresenta estes resultados. Verificou-se que em todas as condições de tratamento houve um aumento significativo de células em necrose ($p < 0,001$ em 10 Gy, 5-FU e 5-FU + 10 Gy; $p = 0,011$ em 2 Gy; e $p = 0,019$ em 5-FU + 2 Gy). Para além disso, foi possível constatar que 10 Gy provocou também um aumento significativo do número de células em apoptose ($p = 0,009$) e 5-FU + 10 Gy um aumento significativo do número de células em apoptose e em apoptose tardia/necrose ($p < 0,001$ em ambos os casos). Novamente, não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos de radioterapia e os tratamentos combinados com as mesmas doses de radiação. Comparando o tratamento 5-FU com 5-FU + 10 Gy, houve um aumento significativo do número de células em apoptose no último ($p = 0,045$).

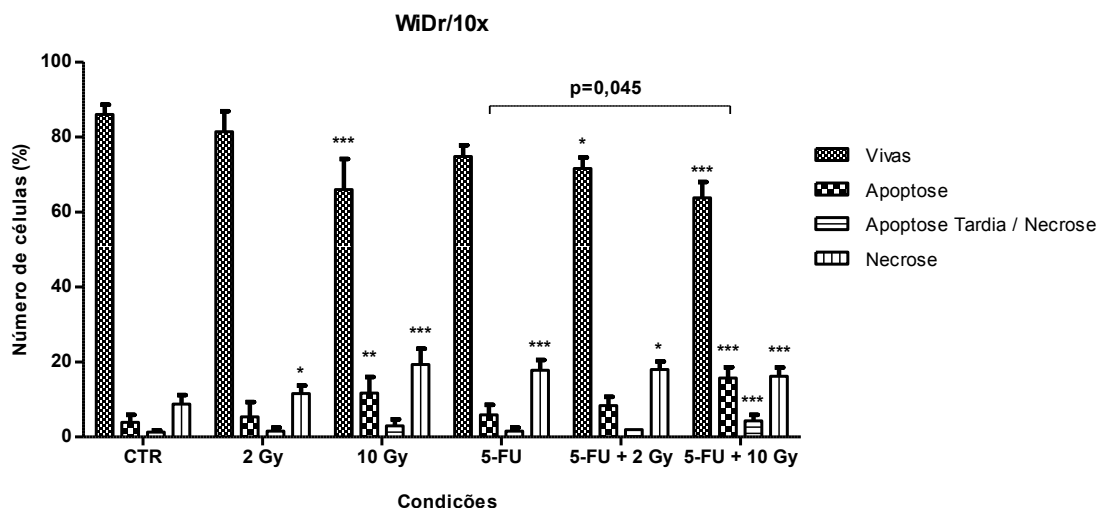


Figura 35 - Representação da viabilidade e das vias de morte da linha celular WiDr/10x, após tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 5$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). A chaveta com significância corresponde a comparação entre as condições 5-FU e 5-FU + 10 Gy, no que respeita à apoptose.

Comparando as três linhas celulares, verificou-se um aumento significativo do número de células vivas nas linhas WiDr/6x e WiDr/10x, em relação à linha parental, quando submetidas a 10 Gy ($p=0,003$ e $p=0,008$, respetivamente) e a 5-FU + 10 Gy ($p=0,006$ e $p=0,003$, respetivamente). Para além disso, verificou-se que em relação às mesmas condições de tratamento, a linha nativa apresentou um aumento significativo de células em necrose, comparativamente à linha WiDr/10x ($p=0,001$ em 10 Gy e $p=0,015$ em 5-FU + 10 Gy). Entre as linhas WiDr/6x e WiDr/10x não se verificaram diferenças significativas nos diversos tratamentos.

4.2.5 Avaliação do estado oxidação-redução e das defesas antioxidantes

4.2.5.1 Produção intracelular de peróxidos

A marcação com a sonda DCF permitiu avaliar a quantidade de peróxidos de hidrogénio presente nas células 96 horas após os tratamentos. Na linha celular WiDr, verificou-se um aumento significativo de peróxidos de hidrogénio nas células submetidas a 10 Gy e a 5-FU + 10 Gy ($p < 0,001$ em ambos os casos), como pode ser observado na Figura 36. Não se obtiveram diferenças significativas entre os tratamentos com radioterapia e os respetivos tratamentos combinados. No entanto, entre 5-FU e 5-FU + 2 Gy e entre 5-FU e 5-FU + 10 Gy verificou-se um aumento significativo da concentração intracelular de peróxidos nos tratamentos combinados ($p=0,045$ e $p=0,018$, respetivamente).

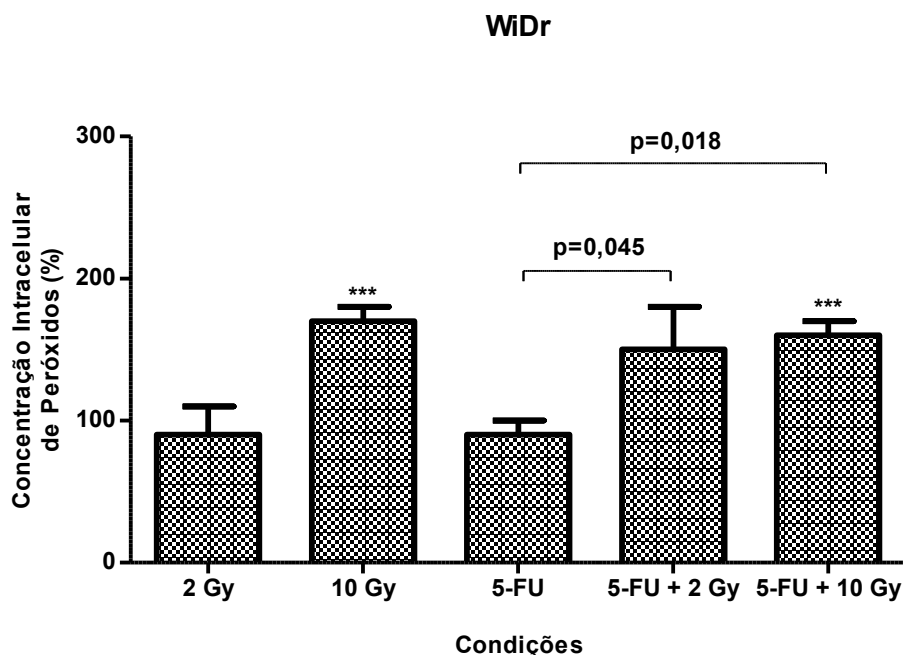


Figura 36 - Níveis intracelulares de peróxidos da linha celular WiDr, após tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia. Os resultados apresentam-se em percentagem relativamente ao controlo. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 5$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com *** ($p < 0,001$). As chavetas com significância correspondem a comparações entre condições de tratamento.

Quanto à presença de peróxido de hidrogénio na linha celular WiDr/6x, foi possível constatar que todos os tratamentos induziram aumento de peróxidos relativamente ao controlo, embora a diferença seja apenas estatisticamente significativa nas condições 10 Gy e 5-FU + 10 Gy ($p = 0,027$ e $p < 0,001$, respetivamente). Após comparação entre os diversos tratamentos, verificou-se um aumento significativo de peróxidos intracelulares após tratamento com 5-FU + 10 Gy, comparativamente a 5-FU isolado ($p < 0,001$). Estes resultados são apresentados na Figura 37.

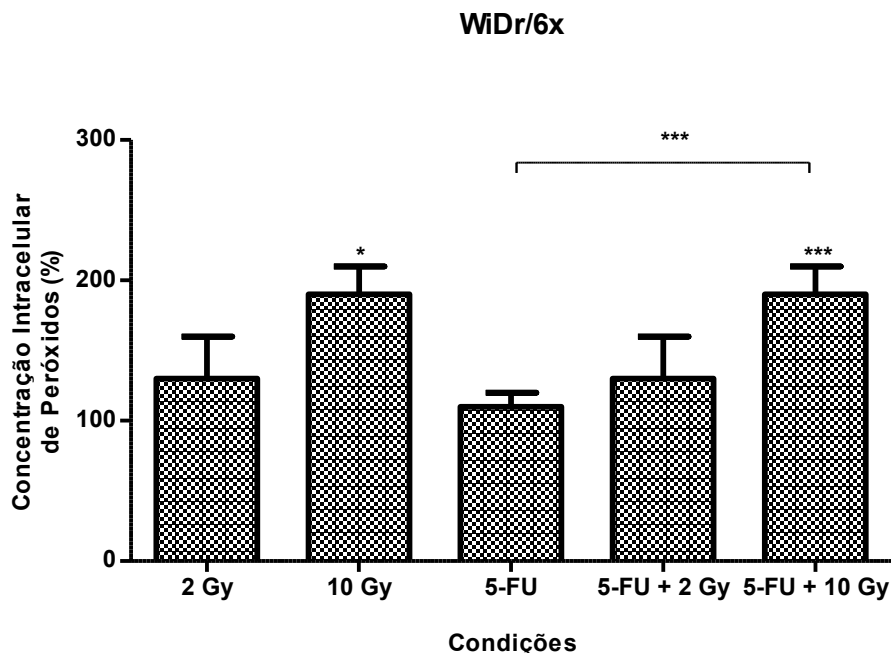


Figura 37 - Níveis intracelulares de peróxidos da linha celular WiDr/6x, após tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia. Os resultados apresentam-se em percentagem relativamente ao controlo. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 4$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com * ($p < 0,05$) e *** ($p < 0,001$). A chaveta com significância corresponde à comparação entre as condições 5-FU e 5-FU + 10 Gy.

Relativamente à linha WiDr/10x, verificou-se um aumento da produção intracelular de peróxidos de hidrogénio em todos os tratamentos, exceto 5-FU, sendo a concentração igual à do controlo, como é possível observar na Figura 38. Contudo, apenas nas condições 10 Gy e 5-FU + 10 Gy se obteve um aumento com significado estatístico ($p = 0,009$ e $p < 0,001$, respetivamente). Nesta linha também se verificou um aumento significativo da concentração de peróxidos entre os tratamentos 5-FU e 5-FU + 10 Gy ($p = 0,003$).

Após a comparação da concentração intracelular de peróxidos entre as três linhas, verificou-se que a linha parental apresentou um menor aumento de peróxidos em relação às linhas WiDr/6x e WiDr/10x, após tratamento com 5-FU + 10 Gy, na medida em que na primeira linha o valor obtido foi $160,0 \pm 10,0\%$ e nas duas últimas foi, respetivamente, $190,0 \pm 20,0\%$ ($p = 0,027$) e $200,0 \pm 10,0\%$ ($p = 0,006$).

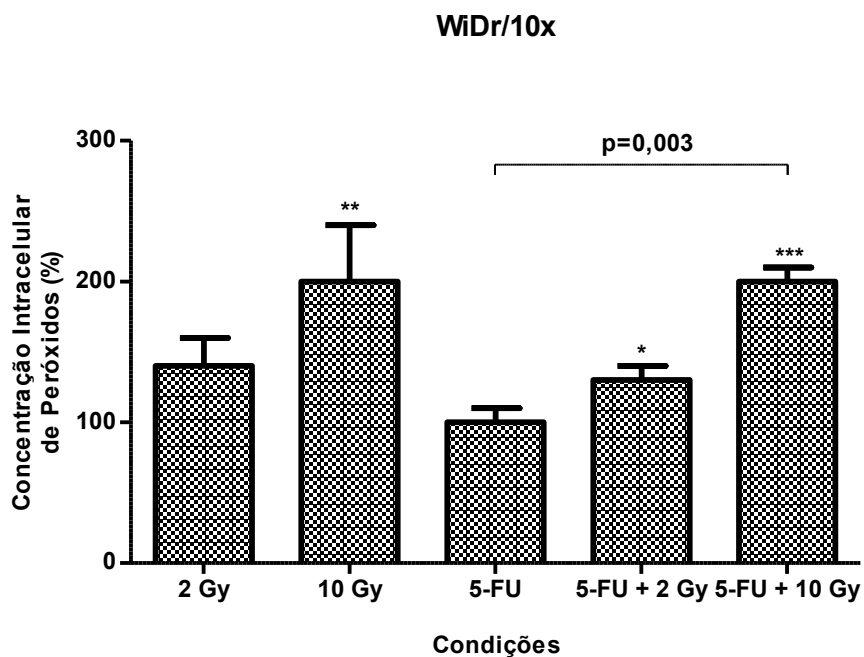


Figura 38 - Níveis intracelulares de peróxidos da linha celular WiDr/10x, após tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia. Os resultados apresentam-se em percentagem relativamente ao controlo. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 4$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). A chaveta com significância corresponde à comparação entre as condições 5-FU e 5-FU + 10 Gy.

4.2.5.2 Produção intracelular do anião superóxido

Por sua vez, a avaliação da produção do anião superóxido foi efetuada através da marcação com a sonda DHE. A linha celular nativa, como ilustra a Figura 39, apresentou um aumento significativo do radical superóxido quando submetida a 10 Gy e 5-FU + 10 Gy ($p = 0,009$ e $p < 0,001$). A comparação entre as condições tratamento, permitiu verificar que entre 5-FU e 5-FU + 10 Gy houve um aumento significativo do radical superóxido ($p < 0,001$).

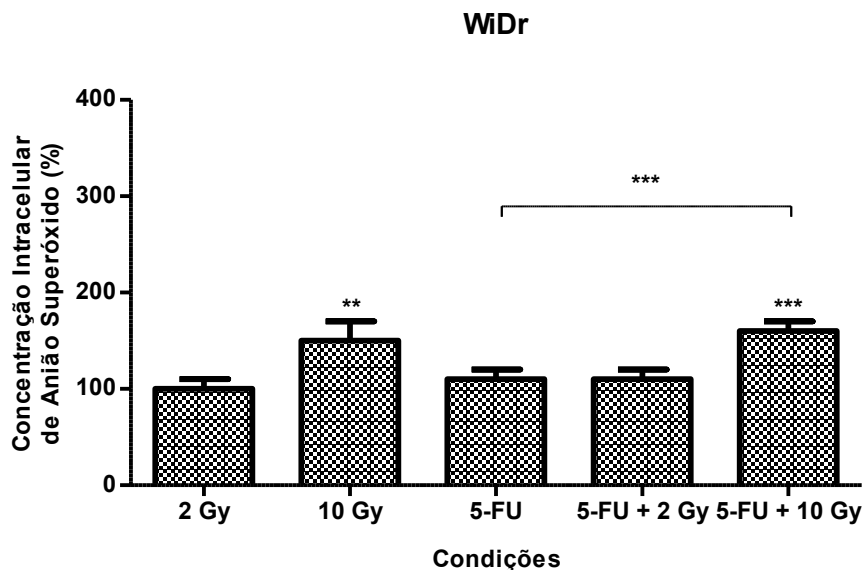


Figura 39 - Níveis intracelulares de anião superóxido da linha celular WiDr, após tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia. Os resultados apresentam-se em percentagem relativamente ao controlo. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 5$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). A chaveta com significância corresponde à comparação entre as condições 5-FU e 5-FU + 10 Gy.

Na linha celular WiDr/6x destaca-se o aumento significativo do radical superóxido com o tratamento 10 Gy ($p = 0,018$). Entre 5-FU e 5-FU + 10 Gy verificou-se também um aumento significativo do radical superóxido ($p = 0,002$), como é possível observar na Figura 40.

Quanto à linha celular WiDr/10x, representada na Figura 41, verificou-se uma produção de radical superóxido significativamente superior na condição 5-FU + 2 Gy ($p = 0,036$). Entre as condições 5-FU e 5-FU + 10 Gy a produção do radical superóxido foi significativamente superior após o segundo tratamento ($p < 0,001$).

As três linhas celulares em estudo não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto à produção do radical superóxido, para as várias condições, com exceção de um aumento significativo da linha celular WiDr/6x para a linha celular WiDr/10x, após tratamento com 5-FU + 2 Gy ($p < 0,001$).

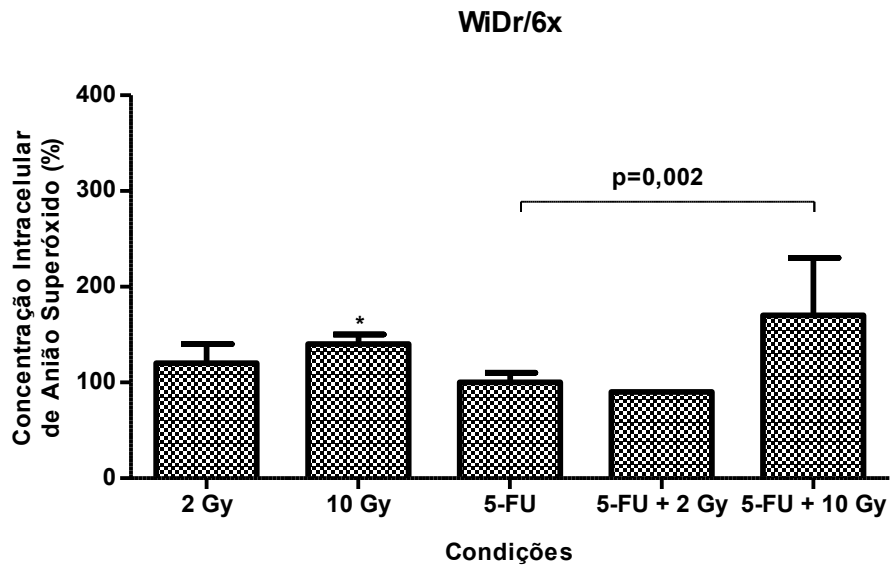


Figura 40 - Níveis intracelulares de ânion superóxido da linha celular WiDr/6x, após tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia. Os resultados apresentam-se em percentagem relativamente ao controlo. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 5$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$). A chave com significância corresponde à comparação entre as condições 5-FU e 5-FU + 10 Gy.

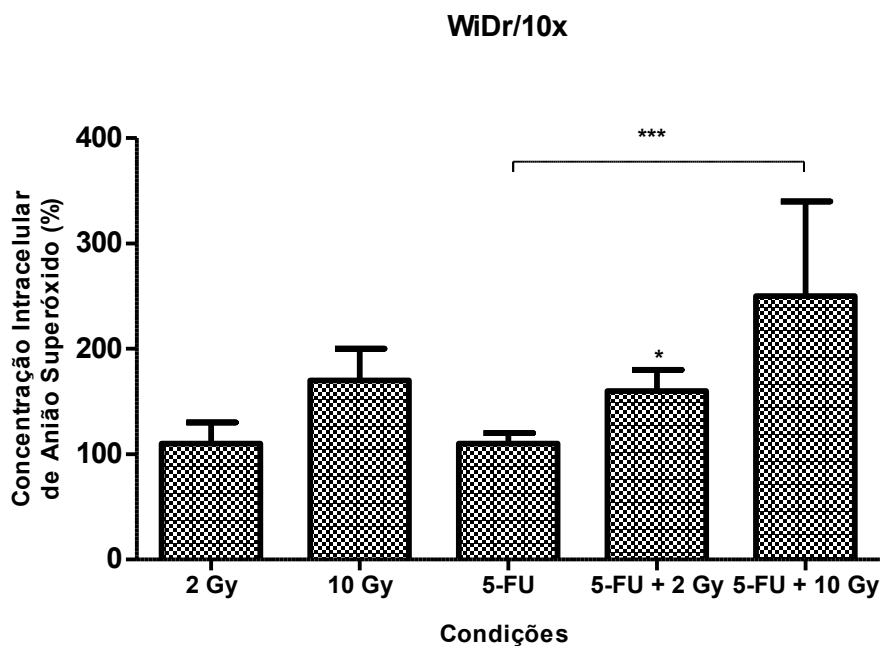


Figura 41 - Níveis intracelulares de ânion superóxido da linha celular WiDr/10x, após tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia. Os resultados apresentam-se em percentagem relativamente ao controlo. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 5$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com * ($p < 0,05$) e *** ($p < 0,001$). A chave com significância corresponde à comparação entre as condições 5-FU e 5-FU + 10 Gy.

4.2.5.3 Expressão de glutathiona reduzida

No que diz respeito à avaliação da GSH, a linha celular parental WiDr não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos e o controlo, como ilustrado na Figura 42.

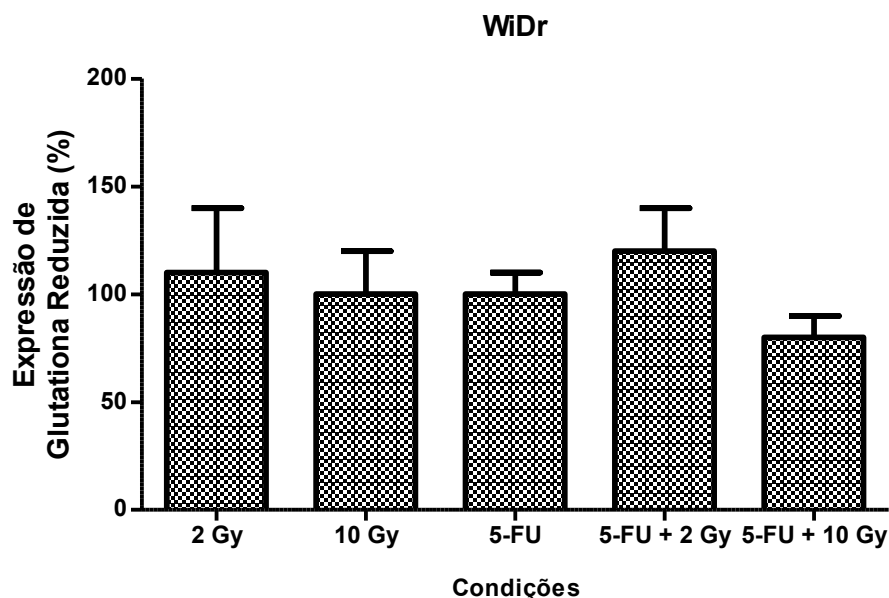


Figura 42 - Expressão de glutathiona reduzida da linha celular WiDr, após tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia. Os resultados apresentam-se em percentagem relativamente ao controlo. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 5$.

Em relação à linha celular WiDr/6x, representada na Figura 43, verificou-se uma diminuição significativa da expressão de GSH após os tratamentos com 5-FU ($p < 0,001$) e 5-FU + 2 Gy ($p = 0,001$).

Na linha celular WiDr/10x não se observaram diferenças significativas na expressão de GSH entre os vários tratamentos e o controlo, como representa a Figura 44.

Comparando as três linhas celulares, verificou-se que após o tratamento com 2 Gy, a linha parental apresentou um aumento significativo de GSH em relação à linha WiDr/10x ($p = 0,024$). Relativamente à administração de 5-FU, observou-se uma diminuição significativa da expressão de GSH da linha celular WiDr para as duas linhas WiDr/6x e WiDr/10x ($p = 0,003$ e $p = 0,024$, respetivamente). O tratamento 5-FU + 2 Gy despoletou uma diminuição significativa de GSH, comparando a linha celular WiDr com a linha celular WiDr/6x ($p = 0,003$). Quanto aos tratamentos com 10 Gy e 5-FU + 10 Gy, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as linhas celulares em estudo.

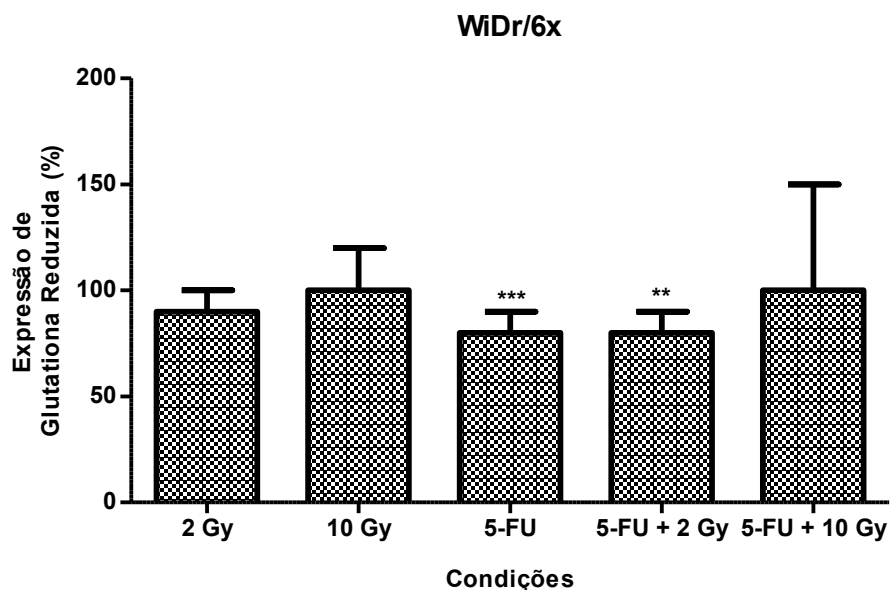


Figura 43 - Expressão de glutathiona reduzida da linha celular WiDr/6x, após tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia. Os resultados apresentam-se em percentagem relativamente ao controlo. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 7$.

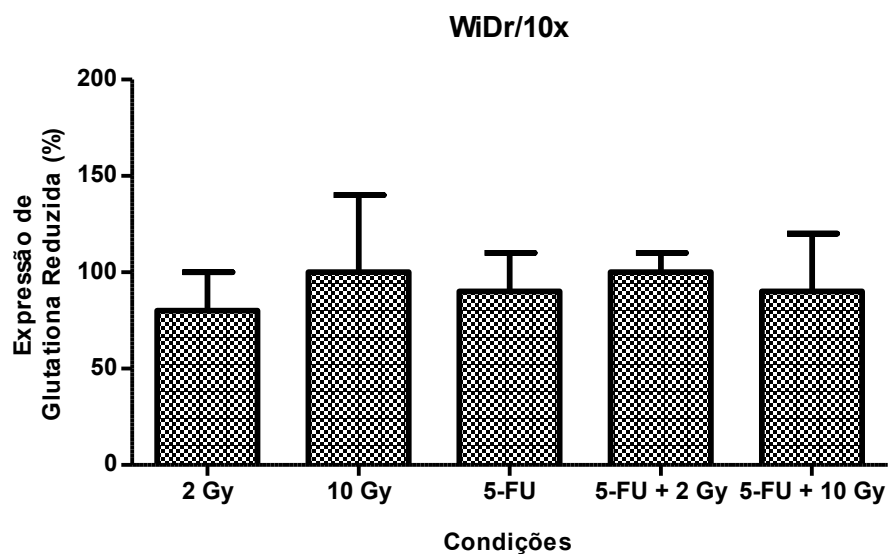


Figura 44 - Expressão de glutathiona reduzida da linha celular WiDr/10x, após tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia. Os resultados apresentam-se em percentagem relativamente ao controlo. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 5$.

4.2.5.4 Avaliação do potencial da membrana mitocondrial

Na linha celular WiDr, verificou-se um aumento significativo da razão monómeros/agregados, com os tratamentos 10 Gy e 5-FU + 10 Gy ($p < 0,001$ em ambos os casos), comparativamente ao controlo, como se pode observar na Figura 45. Não se verificaram diferenças significativas na comparação entre os tratamentos

de radioterapia e os respetivos tratamentos combinados. Assim como não existiram diferenças significativas entre os tratamentos 5-FU e combinados com radioterapia.

Quanto à linha celular WiDr/6x, esta apresentou um aumento significativo da razão monómeros/agregados, quando submetida a 10 Gy e a 5-FU + 10 Gy ($p < 0,001$ nos dois casos). Não houve diferenças significativas entre os tratamentos de radioterapia e os tratamentos combinados com as mesmas doses de radiação. No entanto, ao estabelecer uma comparação entre 5-FU e 5-FU + 10 Gy verificou-se um aumento significativo da razão monómeros/agregados ($p = 0,002$). Os resultados estão representados na Figura 46.

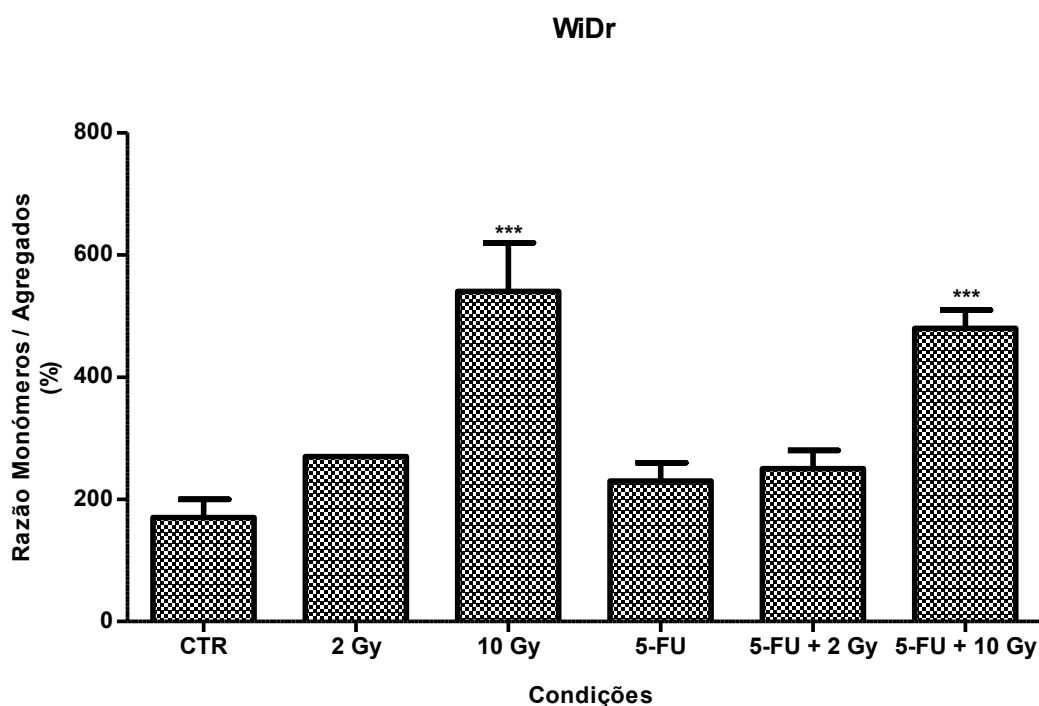


Figura 45 - Potencial de membrana mitocondrial da linha celular WiDr, após tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 5$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com *** ($p < 0,001$).

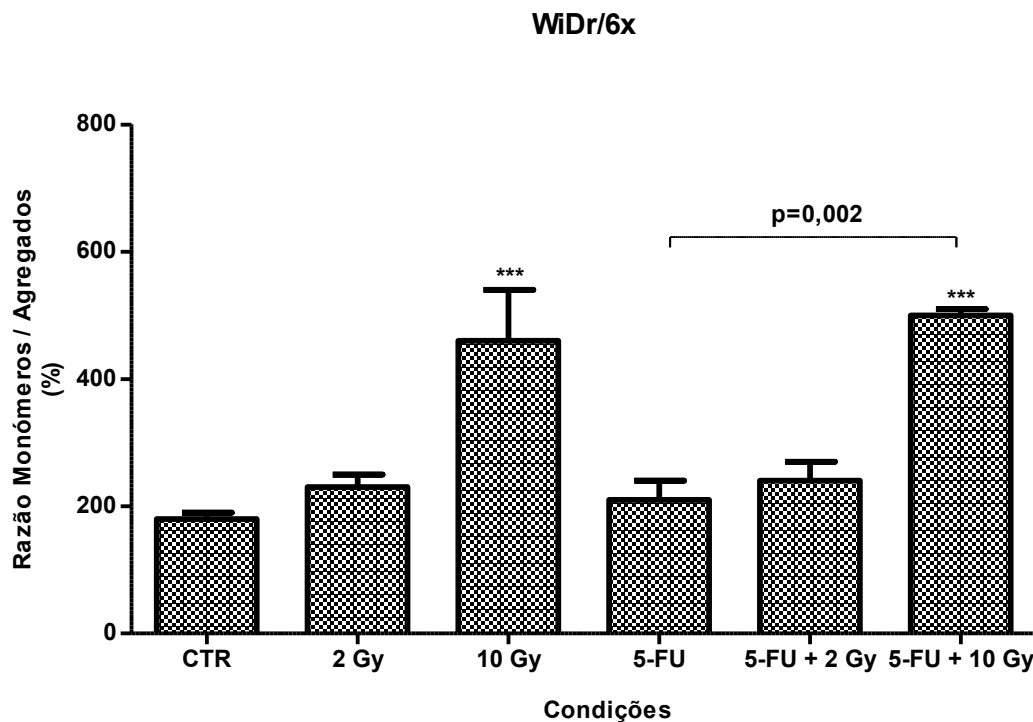


Figura 46 - Potencial de membrana mitocondrial da linha celular WiDr/6x, após tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 7$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com *** ($p < 0,001$). A chaveta com significância corresponde à comparação entre as condições 5-FU e 5-FU + 10 Gy.

Relativamente à linha celular WiDr/10x, verificou-se também um aumento estatisticamente significativo da razão monómeros/agregados nas condições 10 Gy ($p=0,027$) e 5-FU + 10 Gy ($p=0,009$), como é possível visualizar na Figura 47. Comparando as condições de tratamento entre si, salienta-se apenas o aumento significativo da razão monómeros/agregados entre 5-FU e 5-FU + 10 Gy ($p=0,009$).

Comparando as três linhas celulares, verificou-se que a linha parental apresentou uma maior variação do potencial da membrana mitocondrial quando submetida aos diversos tratamentos do que as linhas WiDr/6x e WiDr/10x. Com o tratamento 10 Gy, a linha celular WiDr/10x apresentou um menor aumento da razão monómeros/agregados em relação à linha celular nativa ($p=0,012$). Para além disso, as duas linhas celulares WiDr e WiDr/10x também apresentaram uma diferença estatisticamente significativa em relação a 5-FU, sendo que a linha WiDr apresentou uma razão monómeros/agregados significativamente superior ($p=0,015$). Da linha celular WiDr/6x para a linha celular WiDr/10x, verificou-se um menor aumento da razão monómeros/agregados no tratamento 5-FU + 10 Gy ($p=0,003$).

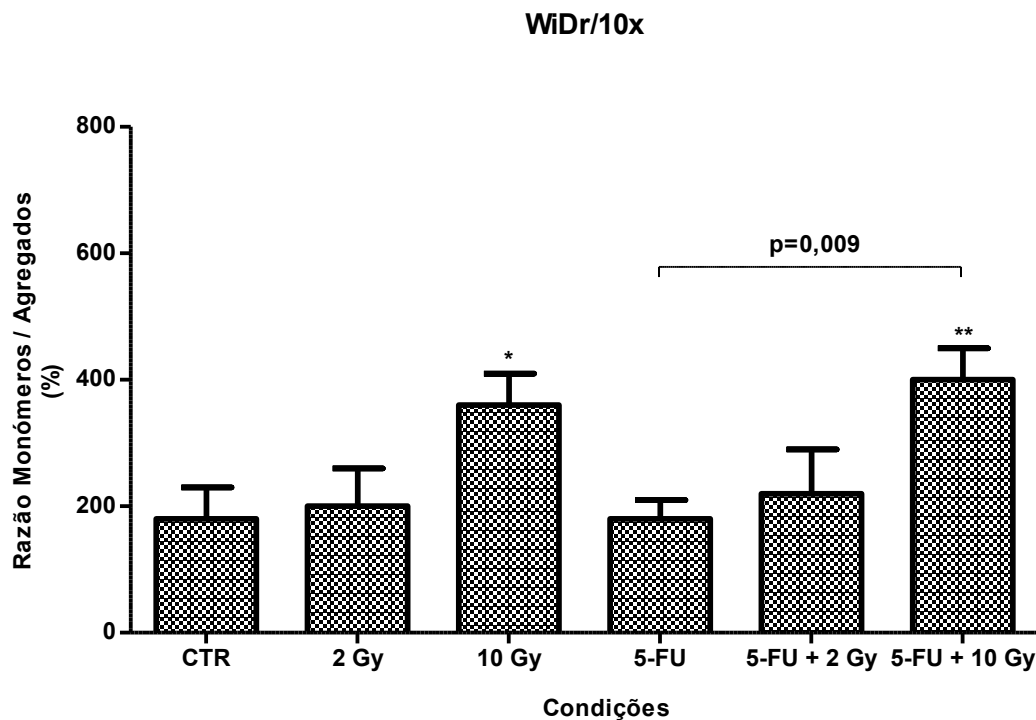


Figura 47 - Potencial de membrana mitocondrial da linha celular WiDr/10x, após tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia. Cada barra corresponde à média e ao desvio-padrão de $n \geq 5$. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$). A chaveta com significância corresponde à comparação entre as condições 5-FU e 5-FU + 10 Gy.

4.3 Avaliação do conteúdo proteico das linhas celulares

WiDr e WiDr/10x

Após a realização da eletroforese 2D, foi possível obter géis das linhas celulares WiDr e WiDr/10x, como é possível visualizar na Figura 48 A e B, respetivamente. A eletroforese unidimensional permitiu verificar que as amostras utilizadas tinham boa qualidade na medida em que o gel apresentou bandas coradas para diversos pesos moleculares, apresentado na Figura 48 C. Uma vez que a avaliação do conteúdo proteico foi elaborada com dois extratos de proteína, de cada linha celular, os resultados apresentados são preliminares. As imagens dos géis foram processadas no programa informático Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics).

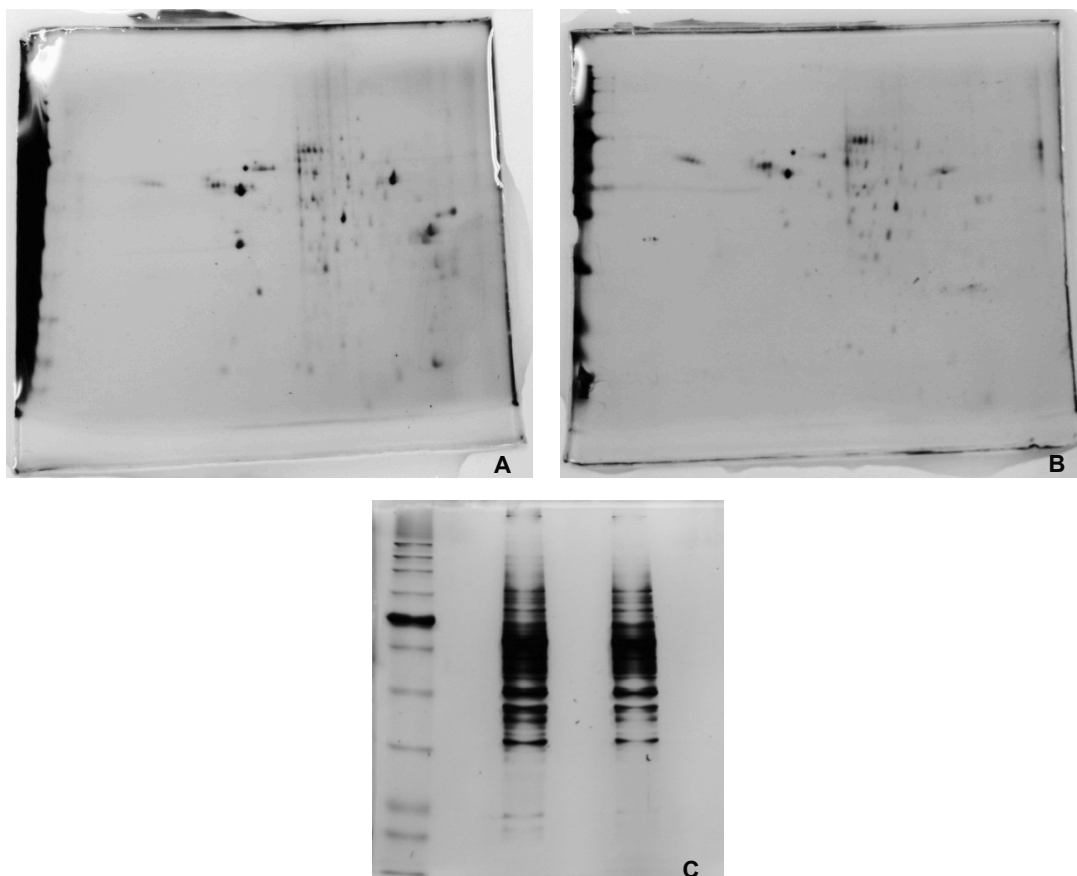


Figura 48 - Imagens ilustrativas de um gel 2D da linha celular WiDr (A) e de um gel 2D da linha celular WiDr/10x (B), em escala de cinzento. Em C observa-se o gel unidimensional: a primeira coluna corresponde ao padrão de bandas, a segunda coluna corresponde à amostra da linha celular WiDr e a última coluna corresponde à amostra da linha celular WiDr/10x, em escala de cinzento.

Após comparação das imagens, a análise dos dados permitiu identificar 205 *spots*. A cada *spot* foi atribuído um rácio da expressão proteica entre ambas as linhas celulares. O valor do rácio variou entre 1 e 28,4. Para se prosseguir com a análise preliminar dos *spots*, consideraram-se apenas aqueles que apresentaram um rácio igual ou superior a 3, na medida em que neste estudo importa verificar as diferenças entre as linhas celulares WiDr e WiDr/10x. Assim, foram estudados 66 *spots*, sendo que 18 corresponderam a um aumento da expressão de proteína na linha celular WiDr/10x e 21 corresponderam a uma diminuição da expressão de proteína em relação à linha celular parental. Os 27 *spots* restantes corresponderam a localizações do gel que não permitiram uma comparação da expressão de proteína entre as amostras. Essas localizações correspondiam a margens dos géis, bem como a regiões do gel com um contraste que impossibilita a avaliação, de acordo com as fotografias obtidas. Na Figura 49 estão ilustrados exemplos de *spots* com maior expressão na linha celular WiDr e na Figura 50 estão representados *spots* com expressão inferior nessa linha, relativamente à linha celular WiDr/10x. Os rácios da

expressão proteica WiDr/WiDr/10x nos *spots* 184, 206, 155 e 176 são, respetivamente, 15,7, 11,6, 11,4 e 10,5. Isto significa que a expressão proteica nestes *spots* é mais de dez vezes superior na linha celular WiDr do que na linha celular WiDr/10x. Por outro lado, os rácios da expressão proteica WiDr/10x/WiDr nos *spots* 208, 216 e 212 são 9,7, 7,6 e 6,2, respetivamente. O que demonstra que nestes *spots* a expressão proteica é mais de seis vezes superior na linha celular WiDr/10x do que na linha celular WiDr.

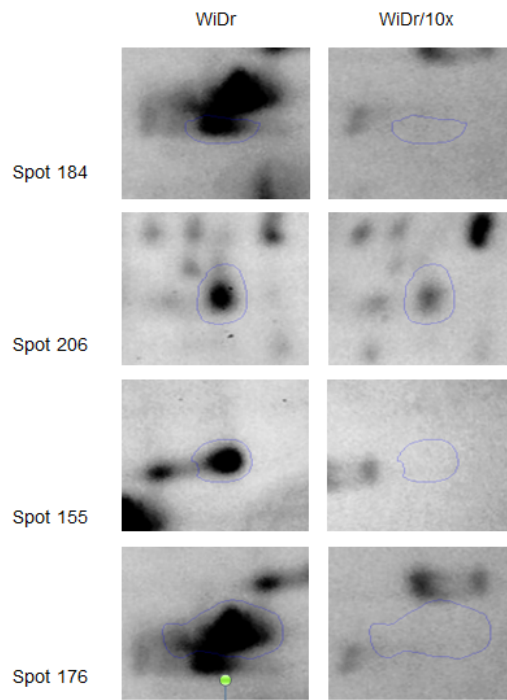


Figura 49 - *Spots* ilustrativos com expressão superior na linha celular WiDr (à esquerda), em relação à linha celular WiDr/10x (à direita).

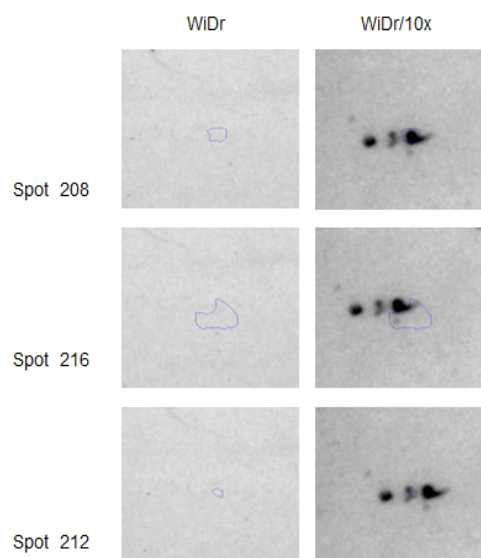


Figura 50 - *Spots* ilustrativos com expressão inferior na linha celular WiDr (à esquerda), em relação à linha celular WiDr/10x (à direita).

4.4 Estudos *In Vivo*

Na medida em que os estudos nos modelos animais ainda estão a decorrer no momento de apresentação desta tese, os resultados apresentados seguidamente são preliminares, correspondendo a avaliações que dizem respeito a murganhos cujo período experimental já terminou. No que diz respeito aos murganhos com xenotransplante da linha celular WiDr, o grupo controlo e o grupo submetido a 5-FU foram constituídos por quatro animais cada. No grupo de tratamento combinado de 5-FU e 2 Gy apresentam-se os resultados da análise de apenas um animal, único deste grupo de quatro, cujo período experimental está terminado. No grupo de tratamento 5-FU combinado com 10 Gy apresentam-se os resultados dos quatro animais que compõem o grupo experimental. No entanto, não foi possível realizar a monitorização até ao vigésimo dia uma vez que um animal morreu ao sexto dia e dois morreram no sétimo dia do período experimental.

No que concerne aos murganhos com xenotransplante da linha celular WiDr/10x, o grupo controlo foi constituído por quatro animais, e o grupo de tratamento com 5-FU foi constituído por quatro animais, dos quais um morreu no décimo terceiro dia do período experimental. Para o grupo de tratamento 5-FU combinado com 2 Gy apresentam-se os resultados do único animal que já terminou o período experimental; e no grupo de tratamento 5-FU combinado com 10 Gy apresentam-se os resultados dos quatro animais, três dos quais morreram no quinto, no sétimo e no oitavo dias do período experimental.

4.4.1 Avaliação do Crescimento Tumoral

Verificou-se que os tumores subcutâneos de xenotransplante da linha celular WiDr e da linha celular WiDr/10x ao fim de aproximadamente 4 semanas apresentaram um volume de 300 mm³. Dessa forma, foi possível obter dois modelos heterotópicos de CCR reprodutíveis com xenotransplante da linha celular WiDr e com xenotransplante da linha celular WiDr/10x.

Durante o período experimental, procedeu-se à recolha de fotografias ilustrativas da evolução dos tumores, como é possível visualizar na Figura 51, onde é apresentado a título de exemplo um murganho com xenotransplante da linha celular WiDr/10x do grupo controlo.



Figura 51 - Representação da evolução do xenotransplante da linha celular WiDr/10x num murganho do grupo controlo. D2, D11 e D16 correspondem aos 2º, 11º e 16º dias após o tratamento, respetivamente.

De acordo com o registo das dimensões dos tumores, foi possível obter as curvas relativas à taxa de crescimento dos mesmos em murganhos com xenotransplante da linha celular WiDr, apresentadas na Figura 52, e em murganhos com xenotransplante da linha celular WiDr/10x, como se observa na Figura 53. No que diz respeito ao volume tumoral relativo dos murganhos com xenotransplante da linha celular parental submetidos 5-FU e ao tratamento combinado com 10 Gy, não se observaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao dos murganhos não sujeitos a tratamento, embora se tenha verificado uma taxa de crescimento inferior no grupo submetido a 5-FU e 10 Gy do que no grupo controlo. Para além disso, o animal submetido a 5-FU e 2 Gy demonstrou uma tendência para a diminuição da taxa de crescimento tumoral, quando comparado com os animais não sujeitos a tratamento.

Relativamente aos grupos experimentais dos murganhos com xenotransplante da linha celular WiDr/10x, constatou-se que também não existem diferenças estatisticamente significativas entre os animais submetidos a tratamento com 5-FU e ao tratamento combinado com 10 Gy e os animais controlo. O animal submetido 5-FU e 2 Gy demonstrou uma tendência para a diminuição da taxa de crescimento em comparação com os animais controlo.

Comparando os grupos experimentais dos murganhos com xenotransplante da linha celular WiDr com os dos murganhos com xenotransplante da linha celular WiDr/10x, foi possível verificar que todos os grupos demonstram a mesma tendência no que diz respeito à taxa de crescimento tumoral, não se verificando diferenças estatisticamente significativas (nos casos em que foi possível proceder a análise estatística).

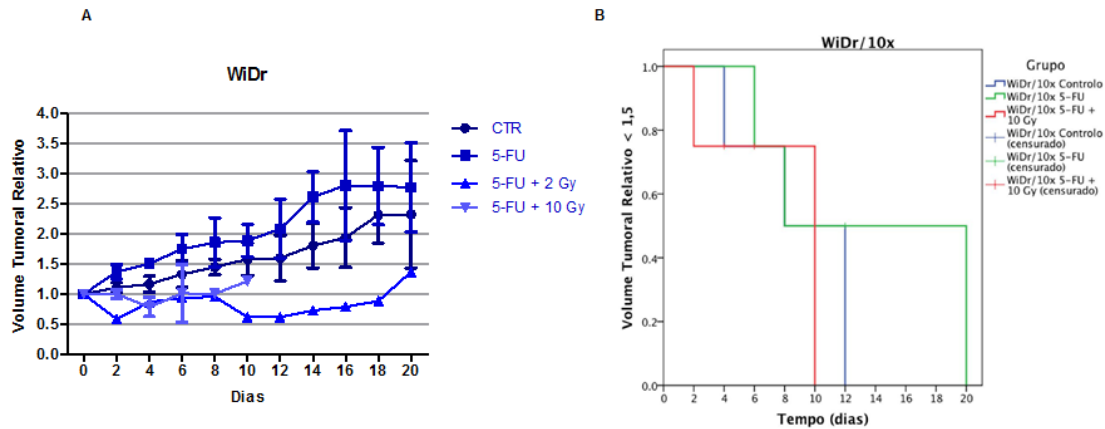


Figura 52 - Curvas da taxa de crescimento tumoral de murganhos com xenotransplante da linha celular WiDr. O gráfico A corresponde ao volume tumoral relativo ao longo do período experimental. As barras de erro correspondem ao erro padrão. O gráfico B corresponde às curvas de Kaplan-Meier, considerando-se como evento o momento em que foi atingido um volume tumoral relativo de 1,5.

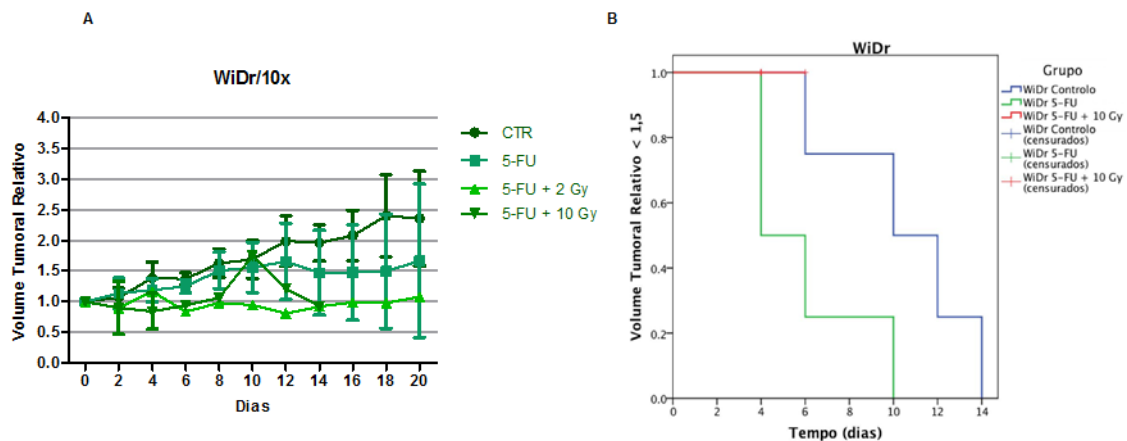


Figura 53 - Curvas da taxa de crescimento tumoral de murganhos com xenotransplante da linha celular WiDr/10x. O gráfico A corresponde ao volume tumoral relativo ao longo do período experimental. As barras de erro correspondem ao erro padrão. O gráfico B corresponde às curvas de Kaplan-Meier, considerando-se como evento o momento em que foi atingido um volume tumoral relativo de 1,5.

4.5 Estudos Ex Vivo

Terminado o período experimental, os tumores foram excisados e avaliados macroscopicamente, sendo posteriormente sujeitos a processamento histológico para avaliação microscópica. Durante a avaliação macroscópica dos tumores, foi possível identificar algumas semelhanças, nomeadamente na forma dos tumores, cor, brilho e consistência, como ilustrado na Figura 54. A maioria dos tumores apresentava forma irregular, sendo cor-de-rosa claros e brilhantes, com consistência dura a elástica. Relativamente ao aspeto da superfície do tumor, verificaram-se algumas diferenças. Os tumores dos grupos controlo dos murganhos com xenotransplantes diferentes possuíam uma superfície ulcerada enquanto os tumores dos grupos cujos murganhos foram submetidos a 5-FU e ao tratamento combinado de 5-FU + 2 Gy tinham aspeto vascularizado, com uma superfície lisa.

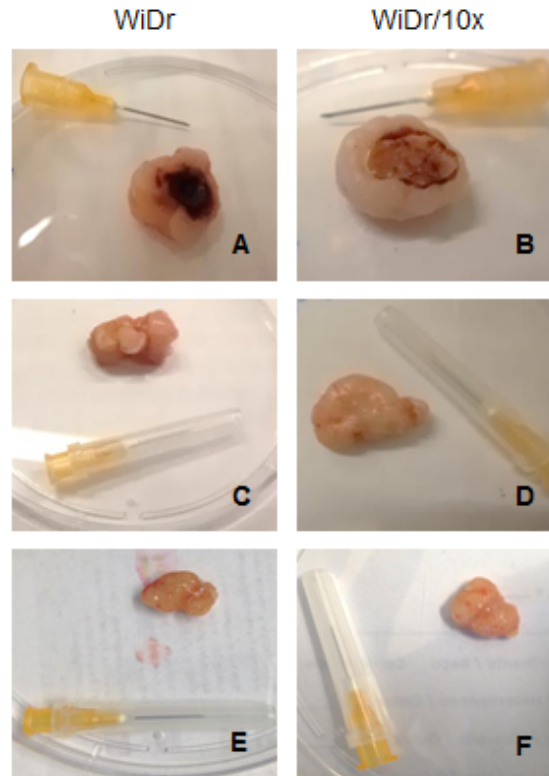


Figura 54 - Imagens representativas de tumores após a sua excisão. A, C e E correspondem a tumores de murganhos com xenotransplante da linha celular WiDr dos grupos controlo, 5-FU e 5-FU + 2 Gy, respetivamente. B, D e F correspondem a tumores de murganhos com xenotransplante da linha celular WiDr/10x dos grupos controlo, 5-FU e 5-FU + 2 Gy, respetivamente.

No que diz respeito à avaliação microscópica, verificou-se que o padrão das células neoplásicas é pouco diferenciado. Em algumas áreas foi possível observar formação de glândulas. Na maioria dos tumores observaram-se áreas variáveis de necrose, sobretudo na região central das secções histológicas. Na Figura 55 são apresentadas secções histológicas de murganhos com xenotransplante da linha celular WiDr. Na Figura 56 são apresentadas secções histológicas de murganhos com xenotransplante da linha celular WiDr/10x. Numa análise preliminar e qualitativa, não se observaram diferenças entre as secções histológicas dos xenotransplantes da linha celular WiDr e da linha celular WiDr/10x.

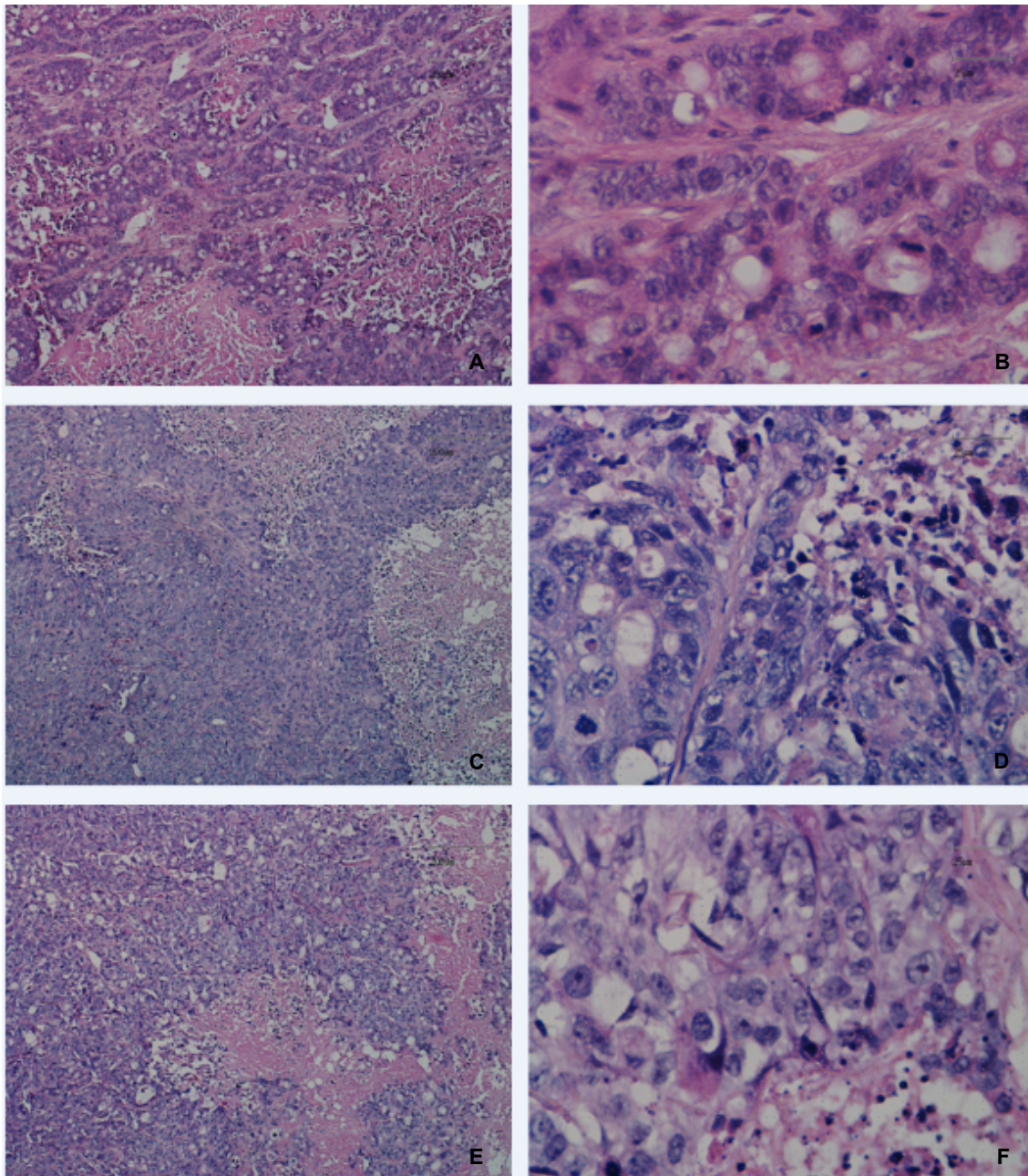


Figura 55 – Secções histológicas coradas com HE de murganhos com xenotransplantes da linha celular WiDr. A e B representam um tumor de um murganho controlo; C e D representam um tumor de um murganho do grupo 5-FU; E e F representam um tumor do murganho do grupo 5-FU + 2 Gy. As fotografias A, C e F têm uma ampliação de 100X e as fotografias B, D e E têm uma ampliação de 400X.

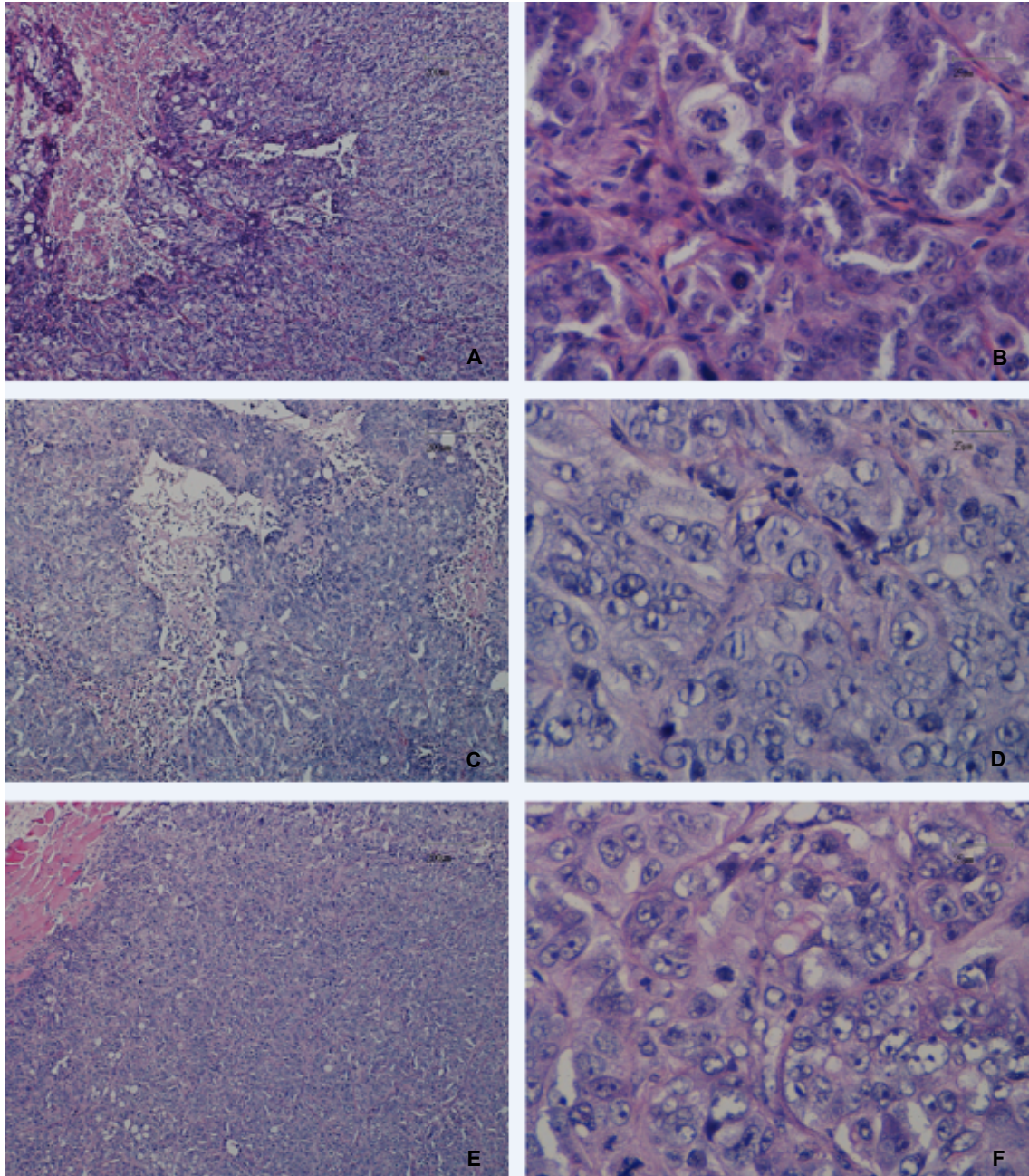


Figura 56 - Secções histológicas coradas com HE de murganhos com xenotransplantes da linha celular WiDr/10x. A e B representam um tumor de um murganho controlo; C e D representam um tumor de um murganho do grupo 5-FU; E e F representam um tumor do murganho do grupo 5-FU + 2 Gy. As fotografias A, C e F têm uma ampliação de 100X e as fotografias B, D e E têm uma ampliação de 400X.

5. Discussão

A pesquisa de novos fármacos, bem como da sua combinação com radioterapia, tem vindo a ser realizada nos últimos tempos e permanece constante com o objetivo de compreender os mecanismos subjacentes à resposta ao tratamento do cancro. Contudo, a incidência e mortalidade desta doença, nomeadamente de CCR são elevadas e é fulcral desenvolver abordagens terapêuticas que permitam uma resposta favorável ao doente. Embora a quimiorradioterapia constitua o tratamento neoadjuvante padrão nos estádios avançados da doença, possui algumas desvantagens^{23,34,36}.

Um problema que se prende com a quimiorradioterapia é a existência da resistência à terapêutica. Enquanto alguns doentes demonstram uma resposta patológica favorável, outros são confrontados com um mau prognóstico, não respondendo ao tratamento³⁵⁻³⁷. Esta carência de resposta pode ser devida a uma resistência intrínseca das células tumorais, bem como ser desenvolvida ao longo das sessões de tratamento. Sendo a quimiorradioterapia ineficaz nessas situações, seria vantajoso distinguir os doentes com boa capacidade de resposta daqueles com tumores resistentes à radioterapia ou com possibilidade de adquirir resistência a este tipo de tratamento antes da decisão terapêutica. Dessa forma, nos doentes cuja resposta à quimiorradioterapia fosse desfavorável a estratégia terapêutica deveria ser reformulada. Por um lado, poderiam não ser submetidos a um tratamento que não lhes traria benefícios relevantes e que causaria efeitos secundários, a curto e a longo prazo^{35,36,74}. Por outro lado, poderia ser possível ajustar o tratamento, através da implementação de estratégias que inibissem a repopulação das células tumorais resistentes⁸⁶. Essas estratégias devem ser específicas para as células tumorais no sentido de melhorar a resposta à terapêutica e podem incluir a alteração do esquema de fracionamento, através da diminuição do período de tratamento, impedindo a repopulação das células tumorais, ou a utilização de agentes com alvos moleculares, de forma a inibir seletivamente a proliferação tumoral durante a radioterapia^{86,87}.

Um dos objetivos da investigação em oncobiologia consiste na identificação de marcadores moleculares, isto é, moléculas que revelam sensibilidade do organismo ao tratamento e/ou moléculas que estejam relacionadas com resistência ao mesmo^{22,33,35,36,38,39,52}. A investigação de proteínas preditoras de sensibilidade ou de resistência tem sido realizada, tendo como premissa o facto de as proteínas constituírem moléculas-chave nos mecanismos de sinalização celular, sendo responsáveis pelo controlo das células saudáveis e das células tumorais. É sabido que as células tumorais apresentam mutações em genes responsáveis pelo seu correto funcionamento e, por isso, os mecanismos de reparação, de sobrevivência celular e de proliferação estão alterados³¹.

O estudo desenvolvido constitui a fase inicial de um projeto mais abrangente que tem como perspetiva contribuir para a identificação de marcadores moleculares envolvidos na resistência do CCR à radioterapia. No contexto da investigação no qual o presente estudo está inserido, pretendeu-se em primeiro lugar estabelecer linhas celulares humanas de adenocarcinoma colorretal resistentes à radioterapia. Para além disso, procurou-se avaliar a resposta das linhas sensíveis e resistentes após tratamento com radioterapia e quimiorradioterapia, *in vitro* e *in vivo*, e avaliar o perfil proteico das mesmas linhas celulares. Estes estudos constituem uma etapa fundamental da investigação, na medida em que providenciam informação sobre o comportamento das células resistentes à radioterapia e reforçam a necessidade, e importância, de identificar os mecanismos subjacentes à resistência.

Relativamente à indução de resistência à radioterapia na linha celular WiDr, verificou-se que os valores de DL50 corroboram os resultados obtidos para os fatores de sobrevivência para as doses 4 a 10 Gy, administradas em frações únicas, na medida em que as linhas celulares derivadas WiDr/6x e WiDr/10x apresentaram uma DL50 superior à da linha parental, bem como fatores de sobrevivência significativamente superiores para as doses mencionadas. O estabelecimento destas linhas resistentes à radioterapia foi conseguido num período aproximado de 6 e 10 semanas, respetivamente, a partir das populações sobreviventes da linha celular parental. A obtenção das linhas celulares derivadas comprova que algumas células tumorais, após várias irradiações consecutivas com uma dose baixa, têm capacidade de formar colónias, como também foi demonstrado por Smith *et al.*, ao estabelecerem linhas celulares resistentes à radioterapia a partir de linhas celulares de cancro da mama. Existem evidências de que, a par da repopulação de células nos tecidos normais após tratamento com radioterapia e com quimioterapia, ocorre a repopulação de células tumorais^{25,86,87}. Esta repopulação de células tumorais consiste na proliferação de células estaminais tumorais sobreviventes, ou seja, células com capacidade para formar colónias; ocorrendo durante o tratamento de radioterapia fracionada ou quimioterapia.

Por outro lado, verificou-se que também existem células que possuem capacidade intrínseca de sobreviver a irradiações cumulativas, como as células C2BBe1, que apresentam fatores de sobrevivência elevados quando submetidas a frações únicas de radiação. A DL50 obtida com esta linha celular foi superior às DL50 obtidas nas linhas celulares WiDr. As células C2BBe1 apresentaram um comportamento idêntico ao das células derivadas WiDr/10x. Ainda assim, durante 20 semanas procedeu-se à irradiação das células C2BBe1 com 2 Gy uma vez por semana. No entanto, as células com 18 frações cumulativas apresentaram fatores de

sobrevivência semelhantes aos das células nativas para as doses 2, 4, 6, 8 e 10 Gy (em frações únicas).

No que diz respeito à avaliação da atividade metabólica, as diferenças significativas em relação às células não submetidas a tratamento verificaram-se nos tempos mais longos, nomeadamente às 72 e às 96 horas, nas linhas celulares C2BBe1, WiDr, WiDr/6x e WiDr/10x, o que vai ao encontro do que está descrito na literatura, pois os efeitos da radioterapia não ocorrem a curto prazo, mas sim ao longo do tempo²⁵. Os resultados obtidos na linha celular C2BBe1 permitiram verificar que só nos tempos mais longos ocorre uma diminuição da proliferação para a dose mais elevada de radiação. A concentração de 5-FU utilizada para radiosensibilização levou à diminuição da proliferação quer em administração isolada quer em combinação com ambas as doses de radiação estudadas, na medida em que se obteve uma diminuição significativa da atividade metabólica após tratamento com 5-FU + 10 Gy em quase todos os períodos estudados comparativamente à irradiação isolada com 10 Gy; bem como uma diminuição significativa de 2 Gy para 5-FU + 2 Gy nos três tempos mais longos. Os resultados obtidos permitem afirmar que as células C2BBe1 apresentaram maior sensibilidade aos tratamentos combinados, bem como à administração de 5-FU, do que aos tratamentos com radioterapia isolada. Shin e colaboradores obtiveram resultados similares. Estes investigadores estudaram o tratamento combinado de um fármaco – cetuximab – com radioterapia, em quatro linhas celulares de CCR, entre as quais Caco-2 e WiDr, nativas⁵⁰. Ao avaliarem a proliferação celular através do ensaio do MTT, constataram que o efeito combinado do fármaco com a radiação inibiu significativamente a proliferação celular da linha celular Caco-2 (linha celular a partir da qual foi estabelecida a linha celular C2BBe1).

O comportamento da linha celular nativa WiDr foi diferente, uma vez que a administração de 5-FU não apresentou um efeito semelhante ao provocado nas células C2BBe1. A administração de 5-FU isolada e o tratamento combinado com 2 Gy não fizeram diminuir a atividade metabólica das células WiDr. Apenas se verificaram diminuições significativas nos tratamentos com 10 Gy, isolado e combinado, o que poderá significar que a concentração de 5-FU usada não tem efeito radiosensibilizante nesta linha celular. O mesmo se verificou nas linhas WiDr/6x e WiDr/10x, embora de uma forma menos notória, pois estas duas linhas apresentaram atividade metabólica superior à da linha celular parental nos tratamentos com a dose 10 Gy. Estes resultados permitem-nos inferir que as linhas celulares mais resistentes apresentam maior atividade metabólica do que a linha celular parental nos tratamentos com 10 Gy, corroborando a sua maior resistência a essa dose de radiação. Shin *et al.* verificaram que a atividade metabólica da linha celular nativa WiDr obtida no

tratamento combinado foi significativamente diferente da obtida no tratamento isolado de radioterapia⁵⁰. No nosso estudo, verificámos apenas uma diferença estatisticamente significativa às 96 horas, entre o tratamento com 5-FU isolado e ambos os tratamentos combinados.

Quanto aos resultados obtidos nos ensaios clonogénicos após tratamento com radioterapia e com quimiorradioterapia, verificou-se que o fator de sobrevivência das células C2BBE1 diminui de forma dependente da dose de radiação, ou seja, diminuiu de forma mais notória com a dose 10 Gy. Quer nos tratamentos de radioterapia isolada quer nos tratamentos combinados se verificou menor sobrevivência com a dose mais elevada. No entanto, o 5-FU não promoveu uma menor sobrevivência, na medida em que, comparando os tratamentos de radioterapia com os respetivos tratamentos combinados, não se verificou uma diminuição da sobrevivência celular. Pelo contrário, o tratamento com 5-FU + 10 Gy providenciou maior sobrevivência celular relativamente ao tratamento 10 Gy, embora não significativa. Shin *et al.* avaliaram também o efeito do cetuximab através do ensaio clonogénico e verificaram que o efeito citotóxico da radiação foi significativamente superior quando combinada com o fármaco, na linha celular Caco-2⁵⁰. Estes resultados, embora relativos a um fármaco diferente, demonstram de uma forma similar que a combinação de tratamentos permitiu um maior efeito comparativamente ao efeito da radioterapia isolada.

A linha celular WiDr demonstrou ser novamente mais afetada com os tratamentos com maior dose de radiação. Para além disso, a administração de 5-FU não radiosensibilizou as células, pois os tratamentos combinados apresentaram maior sobrevivência celular do que os respetivos tratamentos de radioterapia isolada, embora de forma não significativa. Novamente, estes resultados vão ao encontro dos resultados descritos por Shin *et al.* que também verificaram que o tratamento combinado de cetuximab e radiação não influenciou significativamente a sensibilidade das células WiDr à radiação⁵⁰. No entanto, contrariamente aos resultados obtidos no nosso estudo, Spitzner *et al.* constataram que a linha celular WiDr apresentou maior sensibilidade ao tratamento com 5-FU + 2 Gy do que a linha celular Caco-2³⁷. Curiosamente, a linha celular com menor sensibilidade no estudo destes investigadores foi a linha celular HT-29 (linha celular com características semelhantes à da linha celular WiDr⁵⁴) com um fator de sobrevivência de 81% para a mesma combinação, semelhante ao obtido no nosso estudo para a linha celular WiDr (85,0±8,2%).

As linhas celulares WiDr/6x e WiDr/10x apresentaram novamente maior sobrevivência para os tratamentos com maior dose de radiação. A maior sobrevivência

celular verificada no tratamento com 10 Gy, corrobora mais uma vez a maior resistência destas duas linhas relativamente à sua linha parental. A dose de radiação 2 Gy constitui uma dose baixa, possuindo pouco efeito nas linhas estudadas. Uma vez que não existem diferenças entre os fatores de sobrevivência dos tratamentos 10 Gy e 5-FU + 10 Gy, é possível afirmar que a diminuição verificada no segundo tratamento se deve à dose de radiação usada e que a concentração de 5-FU usada não tem, de facto, um efeito radiosensibilizante.

Os resultados dos ensaios do MTT e clonogénico permitiram verificar que a atividade metabólica e a sobrevivência celular foram afetadas do mesmo modo nas diversas linhas celulares, isto é, de forma dependente da dose de radiação aplicada. Para além disso, na linha C2BBe1, o efeito de radiosensibilização do 5-FU foi evidente em ambos os ensaios e, pelo contrário, nas linhas celulares WiDr não se verificou esse efeito; sendo estes resultados semelhantes aos do estudo de Shin e colaboradores, no que diz respeito à maior sensibilidade das células C2BBe1 para um tratamento combinado (embora com um fármaco diferente)⁵⁰. Os resultados obtidos permitem afirmar que o efeito de radiosensibilização com fármacos é dependente das linhas celulares de CCR.

Os ensaios do MTT e clonogénico são ensaios comumente utilizados para a avaliação de estudos de quimiorradioterapia e de radiosensibilidade^{25,40,57}. Embora o ensaio clonogénico seja maioritariamente usado para avaliar a sobrevivência de células submetidas a radiação e o ensaio do MTT seja preferencialmente usado no estudo de quimiossensibilidade ou citotoxicidade, ambos têm sido utilizados em conjunto em inúmeros estudos. Os dois ensaios têm revelado complementaridade e providenciado validade aos resultados obtidos, em inúmeros estudos de resposta à radioterapia bem como de radiosensibilização, como aliás, mostra também o nosso estudo^{25,37,40,50,57,88}.

De acordo com os resultados obtidos com o ensaio cometa, foi possível verificar que as linhas celulares C2BBe1, WiDr/6x e WiDr/10x apresentaram mais danos no DNA do que a linha celular WiDr, após os tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia. Relativamente à linha celular C2BBe1, nos ensaios anteriores verificou-se uma maior capacidade de resposta por parte das células nos tratamentos com radioterapia do que nos tratamentos com 5-FU. No entanto, o mesmo não se verificou em relação aos danos no DNA, na medida em que se observou um aumento significativo do momento de cauda em relação às células não tratadas, inclusive nos tratamentos com radioterapia isolada. As linhas celulares WiDr/6x e WiDr/10x, que nos ensaios anteriores demonstraram atividade metabólica e sobrevivência superiores para os tratamentos com maior dose de radiação, apresentaram mais danos no DNA

relativamente à linha celular parental, inclusivé nesses tratamentos. Estes resultados são, de certa forma, inesperados, uma vez que se perspectivou que células com maior capacidade de proliferação e sobrevivência após tratamento com radioterapia apresentassem menor instabilidade e, conseqüentemente, menos danos no DNA^{25,31}. Dessa forma, estes resultados sugerem que as células C2BBe1, WiDr/6x e WiDr/10x, resistentes à radioterapia, permanecem metabolicamente ativas e com capacidade proliferativa a par com os danos no DNA causados pelos tratamentos. Está descrito que, embora com reparação ineficiente, as células podem sobreviver com esses danos após serem sujeitas a tratamento⁸⁹. Por exemplo, mutações no gene *TP53* conferem resistência à apoptose, um dos mecanismos de defesa das células após detecção de danos induzidos por tratamentos^{49,90}. Uma vez que as linhas celulares WiDr e C2BBe1 possuem uma mutação no gene *TP53*, os danos causados pelos tratamentos estudados poderão não ser reconhecidos pelas células que, conseqüentemente, não entram em apoptose. Ainda assim, foi possível verificar que, de um modo geral, os danos são maiores nos tratamentos com a maior dose de radiação do que nos tratamentos com menor dose e do que o tratamento com 5-FU, o que está de acordo com a literatura existente⁹¹. No entanto, com os ensaios realizados não foi possível identificar o(s) motivo(s) da maior quantidade de danos no DNA das células mais resistentes à radioterapia. De acordo com os resultados obtidos neste ensaio, considera-se pertinente a utilização de outra(s) técnica(s) que permita(m) confirmar estes resultados, nomeadamente identificar o tipo de danos causados, como quebras nas duas cadeias da dupla hélice de DNA através da marcação da histona γ -H2AX por técnicas de imunocitoquímica^{79,91}. Kiang e colaboradores referiram que existe uma relação aproximada de 1:1 entre os danos de DNA nas duas cadeias e focos com a histona γ -H2AX (fosforilada pela proteína ATM)⁹¹. Para além disso, seria interessante avaliar os danos no DNA num período de tempo mais longo após os tratamentos, nomeadamente às 48 ou às 96h, com o intuito de verificar se os danos nas células mais resistentes persistiam ou não.

Importa recordar que, embora se tenha caracterizado o comportamento da linha celular C2BBe1 relativamente à atividade metabólica e sobrevivência após tratamento com radioterapia e com quimiorradioterapia, não se prosseguiram estudos de citometria de fluxo com essa linha celular. Relativamente à viabilidade e tipos de morte celular, verificou-se que a linha celular parental WiDr apresentou menor viabilidade celular nos diversos tratamentos, em comparação com as linhas celulares derivadas WiDr/6x e WiDr/10x, nomeadamente para os tratamentos com maior dose de radiação (onde se observaram diferenças estatísticas). Para além disso, foi possível constatar que os tratamentos utilizados induziram maioritariamente morte

celular por necrose, em todas as linhas celulares, embora com menor evidência na linha WiDr/6x. A apoptose constitui o principal tipo de morte celular observado em resposta à radiação, em células com mecanismos pró-apoptóticos preservados⁴⁶. No entanto, a maioria dos tumores perde esses mecanismos. O facto de se ter observado um maior número de células em necrose do que em apoptose, pode ser justificado, em parte, pelo facto de o gene *TP53* estar mutado. Estes resultados reforçam a hipótese lançada anteriormente de que a apoptose nestas linhas celulares pode estar comprometida devido à mutação no gene *TP53*. Ainda assim, as linhas celulares WiDr/6x e WiDr/10x demonstraram maior viabilidade do que a sua linha celular parental, pelo que outros mecanismos deverão estar envolvidos na sua maior resistência à apoptose. Eriksson *et al.* indicaram que a resistência à apoptose também pode ser consequência do aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como BCL-2 e survivina, ou da inativação de genes pró-apoptóticos, como *Bax*, pelo que as linhas celulares derivadas poderão ter adquirido mutações com implicações nestes mecanismos⁴⁶. Verificou-se que, tal como nos ensaios de proliferação e de sobrevivência celular, a viabilidade foi afetada de uma forma dependente da dose de radiação e que o 5-FU não apresentou um efeito radiosensibilizante quando combinado com radioterapia.

Os resultados obtidos na avaliação da concentração intracelular de peróxidos permitiram verificar que houve maior produção de peróxidos nos tratamentos com maior dose de radiação, nas três linhas celulares em estudo. Estes resultados corroboram os resultados obtidos no ensaio cometa, verificando-se que os danos no DNA também foram superiores nos tratamentos com 10 Gy. Por sua vez, o 5-FU administrado de forma isolada não causou maior formação de peróxidos em nenhuma das linhas celulares. No entanto, a comparação das três linhas celulares permitiu verificar que apresentaram concentrações intracelulares de peróxidos semelhantes entre si, verificando-se apenas diferenças significativas nas condições 5-FU, entre a linha celular parental e a linha celular WiDr/6x, e 5-FU + 10 Gy, entre a linha celular parental e as duas linhas celulares derivadas. Em relação à concentração intracelular do anião superóxido, o mesmo se verificou relativamente aos tratamentos com maior dose de radiação. No entanto, da linha celular nativa para a linha celular com maior número de frações cumulativas foi possível constatar que esse aumento foi menos evidente, pois na linha celular nativa verificou-se um aumento significativo enquanto na linha celular WiDr/10x as diferenças não tiveram significado estatístico. Na globalidade, os restantes tratamentos não induziram maior formação do radical superóxido, com exceção do tratamento 5-FU + 2 Gy na linha celular WiDr/10x.

Os resultados obtidos na avaliação da concentração intracelular de peróxidos e do anião superóxido permitiram verificar que na maioria dos tratamentos a linha celular parental apresentou uma resposta semelhante às linhas celulares resistentes à radioterapia, não tendo os tratamentos induzido mais ROS na linha celular nativa. No ensaio cometa, realizado imediatamente após os tratamentos, verificou-se que as linhas derivadas possuíam ambas mais danos no DNA do que a linha nativa, pelo que seria de esperar que esses danos pudessem ter sido causados pela maior formação de ROS nessas duas linhas celulares, após os tratamentos. No entanto, tal não se verificou.

Noutra perspetiva, a formação de ROS constitui um dos eventos precoces após a irradiação, pelo que a concentração destas moléculas deve apresentar-se mais alterada em períodos curtos após os tratamentos com radioterapia^{25,92,93}. Nesse sentido, seria útil avaliar o stresse oxidativo em períodos inferiores ao período usado neste trabalho (96 horas após os tratamentos).

No que diz respeito aos resultados da expressão da GSH nas três linhas celulares, as diferenças com significado estatístico verificaram-se nos tratamentos com menor dose de radiação e no tratamento com 5-FU, ao contrário do que se foi constatando nos ensaios anteriores. Uma vez que não se verificou uma tendência para o aumento da expressão de GSH com o aumento da dose de radiação, parece importante a confirmação destes resultados através da avaliação de outras moléculas antioxidantes, como por exemplo a superóxido dismutase. Esta molécula também é utilizada como indicador das defesas antioxidantes, sendo avaliada em paralelo com a GSH^{94,95}. Quanto à comparação entre as três linhas celulares, a linha celular nativa apresentou maior expressão da GSH na condição 2 Gy, em comparação com a linha celular derivada WiDr/10x e nas condições 5-FU e 5-FU + 2 Gy, relativamente à linha celular WiDr/6x. No entanto, não se verificaram diferenças significativas nos tratamentos com 10 Gy e 5-FU + 10 Gy. O facto de esse aumento da GSH não se verificar nos tratamentos com maior dose de radiação pode indicar que para doses mais elevadas as células não despoletam mecanismos de defesa, mas sim mecanismos que culminam em morte celular, devido à maior agressividade dessa dose e, conseqüentemente, à incapacidade de reparar os danos causados.

Quanto aos resultados da razão monómeros/agregados, verificou-se um maior aumento desta razão nos tratamentos com maior dose de radiação em todas as linhas celulares, revelando uma diminuição do potencial da membrana mitocondrial das células quando submetidas a uma dose elevada de radiação. No entanto, apenas a linha celular WiDr/10x apresentou um menor aumento em comparação com a linha celular nativa, no tratamento com 10 Gy; por outro lado, no tratamento com

5-FU + 10 Gy não se obtiveram diferenças estatisticamente significativas. A linha celular WiDr/6x apresentou resultados muito semelhantes aos da linha celular parental. Estes resultados corroboram os resultados obtidos no ensaio do MTT, 96 horas após os tratamentos, onde também se verificou que a linha WiDr/6x se comportou de forma semelhante à linha nativa e que a linha WiDr/10x apresentou maior atividade metabólica na condição 10 Gy. No entanto, os resultados relativos à condição 5-FU + 10 Gy não vão ao encontro dos resultados da atividade metabólica, uma vez que este tratamento induziu uma diferença significativa entre as linhas celulares WiDr/6x e WiDr/10x no que diz respeito à razão monómeros/agregados, sendo a razão monómeros/agregados da linha celular WiDr/6x semelhante à da linha celular nativa, e, por outro lado, não induziu diferenças estatisticamente significativas entre as três linhas celulares relativamente à atividade metabólica.

De acordo com os resultados obtidos relativamente ao stresse oxidativo, defesas antioxidantes e potencial de membrana mitocondrial, poder-se-á colocar a hipótese de que os danos causados no DNA nas células resistentes à radioterapia se devem principalmente aos efeitos diretos da radiação em detrimento da formação de ROS, na medida em que na globalidade dos resultados não se verificaram diferenças entre a linha celular parental e as linhas celulares derivadas. Afigura-se que a sugestão de avaliação do stresse oxidativo num período mais curto se estende à avaliação da expressão da GSH e do potencial de membrana mitocondrial, visto estarem todos estes parâmetros relacionados entre si⁹⁶⁻⁹⁸.

Considera-se importante estudar o ciclo celular, com o intuito de verificar se os tratamentos usados induzem alterações ou bloqueio em algum dos *checkpoints* do ciclo celular, pois a radiação pode induzir paragem nas transições G1-S e G2-M⁸⁰. O 5-FU também pode condicionar as fases do ciclo celular, inibindo a replicação do DNA e a síntese de ácido ribonucleico⁹⁹. Também seria relevante verificar se existem diferenças entre as linhas celulares resistentes à radioterapia e a linha celular parental, uma vez que está descrito que determinadas fases do ciclo celular desencadeiam maior sensibilidade à radioterapia do que outras fases, nomeadamente a transição G2-M^{77,99,100}. Na medida em que o ciclo celular é regulado por proteínas cinases, seria interessante avaliar a expressão das proteínas cinases Chk1/2.

Relativamente aos estudos *in vitro* das linhas celulares WiDr, WiDr/6x e WiDr/10x, considera-se relevante proceder à otimização da concentração de 5-FU, no sentido de aumentar o efeito dos tratamentos combinados quer na linha celular sensível, quer nas linhas celulares resistentes à radioterapia.

No que diz respeito à técnica de eletroforese 2D, foi possível verificar diferenças no perfil proteico entre as linhas celulares WiDr e WiDr/10x. Embora os

resultados relativos a esta técnica sejam preliminares e careçam de novos ensaios para confirmar o perfil proteico de ambas as linhas celulares, foi possível inferir que a radiorresistência se traduz por alterações na expressão proteica das células, como documentado por Smith *et al.*²² bem como por Smith *et al.*³¹. Este facto realça a necessidade de identificar as proteínas diferentemente expressas entre as linhas celulares WiDr e WiDr/10x, na medida em que os diferentes perfis proteicos obtidos poderão estar por detrás das diferenças, ou de algumas diferenças, obtidas nos ensaios *in vitro*. Por exemplo, os tipos de morte celular desencadeados após tratamento com radioterapia podem ser devidos à expressão de diferentes proteínas envolvidas na regulação da sobrevivência celular^{46,89}.

Mais ainda, essa identificação poderia levar à descoberta de marcadores preditivos de resposta ao tratamento com radioterapia, sendo possível verificar se marcadores atualmente sugestivos de resposta ao tratamento, como EGFR, COX-2 e peroxirredoxina, estão presentes nas linhas celulares estudadas e de que forma são expressos^{33,35,52}. Uma vez que no estudo desenvolvido por Smith *et al.* se verificou uma tendência para a diminuição da expressão de componentes do proteossoma 26S, complexo de proteínas envolvido na degradação proteica, nas linhas radiorresistentes, seria pertinente avaliar a sua expressão nas linhas celulares radiorresistentes WiDr/6x e WiDr/10x¹⁰¹.

A eletroforese 2D afigura-se como uma técnica vantajosa nos estudos de proteómica, sendo considerada uma das melhores na medida em que permite a separação de inúmeras proteínas num único gel^{75,102}. O protocolo utilizado constituiu um método sensível para avaliar a expressão proteica das linhas celulares WiDr e WiDr/10x, permitindo a obtenção de resultados promissores relativamente à expressão proteica de células resistentes à radioterapia.

Quanto aos estudos *in vivo*, constatou-se que não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo e os grupos submetidos a 5-FU e a 5-FU combinado com 10 Gy, tanto nos grupos de xenotransplante da linha celular WiDr como de xenotransplante da linha celular WiDr/10x.

Está documentado que a dose máxima tolerada por murganhos *balb/c* é de 100mg/kg⁸³. Com o objetivo de radiosensibilização, é utilizada clinicamente uma dose de quimioterapia correspondente a 2/3 da dose utilizada em terapêutica adjuvante¹⁸. Deste modo, utilizou-se uma concentração em proporção correspondente. Não havendo estudos bibliográficos que documentassem que a dose 66,6mg/kg de 5-FU teria apenas efeito radiosensibilizante, considerou-se necessário utilizar um segundo grupo controlo nomeadamente com animais tratados apenas com 5-FU. Assim seria

espectável que não fossem observadas diferenças significativas entre este grupo e o grupo de animais não tratados.

Relativamente ao grupo submetido a 5-FU, os resultados obtidos vão ao encontro dos resultados obtidos *in vitro*, o que deverá ser justificado pela concentração de radiosensibilização em estudo que, por si, não possui um efeito inibidor da proliferação nem da sobrevivência celular. Seeliger e colaboradores também verificaram que o tratamento por eles estudado com 5-FU isolado, administrado via intraperitoneal numa concentração de 100 mg/kg de peso corporal, não teve influência na proliferação celular⁸³.

Apesar de não se terem detetado diferenças significativas, no caso dos animais tratados com 5-FU + 10 Gy, o volume tumoral relativo deste grupo é tendencialmente inferior. Esta situação poderá estar relacionada com o número reduzido de animais, bem como com o facto de os animais submetidos a tratamento combinado terem apresentado uma sobrevivência limitada durante o período experimental. Este facto pode estar relacionado com a administração concomitante de 5-FU com 10 Gy. Alguns estudos sobre o efeito da radioterapia, nomeadamente com doses de radiação similares ou superiores à dose 10 Gy (9 Gy e 15 Gy, por exemplo) em murganhos atômicos com xenotransplantes de linhas celulares de CCR, não verificaram mortes após o tratamento^{50,82}. Por outro lado, não foram previamente reportados estudos com combinação de 5-FU na concentração utilizada e a dose de 10 Gy, pelo que esta combinação pode não ser tolerada pelos animais. Por forma a tornar a análise mais robusta, seria necessário aumentar o número de animais no estudo.

Relativamente aos murganhos submetidos ao tratamento combinado de 5-FU e 2 Gy, embora a curva corresponda a apenas um animal para cada tipo de xenotransplante, verificou-se que em ambos os casos, os volumes tumores relativos são sempre inferiores aos grupos controlo e 5-FU. Este resultado é promissor e corrobora o interesse em aumentar o número de animais nestes grupos. Seria interessante perceber se com um grupo maior a resposta dos dois tipos de xenotransplante seria distinta.

Não há muitos estudos bibliográficos que abordem em estudos *in vivo* a temática da radiorresistência. Shin e colaboradores descrevem a utilização de vários grupos experimentais para avaliar o efeito da combinação do cetuximab com a radioterapia, em xenotransplantes de linhas celulares de CCR em murganhos atômicos. Os resultados desse trabalho permitiram verificar que o tratamento com radioterapia isolada (9 Gy) proporcionou uma diminuição do volume tumoral relativo, em relação ao do grupo de animais controlo, não tratados. Mais ainda, verificaram que o tratamento combinado de cetuximab e radioterapia potenciou a diminuição do

volume tumoral relativo, pois durante os 10 dias consecutivos ao tratamento o volume tumoral relativo manteve o mesmo valor⁵⁰.

Seierstad e colaboradores reportaram a irradiação de xenotransplantes em murganhos imunodeprimidos. Estes investigadores irradiaram tumores subcutâneos de xenotransplante da linha celular HT29 em murganhos imunodeprimidos com uma dose única de 15 Gy no dia em que o diâmetro menor do tumor atingiu 10 mm. Assim como verificaram uma inibição tumoral de aproximadamente 55% e 65% nos dias 6 e 10, respetivamente, em relação aos animais controlo, num período de monitorização de 30 dias⁸².

Como perspetiva futura pretende-se também avaliar o efeito das doses 2 e 10 Gy isoladas, com o intuito de verificar se a tendência da diminuição da taxa de crescimento é devida à combinação 5-FU e dose de radiação ou apenas à dose de radiação.

Os resultados preliminares obtidos neste trabalho, assim como a existência de poucos estudos publicados semelhantes, reforça a importância deste trabalho e da sua continuidade. A avaliação da resposta após terapêutica combinada de tumores resistentes é essencial, uma vez que a quimiorradioterapia constitui a abordagem indicada para tumores localmente avançados¹⁸.

Os tumores excisados dos ratinhos foram avaliados por análise histopatológica, com a coloração HE, e não se encontraram diferenças entre os tumores de células WiDr e WiDr/10x, quer no grupo controlo quer nos grupos de tratamento. Seria interessante avaliar a capacidade proliferativa das células tumorais xenotransplantadas após os tratamentos, através da expressão de Ki67, proteína nuclear expressa em células nas fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M) e ausente nas células quiescentes (G0). Mais ainda, seria pertinente avaliar essa expressão em momentos diferentes após o tratamento, para verificar se ao longo do mesmo as células tumorais readquirem capacidade proliferativa, como Zwicker *et al.* fizeram, ao estudar o efeito radiosensibilizante do dicloroacetato em xenotransplantes da linha celular WiDr e como Seeliger *et al.* procederam ao estudar o efeito combinado de 5-FU e rapamicina^{83,88}.

Outro aspeto interessante seria avaliar a expressão da enzima timidilato sintetase, quer em cultura celular quer nos xenotransplantes, na medida em que a sua expressão pelos tumores é uma importante condicionante do tratamento e do prognóstico de CCR. Esta enzima é fundamental na conversão do 5-FU no seu metabolito 5-fluoro-dUMP, forma citotóxica ativa, promovendo a citotoxicidade do 5-FU. Seeliger *et al.* verificaram que *in vitro* a expressão desta enzima era relativamente baixa, mas *in vivo* observaram uma expressão elevada, sugerindo que

as células transplantadas eram induzidas a produzir a enzima ou que as células do estroma possuíam elevados níveis da enzima⁸³.

Afigura-se que os resultados obtidos nesta tese são promissores, na medida em que foi possível obter linhas celulares resistentes à radioterapia e foi possível obter informação relevante sobre a resposta destas linhas celulares aos tratamentos com radioterapia e com quimiorradioterapia, no que diz respeito à proliferação e à sobrevivência celulares, à viabilidade e aos tipos de morte celular, aos danos no DNA e ao stresse oxidativo. Para além disso, os resultados obtidos sugerem a realização de mais estudos, uns com adaptações do desenho experimental inicial, outros com a aplicação de metodologias diferentes, no sentido de enriquecer a caracterização das linhas celulares resistentes à radioterapia e, conseqüentemente, de compreender os mecanismos subjacentes à resistência à radioterapia. Destaca-se a importância de prosseguir os estudos com a identificação das proteínas detetadas nos géis de *SDS-PAGE*, com o intuito de identificar potenciais marcadores preditivos de resistência ou sensibilidade à radioterapia nas linhas celulares humanas de CCR.

No que diz respeito aos resultados *in vivo*, embora se trate de um estudo piloto, as tendências verificadas com o tratamento 5-FU + 2 Gy e os resultados obtidos com o tratamento 5-FU + 10 Gy – diminuição do volume tumoral relativo em comparação com o dos animais não submetidos a tratamento e com o dos animais submetidos a 5-FU isolado – afigura-se que o ajuste de tratamentos combinados de quimioterapia e radioterapia podem ser um caminho a percorrer para alcançar a reversão da resistência à radioterapia. Esta hipótese, se confirmada, poderá contribuir para a melhoria da resposta dos doentes com CCR, com perfil resistente à radioterapia, e, conseqüentemente, para a diminuição da mortalidade provocada por esta doença.

6. Conclusão

Com a realização desta tese, cujos principais objetivos consistiram em estabelecer linhas celulares humanas de CCR resistentes à radioterapia e caracterizar a sua resposta após tratamento com radioterapia e com quimiorradioterapia *in vitro* e *in vivo*, foi possível obter algumas conclusões.

Em primeiro, foi possível estabelecer duas linhas celulares humanas de CCR resistentes à radioterapia, a partir da linha parental WiDr – WiDr/6x e WiDr/10x, assim designadas por terem sido obtidas após 6 e 10 irradiações cumulativas com a dose individual semanal de 2 Gy, respetivamente. No entanto, o mesmo não se verificou com a linha celular C2BBE1, uma vez que esta linha apresentou fator de sobrevivência elevado quando submetida a doses elevadas de radioterapia, após 18 frações cumulativas.

As linhas celulares resistentes à radioterapia, WiDr/6x e WiDr/10x, apresentaram proliferação e sobrevivência celulares mais elevadas para os tratamentos com a dose mais alta de radiação do que a linha celular nativa, corroborando a sua maior resistência à radioterapia.

Quanto aos danos no DNA, foi possível concluir que as linhas celulares resistentes apresentaram DNA mais degradado em comparação com a linha parental. Para além disso, a linha celular C2BBE1 também apresentou mais danos do que a linha celular WiDr, levantando a hipótese de que células mais resistentes à radioterapia têm a capacidade de sobreviver e de proliferar mesmo com danos extensos no DNA.

No que diz respeito à viabilidade e tipos de morte celular, foi possível concluir que os tratamentos usados induzem diminuição do número de células viáveis, embora essa diminuição seja menor nas linhas celulares mais resistentes à radioterapia. Para além disso, concluiu-se que o tipo de morte predominantemente causado pelos tratamentos foi necrose.

Relativamente ao stresse oxidativo, verificou-se que para os tratamentos com maior dose de radiação houve um aumento da formação de peróxidos e do anião superóxido. No entanto, em relação à expressão da proteína protetora GSH não se verificaram diferenças da sua expressão entre as células submetidas a tratamento e as células não tratadas, na globalidade dos resultados. Quanto ao potencial de membrana mitocondrial, verificou-se que os tratamentos com 10 Gy e com 5-FU + 10 Gy desencadearam uma diminuição significativa do potencial de membrana mitocondrial em todas as linhas estudadas. No entanto, verificou-se que da linha celular WiDr para a linha celular WiDr/10x a diminuição do potencial mitocondrial com o tratamento 10 Gy foi menor, corroborando o comportamento mais resistente da segunda linha celular.

A eletroforese 2D, embora com resultados preliminares, permitiu verificar uma tendência para a diferente expressão proteica entre as linhas celulares WiDr e WiDr/10x, salientando a importância da identificação das proteínas observadas nos géis.

Quanto aos estudos *in vivo*, foi possível estabelecer um modelo heterotópico de xenotransplante com a linha celular WiDr/10x. Embora não se tenham verificado diferenças estatisticamente significativas, os tratamentos combinados de 5-FU e 2 Gy e de 5-FU e 10 Gy promovem uma diminuição da taxa de crescimento tumoral quando comparados com os grupos de tratamento de 5-FU e com os grupos controlo.

7. Referências

1. Jemal, A., Bray, F. & Ferlay, J. Global Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*. **61**, 69–90 (2011).
2. Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. Cancer Statistics , 2013. *A Cancer Journal for Clinicians*. **63**, 11–30 (2013).
3. WHO. World Health Statistics 2012, Part II Highlighted topics. *World Health Statistics*. 33–46 (2012).
4. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (2014)
5. Lincender-Cvijetić, L., Banjin-Čardžić, M., Vegar-Zubović, S. & Vrcić, D. Radiological imaging of rectal cancer. *Acta Medica Academica*. **41**, 199–209 (2012).
6. Merck, Sharp & Dohme. *Enciclopédia Médica Volume 7: Doenças da Boca e dos Dentes, Perturbações Gastrointestinais* (2009).
7. Bolocan, A., Ion, D., Ciocan, D. N. & Paduraru, D. N. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *Chirurgia*. **107**, 555–63 (2012).
8. Cress, R. D., Morris, C., Ellison, G. L. & Goodman, M. T. Secular changes in colorectal cancer incidence by subsite, stage at diagnosis, and race/ethnicity, 1992-2001. *Cancer* **107**, 1142–52 (2006).
9. Sarfaty, M. & Wender, R. How to increase colorectal cancer screening rates in practice. *A Cancer Journal for Clinicians*. **57**, 354–66 (2007)
10. Edwards, B. K. *et al.* Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2006, Featuring Colorectal Trends and Impact of Interventions (Risk Factors, Screening, and Treatment) to Reduce Future Rates. *Cancer*. **116**, 544–573 (2010).
11. Center, M. M., Jemal, A., Smith, R. A. & Ward, E. Worldwide Variations in Colorectal Cancer. *A Cancer Journal for Clinicians*. **59**, 366-378 (2009).
12. Stevens, A., Lowe, J. & Scott, I. *Core Pathology*. (Mosby Elsevier, 2009).

13. Seeley, R., Stephens, T. & Tate, P. *Anatomia & Fisiologia*. (Lusodidacta, 1997).
14. Gonçalves, C. & Bairos, V. *Histologia; Texto e Imagens; Histologia, Histogênese e Organogênese*. (Imprensa da Universidade, 2007).
15. National Cancer Institute. Colon and Rectal Cancer. <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/colon-and-rectal> (2013).
16. EuropaColon. Colorectal Cancer. <http://www.europacoln.com/colorectalcancer> (2013).
17. Elmunzer, B. J. *et al.* Effect of flexible sigmoidoscopy-based screening on incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLOS Medicine*. **9**, 1-9 (2012).
18. National Comprehensive Cancer Network®. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology NCCN Guidelines® Rectal Cancer Version 3.2012. (2012).
19. Edge, S. B. *et al.* American Joint Committee on Cancer *CANCER STAGING MANUAL*. (Springer, 2010).
20. Dietz, D. W. Multidisciplinary Management of Rectal Cancer: the OSTRICH. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. **17**, 1863–8 (2013).
21. Dworak, O., Keilholz, L. & Hoffmann, A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *International Journal of Colorectal Disease*. **12**, 19–23 (1997).
22. Smith, L. *et al.* Proteomic Identification of Putative Biomarkers of Radiotherapy Resistance: A Possible Role for the 26S Proteasome?. **11**, 1194–1207 (2009).
23. Rödel, C. *et al.* Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. **23**, 8688–96 (2005).
24. Meyn, R. E., Stephens, L. C. & Milas, L. Programmed cell death and radioresistance. *Cancer and Metastasis Reviews*. **15**, 119–31 (1996).
25. Joiner, M. & van der Kogel, A. *Basic Clinical Radiobiology*. (HODDER ARNOLD, 2009).

26. Marijnen, C. A. M. *et al.* Acute Side Effects and Complications After Short-Term Preoperative Radiotherapy Combined With Total Mesorectal Excision in Primary Rectal Cancer: Report of a Multicenter Randomized Trial. *Journal of Clinical Oncology*. **20**, 817–825 (2003).
27. Stephens, R. J. *et al.* Impact of short-course preoperative radiotherapy for rectal cancer on patients' quality of life: data from the Medical Research Council CR07/National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group C016 randomized clinical trial. *Journal of Clinical Oncology*. **28**, 4233–9 (2010).
28. Mohiuddin, M. *et al.* Prognostic significance of postchemoradiation stage following preoperative chemotherapy and radiation for advanced/recurrent rectal cancers. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics*. **48**, 1075–80 (2000).
29. Sauer, R. *et al.* Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *The New England Journal of Medicine*. **351**, 1731–40 (2004).
30. Peeters, K. C. M. J. *et al.* Late side effects of short-course preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for rectal cancer: increased bowel dysfunction in irradiated patients - A Dutch colorectal cancer group study. *Journal of Clinical Oncology*. **23**, 6199–206 (2005).
31. Smith, F. M., Reynolds, J. V, Miller, N., Stephens, R. B. & Kennedy, M. J. Pathological and molecular predictors of the response of rectal cancer to neoadjuvant radiochemotherapy. *European Journal of Surgical Oncology*. **32**, 55–64 (2006).
32. Wu, X. *et al.* Genetic variations in radiation and chemotherapy drug action pathways predict clinical outcomes in esophageal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. **24**, 3789–98 (2006).
33. Bengala, C. *et al.* Epidermal growth factor receptor gene copy number, K-ras mutation and pathological response to preoperative cetuximab, 5-FU and radiation therapy in locally advanced rectal cancer. *Annals of Oncology*. **20**, 469–74 (2009).

34. Samuelian, J. M. *et al.* Reduced acute bowel toxicity in patients treated with intensity-modulated radiotherapy for rectal cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. **82**, 1981–7 (2012).
35. Chen, M.-F. *et al.* Role of peroxiredoxin I in rectal cancer and related to p53 status. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. **78**, 868–78 (2010).
36. Garcia-aguilar, J. *et al.* Identification of a biomarker profile associated with resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in rectal cancer. *Annals of Surgery*. **254**, 486–493 (2012).
37. Spitzner, M. *et al.* A gene expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. **78**, 1184–92 (2010).
38. Horisberger, K. *et al.* Annexin and survivin in locally advanced rectal cancer: indicators of resistance to preoperative chemoradiotherapy? *Onkologie*. **33**, 439–44 (2010).
39. Lamas, M. J. *et al.* X-ray cross-complementing group 1 and thymidylate synthase polymorphisms might predict response to chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. **82**, 138–44 (2012).
40. Balça-Silva, J. *et al.* Effect of miR-34b overexpression on the radiosensitivity of non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Research*. **32**, 1603–9 (2012).
41. Nix, P., Cawkwell, L., Patmore, H., Greenman, J. & Stafford, N. Bcl-2 expression predicts radiotherapy failure in laryngeal cancer. *British Journal of Cancer*. **92**, 2185–9 (2005).
42. Harper, J. W. & Elledge, S. J. The DNA damage response: ten years after. *Molecular Cell*. **28**, 739–45 (2007).
43. An, J., Chervin, a S., Nie, a, Ducoff, H. S. & Huang, Z. Overcoming the radioresistance of prostate cancer cells with a novel Bcl-2 inhibitor. *Oncogene* **26**, 652–61 (2007).

44. Chang-Claude, J. *et al.* Genetic polymorphisms in DNA repair and damage response genes and late normal tissue complications of radiotherapy for breast cancer. *British Journal of Cancer*. **100**, 1680–6 (2009).
45. Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R. G., Bartek, J. & Lukas, J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*. **410**, 842–7 (2001).
46. Eriksson, D. & Stigbrand, T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biology*. **31**, 363–72 (2010).
47. Azevedo, C. *Biologia Celular e Molecular*. (Lidel, 2005).
48. Qiu, H., Sirivongs, P., Rothenberger, M., Rothenberger, D. a & Garcíá-Aguilar, J. Molecular prognostic factors in rectal cancer treated by radiation and surgery. *Diseases of the Colon & Rectum*. **43**, 451–9 (2000).
49. Smith, F. M. *et al.* COX-2 overexpression in pretreatment biopsies predicts response of rectal cancers to neoadjuvant radiochemotherapy. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics*. **64**, 466–72 (2006).
50. Shin, H. K. *et al.* Combination effect of cetuximab with radiation in colorectal cancer cells. *Tumori*. **96**, 713–20 (2010).
51. Milas, L., Fan, Z., Andratschke, N. H. & Ang, K. K. Epidermal growth factor receptor and tumor response to radiation: in vivo preclinical studies. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics*. **58**, 966–71 (2004).
52. De Heer, P. *et al.* Cyclooxygenase 2 expression in rectal cancer is of prognostic significance in patients receiving preoperative radiotherapy. *Clinical Cancer Research*. **13**, 2955–60 (2007).
53. Tannapfel, A. *et al.* Apoptosis, Proliferation, Bax, Bcl-2 and P53 status prior to and after preoperative radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics*. **41**, 585–591 (1998).
54. ATCC®. CELL LINES. http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=pt (2012).

55. Noguchi, P. *et al.* Characterization of the WIDR: a human colon carcinoma cell line. *In Vitro*. **15**, 401–408 (1979).
56. Santos, R. Efeitos da Radiação em Carcinoma do Pulmão. Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra. (2012).
57. Buch, K. *et al.* Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - A comparative study. *Radiation Oncology*. **7**, 1 (2012).
58. Shelton, J. W. *et al.* In vitro and in vivo enhancement of chemoradiation using the oral PARP inhibitor ABT-888 in colorectal cancer cells. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*. **86**, 469–76 (2013).
59. Khalaj, A. *et al.* Synthesis, in vitro cytotoxicity and radiosensitizing activity of novel 3-[(2,4-dinitrophenylamino)alkyl] derivatives of 5-fluorouracil. *Chemical Biology & Drug Design*. **83**, 183–90 (2014).
60. Abdi, K., Khalaj, A., Ostad, S.-N. & Khoshayand, M. R. Cytotoxicity and radiosensitising activity of synthesized dinitrophenyl derivatives of 5-fluorouracil. *Daru*. **20**, 3 (2012).
61. Tice, R. R. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **35**, 206–21 (2000).
62. Greve, B., Kelsch, R., Spaniol, K., Eich, H. T. & Götte, M. Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. *Cytometry Part A*. **81**, 284–93 (2012).
63. Tuchin, V. V., Tárnok, A. & Zharov, V. P. In Vivo Flow Cytometry: A Horizon of Opportunities. *NIH Public Access*. **79**, 737–745 (2013).
64. Life Technologies. Flow Cytometry 101: Fluorescence Tutorials. <http://www.lifetechnologies.com/pt/en/home/support/tutorials.html> (2013).
65. Jaye, D. L., Bray, R. a, Gebel, H. M., Harris, W. a C. & Waller, E. K. Translational applications of flow cytometry in clinical practice. *The Journal of Immunology*. **188**, 4715–9 (2012).

66. Kentrou, N. a *et al.* An improved flow cytometric assay for detection and discrimination between malignant cells and atypical mesothelial cells, in serous cavity effusions. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. **80**, 324–34 (2011).
67. Preffer, F. & Dombkowski, D. Advances in Complex Multiparameter Flow Cytometry Technology: Applications in Stem Cell Research. *NIH Public Access* **76**, 295–314 (2010).
68. Wlodkovic, D., Telford, W., Skommer, J. & Darzynkiewicz, Z. Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death. *NIH Public Access* **103**, 55–98 (2011).
69. Circu, M. L. & Aw, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*. **48**, 749–62 (2010).
70. Brömme, H.-J., Zühlke, L., Silber, R.-E. & Simm, A. DCFH2 interactions with hydroxyl radicals and other oxidants--influence of organic solvents. *Experimental Gerontology*. **43**, 638–44 (2008).
71. Zhao, H. *et al.* Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radical Biology & Medicine*. **34**, 1359–1368 (2003).
72. Hedley, D. W. & Chow, S. Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry. *Cytometry* **15**, 349–58 (1994).
73. Castedo, M. *et al.* Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *Journal of Immunological Methods*. **265**, 39–47 (2002).
74. Chuthapisith, S., Layfield, R., Kerr, I. D., Hughes, C. & Eremin, O. Proteomic profiling of MCF-7 breast cancer cells with chemoresistance to different types of anti-cancer drugs. *International Journal of Oncology*. **30**, 1545–51 (2007).
75. Carrette, O., Burkhard, P. R., Sanchez, J. & Hochstrasser, D. F. State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis : a key tool of proteomics research. *Nature*. (2007).

76. Kupcova Skalnikova, H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie* **95**, 2196–211 (2013).
77. Liu, C.-Y. *et al.* Etoposide sensitizes CT26 colorectal adenocarcinoma to radiation therapy in BALB/c mice. *World Journal of Gastroenterology*. **11**, 4895–8 (2005).
78. Bischoff, P., Altmeyer, A. & Dumont, F. Radiosensitising agents for the radiotherapy of cancer: advances in traditional and hypoxia targeted radiosensitisers. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. **19**, 643–62 (2009).
79. Urick, M. E. *et al.* Enhancement of 5-fluorouracil-induced in vitro and in vivo radiosensitization with MEK inhibition. *Clinical Cancer Research*. **17**, 5038–47 (2011).
80. Kleiman, L. B., Krebs, A. M., Kim, S. Y., Hong, T. S. & Haigis, K. M. Comparative analysis of radiosensitizers for K-RAS mutant rectal cancers. *PLoS One*. **8**, e82982 (2013).
81. Yao, M. *et al.* Effects of Nonselective Cyclooxygenase Inhibition with Low-Dose Ibuprofen on Tumor Growth, Angiogenesis, Metastasis, and Survival in a Mouse Model of Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. (2005).
82. Seierstad, T., Røe, K. & Olsen, D. R. Noninvasive monitoring of radiation-induced treatment response using proton magnetic resonance spectroscopy and diffusion-weighted magnetic resonance imaging in a colorectal tumor model. *Radiotherapy and Oncology*. **85**, 187–94 (2007).
83. Seeliger, H. *et al.* Blockage of 2-Deoxy-d-Ribose-Induced Angiogenesis with Rapamycin Counteracts a Thymidine Phosphorylase-Based Escape Mechanism Available for Colon Cancer under 5-Fluorouracil Therapy. *Clinical Cancer Research*. (2004).
84. Moshkovskii, S., Paulus, A., Melnik, S. & Sycheva, A. Comparative Proteomics of Umbilical Cord and Maternal Plasma. *BIORAD*. 0–3 (2009).
85. Bancroft, J. D. & Gamble, M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. (Churchill Livingstone, 2008).

86. Kim, J. J. & Tannock, I. F. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nature Reviews Cancer*. **5**, 516–25 (2005).
87. Nishioka, T. *et al.* Radiation-induced Cancer Cell Repopulation : A Possible Mechanism Implied by Experiments Using Transplantable Mouse-derived Sarcoma Cell Line. *Cell Structure and Function*. **20**, 13–20 (2011).
88. Zwicker, F. *et al.* Dichloroacetate induces tumor-specific radiosensitivity in vitro but attenuates radiation-induced tumor growth delay in vivo. *Strahlenther. Onkologie*. **189**, 684–92 (2013).
89. Surova, O. & Zhivotovsky, B. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene* **32**, 3789–97 (2013).
90. Ilyas, M., Straub, J., Tomlinson, I. P. & Bodmer, W. F. Genetic pathways in colorectal and other cancers. *European Journal of Cancer*. **35**, 1986–2002 (1999).
91. Kiang, J. G., Garrison, B. R. & Gorbunov, N. V. Radiation Combined Injury: DNA Damage, Apoptosis, and Autophagy. *Adaptive Medicine*. **2**, 1–10 (2010).
92. Kwak, S.-Y. *et al.* β,β -Dimethylacrylshikonin sensitizes human colon cancer cells to ionizing radiation through the upregulation of reactive oxygen species. *Oncology Letters*. **7**, 1812–1818 (2014).
93. Marusyk, A. *et al.* Irradiation alters selection for oncogenic mutations in hematopoietic progenitors. NIH Public Access. **69**, 7262–7269 (2010).
94. Li, D. *et al.* Mitigating the Effects of Xuebijing Injection on Hematopoietic Cell Injury Induced by Total Body Irradiation with γ rays by Decreasing Reactive Oxygen Species Levels. *International Journal of Molecular Sciences*. **15**, 10541–53 (2014).
95. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*. **5**, 9–19 (2012).
96. Sosa, V. *et al.* Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Research Reviews*. **12**, 376–90 (2013).

97. Barrera, G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *International Scholarly Research Network*. **2012**, 137289 (2012).
98. Rupnow, B. a & Knox, S. J. The role of radiation-induced apoptosis as a determinant of tumor responses to radiation therapy. *Apoptosis*. **4**, 115–43 (1999).
99. Kazuno, H. *et al.* Mechanism of action of a new antitumor ribonucleoside, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd, TAS-106), differs from that of 5-fluorouracil. *Oncology Reports*. **17**, 1453–60 (2007).
100. Wilt, C. L. Van Der, Pinedo, H. M., Smid, K. & Peters, G. J. Elevation of Thymidylate Synthase following 5-Fluorouracil Treatment Is Prevented by the Addition of Leucovorin in Murine Colon Tumors. *Cancer Research*. 4922–4928 (1992).
101. Smith, L., Lind, M. J., Drew, P. J. & Cawkwell, L. The putative roles of the ubiquitin/proteasome pathway in resistance to anticancer therapy. *European Journal of Cancer*. **43**, 2330–8 (2007).
102. Cheng, Y.-L., Zhang, G.-Y., Li, C. & Lin, J. Screening for novel protein targets of indomethacin in HCT116 human colon cancer cells using proteomics. *Oncology Letters*. **6**, 1222–1228 (2013).
103. Lemoigne, Y. & Caner, A. *Radiation Protection in Medical Physics NATO Science for Peace and Security Series B: Physics and Biophysics 1*. (Springer, 2011).
104. Beyzadeoglu, M., Ozyigit, G. & Ebruli, C. *Basic Radiation Oncology*. **38**, 2822 (Springer, 2010).

8. Anexos

8.1 Anexo I

Dose Exposição

A dose exposição corresponde ao número de pares de iões produzidos pelos fótons no ar à temperatura de 0°C e é medida em C/kg no Sistema Internacional. A unidade antiga é o roentgen (R; $R = 2,58 \times 10^{-4} C/kg$)^{103,104}.

Dose Absorvida

A dose absorvida (D) corresponde à quantidade energia que é depositada (E) por unidade de massa de um dado material (m)^{103,104}. A sua fórmula é $D = \frac{E_{absorvida}}{m}$ e é medida em Gray (Gy) no Sistema Internacional, que corresponde à energia absorvida em Joule (J) por quilograma de material irradiado ($1 Gy = \frac{1J}{kg}$). A sua unidade antiga é o rad ($1 Gy = 100 rad$)^{103,104}.

Dose Equivalente

A dose equivalente (H) corresponde à dose média absorvida (D) num tecido ou órgão, ponderada em função do tipo de radiação e é medida em Sievert (Sv) no Sistema Internacional^{103,104}. É calculada através do produto da dose de radiação absorvida por um fator de ponderação, dependente do tipo de radiação aplicado (W_R), segundo a fórmula $H = D \times W_R$. Este produto surge pelo facto de diferentes tipos de radiação causarem diferentes danos nos tecidos.

Dose Efetiva

A dose efetiva corresponde à soma das doses equivalentes nos órgãos e tecidos expostos a radiação, em função do fator de correção para o tecido irradiado (W_T), medida em Sv^{103,104}. A sua fórmula é $E = \sum H_T \times W_T$.