

Simone Stephanie Fortes da Graça

**Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na
expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do
colo do útero**



Universidade do Algarve

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2019

Simone Stephanie Fortes da Graça

**Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na
expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do
colo do útero**

Mestrado em Oncobiologia–

Mecanismos Moleculares do Cancro

Trabalho efetuado sob a supervisão de:

Professora Doutora Maria Filomena Botelho

Professora Doutora Bibiana Ferreira



Universidade do Algarve

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2019

**Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina
no cancro do colo do útero.**

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída. _____

Simone Graça

Copyright Simone Stephanie Fortes da Graça

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

“If you can't fly then run, if you can't run then walk, if you can't walk then crawl, but whatever you do you have to keep moving forward.”

Martin Luther King Jr.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que me ajudaram a concluir mais esta etapa. Sem a vossa ajuda nada disto seria possível.

À professora Doutora Maria Filomena Botelho (Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra), orientadora desta dissertação, pela oportunidade de trabalhar no seu grupo (Biofísica), pela partilha de conhecimentos científicos e pela disponibilidade.

À professora Doutora Bibiana Ferreira (Centro de Investigação Biomédica, Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina, Universidade do Algarve), co-orientadora desta dissertação, pela confiança, pelo apoio e pela partilha de conhecimentos científicos.

À Doutora Salomé Pires (Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra), pelo apoio durante esta dissertação, pela partilha de conhecimentos científicos, por estar sempre disposta a ajudar e pelo carinho em todos os momentos.

Ao Doutor Paulo Matafome e ao mestre Tiago Rodrigues (Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra), pela ajuda na realização do ensaio *western blot* e por me receberem de braços abertos no vosso grupo (Fisiologia).

À Doutora Ana Cristina Gonçalves (Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra), pela ajuda na realização da citometria de fluxo.

Ao Serviço Farmacêutico do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra por ceder o fármaco utilizado durante este trabalho.

Ao Serviço de Radiologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, pela simpatia e pela cedência do espaço e equipamento utilizado nesta dissertação.

Aos mestres Ricardo Teixeira, Rita Neves, Inês Marques e Beatriz Serambeque, pela ajuda incansável na realização das tarefas, análise de resultados mesmo implicando um acréscimo de trabalho, pela simpatia, pelas críticas que me ajudaram a crescer durante este tempo. Muito obrigada!!

Às licenciadas Catarina Ferreira, Isabel Meireles, Rosana Martins e à mestre Catarina Guilherme pela boa disposição, pela companhia, por partilharem momentos de estresse, pelo incentivo e por todas as vezes em que soubemos ver o lado bom no meio as adversidades.

Às Doutoradas Ericka Costa e Leisa Aguiar (Universidade de Campinas, Brasil) pela ajuda na realização deste trabalho, orientação, partilha de conhecimentos e pelas críticas construtivas. Um especial agradecimento à Ericka, pela companhia incansável, pela amizade, pelos momentos de alegria e de choros vividos durante este percurso. De todo o meu coração desejo que esta amizade prevaleça além-fronteiras.

Ao Paulo Teixeira, pela disponibilidade, pensamento positivo e pela ajuda na imunocitoquímica.

Ao mestre André Salvada, pela ajuda, disponibilidade, pensamento positivo e pelos conhecimentos partilhados ao longo deste trabalho.

À Adriana Duarte, pela companhia na realização deste trabalho. Foram muitos os momentos bons partilhados até aqui, mas como todo o caminho, nenhuma conquista se faz sem obstáculos. Muito obrigada pelo apoio, espírito de equipa e principalmente pela amizade.

Ao turno 3, meus colegas de mestrado, Juliana Machado, Rute Salvador, Cátia Neto, André Mestre pela amizade, por me fazerem sentir em casa em um ambiente que para mim era completamente estranho, pelas palavras de apoio, pelos abraços nos momentos em que a saudade de casa apertava, por todos os bons e maus momentos partilhados ao longo do nosso percurso académico. Levo-vos pra vida!

Aos Doutores Fernando Mendes e António Gabriel, pela oportunidade, por cada palavra de apoio e por sempre terem acreditado em mim.

Aos meus grandes professores, Benízia Timas, Carlos Sanches e Gilson Lopes, por todos os conhecimentos que me serviram como base para chegar até aqui e por todo o carinho.

À Rosana Brandão, Irina Rocha e Christy Rocha por se fazerem presentes nos momentos mais difíceis e importantes da minha vida cá em Coimbra. Pelo acolhimento, pelo carinho, pelos conselhos, pelas pequenas brigas e pela amizade que até hoje mantemos mesmo estando longe.

Às minhas colegas de casa, Larissa Costa, Andrea Delgado e Benvinda Lima, só nós sabemos o quão difícil é estar longe de casa e dos nossos em busca dos nossos sonhos. Sabemos melhor ainda quão boa é a sensação de conseguir adaptar, criar raízes e construir amizades que temos orgulho de chamar de família. Vocês agora também fazem parte da minha! Sem a vossa boa disposição, companheirismo, amizade, brincadeiras, seria sem dúvida mais difícil e doloroso. Um sincero e profundo especial obrigada à Benny, não só pela ajuda nesta dissertação, mas também por se fazer sempre presente. “Agora vai!!”

À Elna Fernandes, Sara Santos, Cristy Medina, Ava Cardoso, Luis Andrade, Marco Monteiro e Zé Maocha pela amizade de longa data e por todas as histórias vividas até aqui.

À tia Andreza, tia Leninha, muito obrigada por todo o carinho e por vibrarem comigo em todas as conquistas.

À minha prima Vitália, por ter sido a minha companheira de toda a vida e por partilhar todos os momentos comigo.

Aos meus irmãos, Êzio Graça e Cleuder Graça pela proteção, por todo o amor, carinho e pelos momentos em que também fizeram o papel de “pai” na minha vida. À Sheila, por me fazer sentir que ser irmã é muito mais do que partilhar o mesmo sangue ou os mesmos pais.

Aos meus pais, a quem dedico todo o meu percurso. Palavras sempre serão insuficientes para expressar a tamanha gratidão e amor que tenho por vós. Muito obrigada, por todo o sacrifício, pelo carinho, pelos valores transmitidos e amor. Esta luta também é vossa. Amo-vos.

Ao saudoso poeta Eugénio Tavares, hoje mais do que nunca compreendo o sentido da frase: “Si ka badu ka ta biradu”.

A Deus, por tudo.

Resumo

O cancro do colo do útero é o quarto cancro mais comum a nível mundial. A quimioterapia e a radioterapia aplicada estão associadas a uma notável toxicidade e resistência. Postula-se que as células estaminais do cancro, assim como as vias associadas à sua manutenção, proliferação sejam responsáveis por estes mecanismos de resistência. O CD133 e a via Wnt/ β -catenina estão associadas em alguns estudos a esta resistência.

Esta dissertação teve como objetivo avaliar a expressão da CD133, Wnt, β -catenina, LRP6, pLRP6, Naked1 e Axin1 após a exposição à radiação-X e o tratamento com a cisplatina tentando perceber se estas proteínas poderão ser utilizadas como alvo direto no tratamento, minimizando a toxicidade. Após determinar a concentração inibitória (IC_{50}) média e a dose letal média (DL_{50}) utilizaram-se concentrações e doses superiores, iguais e inferiores a estes valores, isto é, concentrações correspondentes à IC_{80} , à IC_{50} e à IC_{20} e doses de 10 Gy, de DL_{50} e de 2 Gy. Avaliou-se a morte celular, o ciclo celular, a produção de espécies reativas de oxigénio, a glutatona reduzida e a expressão das proteínas (CD133, Wnt, β -catenina, LRP6, pLRP6, Naked1 e Axin1).

Após o tratamento com a cisplatina observou-se aumento da expressão da pLRP6 e diminuição da expressão da Naked1 e da Axin1 com o aumento da concentração do fármaco, o que poderá levar a localização nuclear da β -catenina e induzir a transcrição de genes responsáveis pela sobrevivência e pela proliferação das células tumorais. A exposição a diferentes doses de radioterapia permitiu-nos observar que o aumento da expressão da β -catenina está associada a uma menor morte celular e que a menor expressão da CD133 está associada a uma maior morte celular. Estes resultados sugerem que estas proteínas são importantes na resposta ao tratamento e que minimizar a toxicidade será possível em doentes com esta neoplasia.

Palavras chaves: Cancro do colo do útero, células estaminais do cancro, cisplatina, radioterapia, CD133, Wnt/ β -catenina.

Abstract

Cervical cancer is the fourth most common cancer worldwide. Its incidence and mortality vary according to the country's development index being more common in developing countries. Conventional treatments (chemotherapy and radiotherapy) are associated with high toxicity and resistance. It is postulated that the cancer stem cells as well the pathways responsible for their maintenance and proliferation are involved in these resistance mechanisms. CD133 and the pathway Wnt/ β -catenin are associated with these resistances in some studies.

The objective of these thesis was to analyse the expression of Wnt, β -catenin, LRP6, pLRP6, Naked1 and Axin1 after cisplatin and radiotherapy exposure in the attempt to understand, if these proteins could be used as therapy targets in this cancer type. After determining the mean inhibitory concentration (IC_{50}) and the median lethal dose (LD50), concentrations and doses above and below these values were used, namely, concentrations corresponding to IC_{80} , IC_{50} and IC_{20} and doses of 10 Gy, LD50 and 2 Gy. We analysed cell death, cell cycle, reactive oxygen species, reduced glutathione and the expression levels of CD133, Wnt, β -catenina, LRP6, pLRP6, Naked1 and Axin1.

After the treatment with cisplatin, we observed an increase in pLRP6 and a decrease in Naked1 and Axin1 expression, which can lead to nuclear localization of β -catenin and transcription of target genes. After radiotherapy we observed that increased β -catenin expression could be associated with low cellular death. On the other hand, low CD133 expression could be associated with increased cell death. These results suggest that these proteins are important in response to treatment and that minimizing toxicity will be possible in patients with this neoplasia.

Keywords: Cervical cancer, cancer stem cells, cisplatin, radiotherapy, CD133, Wnt/ β -catenin.

Índice

Agradecimentos.....	vi
Resumo.....	viii
Abstract	x
Índice de figuras	xiv
Índice de tabelas	xvi
Lista de Siglas e Abreviaturas	xvii
1-Introdução	1
1.1-Epidemiologia do cancro do colo do útero.....	1
1.2-Cancro do colo do útero	5
1.2.1- Papiloma vírus humano	6
1.2.2-Prevenção e rastreio.....	9
1.2.3-Tratamento.....	10
1.3-Cisplatina.....	11
1.3.1-Toxicidade	12
1.3.2-Resposta celular à cisplatina.....	14
1.4-Radioterapia	15
1.4.1-Radioterapia e morte celular	19
1.4.2-Radioterapia e cancro do colo do útero	20
1.5-Células estaminais do cancro	21
1.6-Hipótese.....	27
1.7-Objetivos	27
2-Materiais e métodos	28
2.1-Cultura celular	28
2.2-Ensaio de sobrevivência, proliferação e viabilidade celular.....	29
2.2.1- Determinação das concentrações inibitórias de cisplatina	29
2.2-Avaliação dos efeitos da terapêutica com raios-X.....	30
2.3-Avaliação dos efeitos da quimioterapia e da radioterapia na linha celular HeLa	33
2.3.1-Avaliação da viabilidade celular e do tipo de morte	34
2.3.2-Avaliação do ciclo celular	36
2.3.3-Avaliação das espécies reativas de oxigénio e defesas antioxidantes	36
2.3.4- Determinação da expressão das proteínas	38
2.4-Análise estatística	42
3-Resultados	42
3.1-Efeitos da cisplatina na linha celular HeLa	43

3.1.1-Proliferação celular.....	43
3.1.2- Viabilidade e morte celulares	44
3.1.3-Ciclo celular.....	46
3.1.4- Stresse oxidativo e espécies reativas de oxigénio	47
3.1.5-Avaliação da expressão das proteínas (CD133, Wnt, β -catenina, LRP6, pLRP6, Naked1 e Axin1) após a exposição à cisplatina.....	51
3.2-Efeitos da radiação ionizante na linha celular HeLa	59
3.2.1-Sobrevivência celular	59
3.2.2- Viabilidade e morte celular.....	60
3.2.3- Stresse oxidativo e espécies reativas de oxigénio	62
3.2.4-Avaliação da expressão das proteínas (CD133, Wnt, β -catenina, LRP6, pLRP6, Naked1 e Axin1) após a exposição à cisplatina.....	64
4-Discussão	71
5-Conclusão.....	85
6- Perspetivas futuras	87
7-Referências bibliográficas.....	88
8- Anexos	101
Anexo I.....	101

Índice de figuras

Figura 1. 1: Estimativa de novos casos e morte por sexo em países em desenvolvimento.....	2
Figura 1. 2: Incidência e mortalidade mundial do cancro do colo do útero.	3
Figura 1. 3: Taxa de mortalidade provocada pelo cancro do colo do útero por cada 100 000 habitantes em diferentes regiões de Portugal..	5
Figura 1. 4: : Evolução da infeção nas células do epitélio escamoso provocada pelo papiloma vírus humano (HPV).	8
Figura 1. 5: Efeito cancerígeno do HPV.	9
Figura 1. 6: Biotransformação da cisplatina.....	12
Figura 1. 7: Marcadores e vias de sinalização envolvidos na resistência à terapêutica das <i>cancer stem cells</i>	23
Figura 1. 8: Via de sinalização Wnt/ β -catenina.	25
Figura 2. 1: Caixa da irradiação construída em acrílico.).....	31
Figura 2. 2: Distribuição da dose na caixa de irradiação..	31
Figura 3. 1: Cisplatina diminui a proliferação celular na linha HeLa com o aumento da concentração e tempo de tratamento.	43
Figura 3. 2: Aumento da concentração de cisplatina diminui a viabilidade celular na linha HeLa..	45
Figura 3. 3: A cisplatina induz o aparecimento de características morfológicas de necrose com o aumento da concentração na linha HeLa.....	46
Figura 3. 4: Cisplatina induz a progressão no ciclo celular da linha HeLa.....	47
Figura 3. 5: Cisplatina induz o aumento da produção intracelular de superóxidos com o aumento da concentração.	48
Figura 3. 6: Cisplatina induz a alteração da produção intracelular de peróxidos.	49
Figura 3. 7: Cisplatina induz o aumento da produção intracelular do glutathione reduzida com aumento da concentração.	50
Figura 3. 8: Aumento da proliferação celular na linha HeLa após o tratamento com cisplatina e manitol (40mM).....	51
Figura 3. 9: Cisplatina induz a alteração da expressão da CD133 (117 kDa) na linha celular HeLa, 48 horas após o tratamento.	52
Figura 3. 10: Cisplatina altera a expressão da Wnt na linha celular HeLa.	53
Figura 3. 11: Cisplatina induz a alteração da expressão da β -catenina (92 kDa) na linha celular HeLa, 48 horas após o tratamento.	54
Figura 3. 12: A Cisplatina induz a diminuição da expressão da LRP6 (180,210 kDa) na linha celular HeLa, 48 horas após o tratamento.	55
Figura 3. 13: Cisplatina induz o aumento da expressão da pLRP6 (180,210 kDa) na linha celular HeLa, 48 horas após o tratamento.	56
Figura 3. 14: Cisplatina induz a diminuição da expressão da Naked1 (59,61kDa) na linha celular HeLa, 48 horas após o tratamento.	57
Figura 3. 15: Cisplatina induz a diminuição da expressão da Axin1 (110 kDa) na linha celular HeLa, 48 horas após o tratamento.	58
Figura 3. 16: Exposição à radiação-X diminui a sobrevivência da linha celular HeLa com o aumento da dose.	59
Figura 3. 17: Radioterapia diminui a viabilidade celular da linha HeLa, 48 horas após a exposição.....	61

Figura 3. 18: Radioterapia induz o predomínio de características morfológicas de necrose com o aumento da dose.	62
Figura 3. 19: Radioterapia aumenta a produção intracelular de radicais superóxidos na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição.	63
Figura 3. 20: Radioterapia aumenta a produção intracelular de peróxidos na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição..	63
Figura 3. 21: Radioterapia altera a produção intracelular de glutatona reduzida na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição.	64
Figura 3. 22: Radioterapia altera a expressão da CD133 (117 kDa) na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição..	65
Figura 3. 23: Radioterapia induz o aumento da expressão da Wnt nas células HeLa com o aumento da dose.	66
Figura 3. 24: Radioterapia altera a expressão da β -catenina na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição.....	67
Figura 3. 25: Radioterapia diminui a expressão da LRP6 na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição.	68
Figura 3. 26: Radioterapia altera a expressão da pLRP6 (180,210 kDa) na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição.	69
Figura 3. 27: Radioterapia diminui a expressão da Naked1 na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição à radioterapia.	69
Figura 3. 28: Radioterapia altera a expressão da Axin1 na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição à radioterapia.	70

Índice de tabelas

Tabela 1. 1: Mortalidade provocada pelo cancro do colo do útero de 2010 a 2015 em Portugal. Adaptado de: Programa Nacional para as Doenças Oncológicas. Direção Geral da Saúde. 2017 (15). . 4	
Tabela 2. 1: Doses administradas em unidades de monitor (UM, do inglês <i>monitor units</i> , 1 MU=0,022 Gy), com a <i>gantry</i> posicionada a 270° e a 90°	30
Tabela 2. 2: Número de células por cada condição.	32
Tabela 2. 3: Anticorpos primários e condições utilizadas no protocolo.	39
Tabela 3. 1: Determinação dos valores IC ₂₀ , IC ₅₀ e IC ₈₀ para os diferentes tempos de exposição à cisplatina e respetivos valores de R ²	44
Tabela 3. 2: Determinação do IC ₅₀ na linha HeLa 48 horas após o tratamento com cisplatina e com cisplatina associada a manitol (40 mM) e respetivos valores de R ²	51
Tabela 3. 3: Resultados obtidos com recurso ao modelo linear quadrático para α , β , α/β , DL ₅₀ e o fator de sobrevivência com a dose de a 2Gy (Fs(2)) e respetivo R ² associado.	59

Lista de Siglas e Abreviaturas

A

ABC: *ATP binding cassette*

ALDH: aldeído desidrogenase

AI: apoptose inicial

A.M.Lisboa: Área Metropolitana de Lisboa

AT/N: apoptose tardia/necrose

APC: *adenomatous polyposis coli*

B

BAK: *Bcl-2 agonist killer*

BAX: *Bcl-2 associated protein*

Bcl-2: *B- cell lymphoma 2*

BSA: *bovine serum albumin*

C

CHUC: Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

CK1 α : caseína quinase 1 α

Cl⁻: iões cloreto

CSCs: cancer stem cells

CTL: controlo

D

DCF: diclorofluoresceína

DCFH: diclorodihidrofluoresceína

DSB: double- strand break

DCFH2-DA: 2',7'-

diclorodihidrofluoresceínadiacetato

DHE: dihidroetidina

DL₅₀: dose letal média

DMEM: *dulbecco`s modified eagle médium*

DMSO: dimetilsulfóxido

Dvl: *Dishevelled*

E

E: *early protein*

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EpCAM/ ESA: molécula de adesão de células epiteliais / antígeno específico epitelial

ERO: espécies reativas de oxigénio

E2F: *E2 transcription factor*

E6-AP: *E6 associated protein*

F

FBS: *Fetal Bovine Serum*

FDA: *Food and Drug administration*

FIGO: inglês *International Federation of Gynecology and Obstetrics*

FITC: *fluorocromo isotiocianato de fluoresceína*

Fs: fator de sobrevivência

FZD: *frizzled*

G

GDP: guanosina difosfato

GLUT: *glucose transporter*

GPx: GSH peroxidase

GSH: glutationa reduzida

GSK: glicogénio sintase

GSK3 β : glicogénio sintase quinase 3 β

GSSG: dissulfeto de glutationa

GTP: guanosina trifosfato

H

HDAC6: histona desacetilase 6
HIF: *Hypoxia-Inducible Factor*
HIV: *Human Immunodeficiency Virus*
HPV: *human papiloma virus*
HSIL: Lesão intraepitelial de alto grau
H₂O₂: peróxido de hidrogénio

I

IBM SPSS: *Statistical Package for Social Sciences*
IC: *inhibitory concentration*

J

K

L

L-late protein
LET: *linear energy transfer*
LQ: linear quadrático
LRP: *Low density lipoprotein receptor-related protein*
LSIL: *Lesão intraepitelial de baixo grau*

M

M: metástases à distância
MIF: media de intensidade de fluorescência
mTOR: *mammalian target of rapamycin*
MTT: *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
Mrps -*multidrug resistance proteins*

N

N: envolvimento dos gânglios linfáticos

NANOG: *homeobox protein NANOG*

N: necrose

NOX3: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 3*

O

OCT: *organic cation transporter*
OCT4: *octamer-binding transcription factor 4*

OH•: radical hidroxilo

OMS: Organização Mundial de Saúde

O₂ •-: anião superóxido

P

PCP: *Planar Cell Polarity pathway*
PCR: *polymerase chain reaction*
PE: *plate efficiency*
PET: *positron emission tomography*
PI3K: *Phosphatidylinositol 3-kinases*
PKC: *protein kinase C*
PLCβ: *phospholipase C-β*
P16: proteína 16
P53: proteína p53
pRB: proteína retinoblastoma

PVDF: *polyvinylidene fluoride*

Q

R

RAC: *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*

R.A. Açores: Região autónoma dos Açores

R.A.Madeira: Região Autónoma da Madeira.

Rho: *Ras homolog gene family member*

RTK: receptor tirosina quinase

S

SDS: sodium dodecyl sulfate

SF: *surviving factor*

SNP: sistema nervoso periférico

SOD: superóxido dismutase

SSB: *single strand break*

SRB: sulforodamina B

T

T: extensão do tumor primário

TCF/LEF: T-cell factor/lymphoid enhancer factor

TEMED: tetrametiletilenodiamina

TUNEL: *deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*

U

UM: monitor units

V

V: células viáveis

VIA: *visual inspection with acetic acid*

X**Y****Z**

γ -GT: gama-glutamyltranspeptidase

2vHPV: vacina bivalente contra o HPV

4vHPV: vacina quadrivalente contra o HPV

9vHPV: vacina nonavalente contra o HPV

1-Introdução

1.1-Epidemiologia do cancro do colo do útero

O cancro é um dos maiores problemas de saúde mundial e, de acordo com a organização mundial de saúde (OMS), é uma das causas responsáveis pelo elevado número de mortes (1,2). O aumento crescente da sua incidência deve-se não só ao aumento da esperança média de vida à nascença mas também está associado a alguns fatores de risco como o tabagismo, o sedentarismo, a obesidade e o estilo de vida, nomeadamente os maus hábitos alimentares (1–3). Em 2018 estimou-se, 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes. Em relação ao cancro do colo do útero prevê-se, para 2025, 20 milhões de novos casos (3,4). De acordo com os dados de 2014 da OMS, em Portugal, os cancros mais comuns em mulheres são o cancro da mama, colorretal, corpo uterino, estômago e pulmão enquanto que nos homens os mais comuns são o cancro da próstata, colorretal, pulmão, bexiga e estômago (5).

A nível mundial o cancro do colo do útero é o quarto cancro mais comum nas mulheres. Comumente é diagnosticado na quinta década de vida. Está associado a infeção com o papiloma vírus humano (HPV, do inglês *human papillomavirus*), que usualmente é contraído por via sexual, não estando limitada a sua disseminação apenas à atividade sexual com penetração. O pico da infeção em homens e mulheres começa logo após o início da vida sexual (3,6,7). No período de um ano, a probabilidade de um indivíduo de género masculino ou feminino, sexualmente ativo, adquirir uma nova infeção causada pelo HPV é de 0,29 a 0,30%. Contudo, verificam-se diferenças na resposta imunológica entre os diferentes géneros com as mulheres a mostrarem uma maior prevalência desta infeção (17,9%) quando comparada com os homens (7,9%). Esta diferença pode ser justificada pela baixa resposta imunológica nas mulheres comparativamente com a dos homens (8,9).

Em 2012 estimaram-se cerca de 528 000 novos casos e cerca de 266 000 mortes em todo o mundo, sendo que cerca de 87% destes valores ocorreram nas regiões menos desenvolvidas (10).

Para mulheres europeias, no período entre 2000 e 2007, a sobrevida relativa de cinco anos foi de 62%, com valores de 57% na Europa oriental e de 67% no norte da Europa. Porém, independentemente destes valores, a sobrevida diminui com o aumento da idade no momento do diagnóstico. Entre os 15 e os 44 anos de idade a taxa de sobrevivência é de 81% enquanto para mulheres com idade igual ou superior a 75 anos baixa para 34% (11).

A infeção genital pelo vírus do HPV é classificada epidemiologicamente, consoante a associação com o cancro do colo do útero, em infeções por HPV de baixo risco e de alto risco. As infeções de baixo risco pelo vírus do HPV (exemplo: HPV tipo 6 e tipo 11) são as que podem causar alterações benignas do colo do útero ou de baixo grau enquanto as infeções de alto risco pelo vírus do HPV (exemplo: HPV do tipo 16 e HPV do tipo 18) são as que podem causar cancro genital, anal ou oral. As infeções de alto risco pelo vírus do HPV são responsáveis por 99% dos casos de cancro do colo do útero, dos quais 75% estão associados ao HPV do tipo 16 e ao HPV do tipo 18 (12).

A incidência e mortalidade por cancro do colo do útero variam consoante os índices de desenvolvimento dos países. Em 2012, aproximadamente 270 000 mulheres foram vítimas fatais desta neoplasia, em que mais de 85% destes casos ocorreram em países de médio ou de baixo índice de desenvolvimento. Nos países em desenvolvimento esta patologia ocupa o segundo lugar no género feminino, constituindo a terceira causa de morte (Figura 1.1). A incidência é mais acentuada na África, Melanésia, América Latina e Caribe, verificando-se uma menor incidência na Ásia Ocidental, Austrália e norte da América (Figura 1.2). Esta grande diferença entre diferentes regiões geográficas deve-se a falhas na implementação de programas de rastreio em países menos desenvolvidos (3).

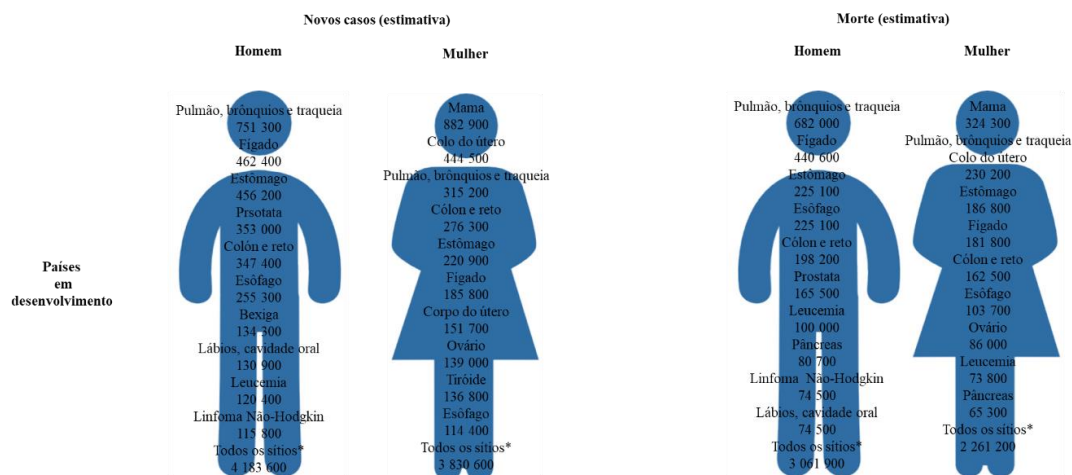


Figura 1. 1: Estimativa de novos casos e morte por sexo em países em desenvolvimento. A figura representa a relação estimada entre os novos casos e a morte associada a dez tipos de cancro em países em desenvolvimento por sexo. Nos homens, o cancro do pulmão, brônquios e traqueia está associado a uma maior ocorrência de novos casos assim como mortalidade. Nas mulheres o cancro da mama ocupa o primeiro lugar relativamente ao aparecimento de novos casos e mortalidade. O cancro do colo do útero ocupa o segundo lugar relativamente aos novos casos e o terceiro lugar quando se refere a morte. Adaptado de Torre *et al* (3).

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

Contudo, o cancro do colo do útero constitui um problema de saúde pública mesmo em países desenvolvidos. Só na Europa, mais de 58 000 casos são anualmente diagnosticados e morrem por ano aproximadamente cerca de 24 000 pessoas (13).

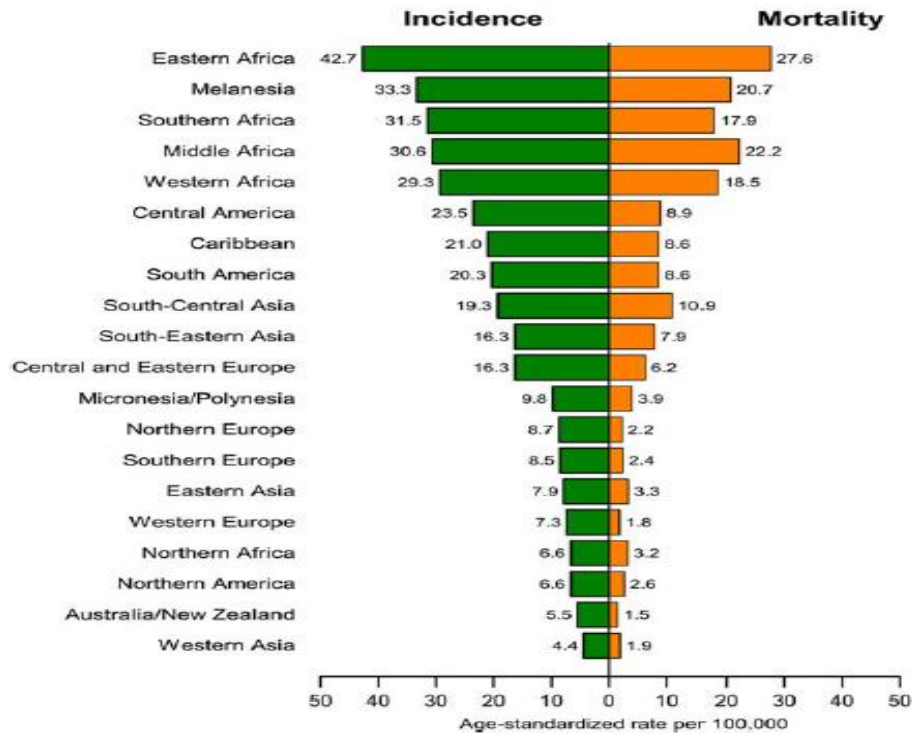


Figura 1. 2: Incidência e mortalidade mundial do cancro do colo do útero. Paralelismo entre a incidência e mortalidade do cancro do colo do útero a nível mundial. Em regiões como a África oriental e Melanésia observa-se uma elevada incidência associada a uma elevada mortalidade. Na América central apesar da elevada incidência a mortalidade é reduzida quando comparada com os países anteriormente mencionados. Na Austrália verifica-se uma baixa incidência e mortalidade. Isto pode ser devido a uma boa estratégia de rastreio e tratamento implementada nos países desenvolvidos. Adaptado de: Torre *et al* (3).

Nos Estados Unidos, 12 000 mulheres são diagnosticadas por ano com cancro do colo do útero. Em termos de saúde pública, cerca de 7% de mulheres com a idade compreendida entre os 21 e os 65 anos nunca realizaram o teste de Papanicolau (14).

Em 2010, em Portugal a taxa de incidência do cancro do colo do útero foi de 13,5% para cada 100 000 habitantes. Entre 2011 e 2015 verificou-se uma diminuição do número de óbitos (Tabela 1.1), observando-se para o mesmo período um aumento na adesão aos programas de rastreio (Figura 1.3). A mortalidade variou entre diferentes regiões de Portugal verificando-se os maiores valores na região autónoma dos Açores e na área metropolitana de Lisboa (Figura 1.4) (15,16).

Tabela 1. 1: Mortalidade provocada pelo cancro do colo do útero de 2010 a 2015 em Portugal. Adaptado de: Programa Nacional para as Doenças Oncológicas. Direção Geral da Saúde. 2017 (15).

Cancro do colo do útero					
	2011	2012	2013	2014	2015
Número de óbitos	247	214	204	210	201
Taxa de mortalidade padronizada	3,2	2,8	2,5	2,6	2,4

Taxa por 100 000 habitantes.

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

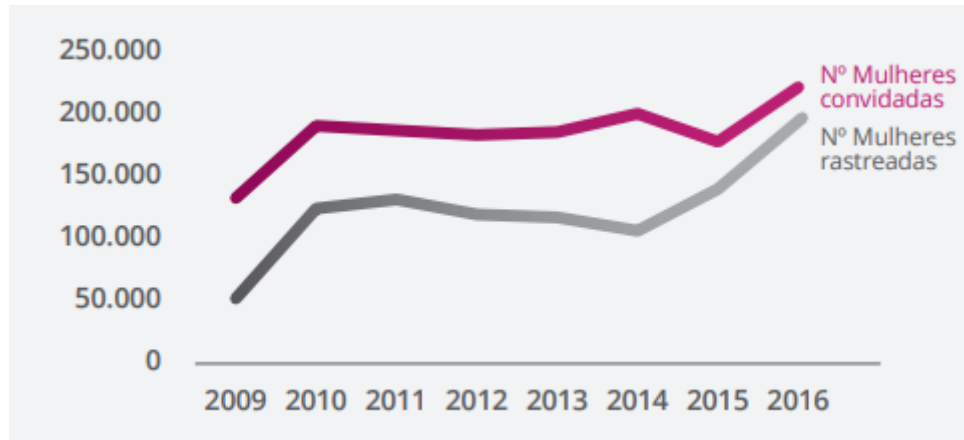


Figura 1. 3: Evolução da adesão aos programas de rastreio. Aumento da adesão ao programa de rastreio de 2009-2016. Adaptado de: Programa Nacional para as Doenças Oncológicas. Direção Geral da Saúde. 2017 (15).

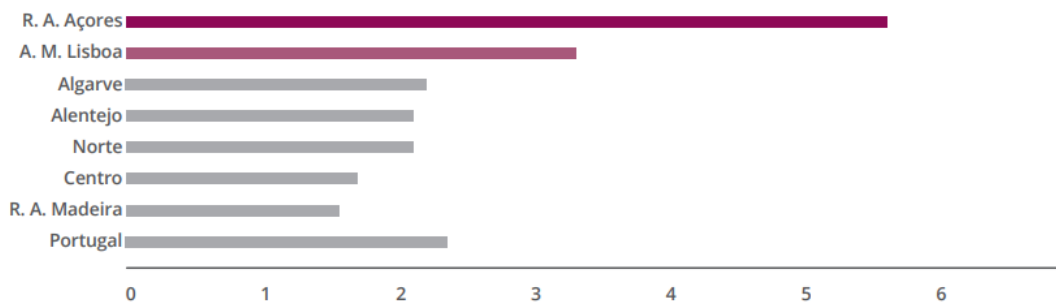


Figura 1.4: Taxa de mortalidade provocada pelo cancro do colo do útero por cada 100 000 habitantes em diferentes regiões de Portugal. Maior taxa de mortalidade na Região autónoma dos Açores (R.A. Açores) seguido da Área Metropolitana de Lisboa (A.M.Lisboa). Menor taxa de mortalidade na R.A.Madeira; R.A.Madeira: Região Autónoma da Madeira. Adaptado de: Programa Nacional para as Doenças Oncológicas. Direção Geral da Saúde. 2017 (15).

1.2-Cancro do colo do útero

De acordo com a OMS, o cancro do colo do útero pode ser dividido em três tipos: escamoso, glandular e outros (como por exemplo: carcinoma adenoescamoso e tumores neuroendócrinos). O carcinoma escamoso corresponde a 70-80% dos casos do cancro do colo do útero enquanto o adenocarcinoma corresponde a 20-25%. Normalmente, em estádios precoces o cancro do colo do útero é assintomático. Em estádios localmente avançados os sintomas podem ser hemorragia vaginal, dor pélvica e corrimento vaginal, podendo ocorrer dor após o coito (13). Os fatores de risco associados a este tumor maligno são as infeções

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

persistentes de alto risco pelo vírus HPV, grande número de parceiros sexuais, imunossupressão, co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) e hábitos tabágicos (17).

O estadiamento do tumor é realizado de acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO, do inglês *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) (anexo I) juntamente com a classificação TNM na qual T corresponde à extensão do tumor primário, N ao envolvimento dos gânglios linfáticos e M às metástases à distância. As dimensões do tumor, o envolvimento vaginal ou parametrial, a extensão para o reto ou para a bexiga e a metastização à distância são igualmente fatores importantes para o estadiamento (13).

A palpação, a colposcopia, a curetagem endocervical, a histeroscopia, a cistoscopia e a proctoscopia são exames que auxiliam no estadiamento. A radiologia, a urografia intravenosa e outros estudos de imagem como a tomografia computadorizada, a ressonância magnética e a tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *positron emission tomography*) ajudam no diagnóstico e no estadiamento do tumor. Para além disso, estes estudos de imagem ajudam a selecionar a melhor abordagem terapêutica entre a cirurgia, a quimioterapia ou a radioterapia (9,11,13). A confirmação histológica também é indispensável (11).

A análise das dimensões, da profundidade da invasão tumoral, do estágio, da invasão dos gânglios linfáticos e do tipo histológico constituem fatores importantes para o prognóstico da doença, sendo os mais importantes a invasão e o número de gânglios linfáticos envolvidos (13).

Neste tumor, os locais mais comuns de metastização à distância são os gânglios linfáticos do mediastino, o pulmão, a cavidade peritoneal e o osso (11).

A morte provocada por este cancro está relacionada com a persistência ou com a recorrência em estádios localmente avançados (18). A disseminação local provoca a obstrução uretral e dor (19). A sobrevida livre de doença aos 5 anos é de 50 a 70% para os estádios IB2 e IIB, 30–50% para o estágio III e 5–15% para o estágio IV (9).

1.2.1- Papiloma vírus humano

O papiloma vírus humano é um grupo de vírus que se apresenta com cadeia dupla de DNA e sem envelope, cujo virião tem um tamanho de aproximadamente 55 nm de diâmetro (20,21). Este vírus tem a capacidade de infetar células do epitélio escamoso, que após um trauma consegue aceder à camada basal. A sua interação com as células hospedeiras faz-se

através dos recetores de superfície como o sulfato de heparano e a alfa 6 integrina (20,21). De acordo com a análise da sequência do DNA existem mais de cem tipos deste vírus, estando cada tipo associado a infeções em diferentes epitélios (22). Cerca de um terço infetam as células epiteliais do trato genital, e provocam infeções de baixo risco ou de alto risco. As infeções de alto risco estão associadas com o desenvolvimento de cancro anogenital enquanto que as de baixo risco estão associadas a alterações benignas. Os sub-tipos de HPV associados a infeção de alto risco são o 16, o 18, o 31, o 33 e o 45 e os de baixo risco são o 6 e o 11 (17).

Geralmente esta infeção é adquirida após o contato sexual, sendo normalmente assintomática e com resolução em 90% dos casos em 2 anos após o estabelecimento da infeção. Em alguns casos pode resultar no aparecimento de verrugas ou de cancro (Figura 1.5) (6,7,23). Esta infeção correlaciona-se com o cancro do colo do útero, da vagina, da vulva, da cabeça e pescoço, do ânus e do pénis. Está associado a mais de 90% dos cancros anais e cervicais, 70% dos cancros vaginais, da vulva e da orofaringe e mais de 60% dos casos de cancro do pénis (21). A infeção persistente por este vírus está relacionada com o aparecimento do cancro do colo do útero como o carcinoma escamoso e adenocarcinoma (forma menos comum), sendo que em 99% dos casos se deteta a presença do HPV 16 e/ou do HPV 18 (13,17). O carcinoma escamoso e as suas lesões precursoras estão maioritariamente associados ao HPV 16, enquanto que o adenocarcinoma do colo do útero está etiologicamente associado ao HPV do tipo 18 (13).

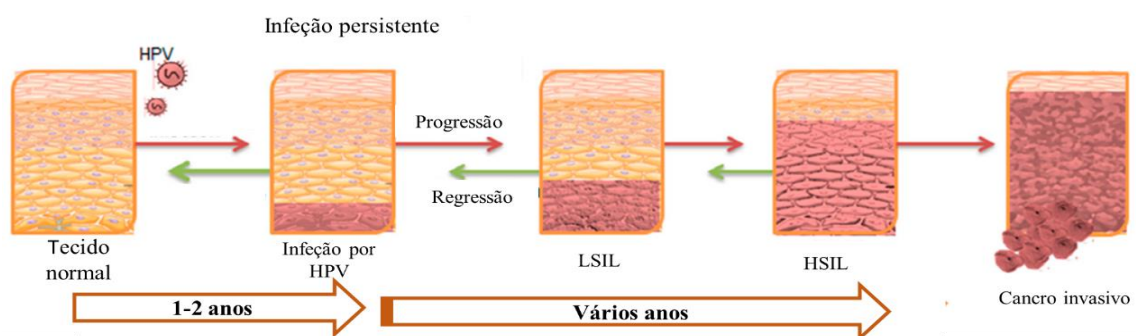


Figura 1. 5: Evolução da infeção nas células do epitélio escamoso provocada pelo papiloma vírus humano (HPV). A maioria das infeções provocadas pelo HPV são transientes e tendem a ser eliminadas pelo sistema imune até dois anos após o estabelecimento da infeção (seta verde). Quando não é eliminada, a infeção poderá levar ao estabelecimento de lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) podendo progredir para lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) ou até chegar ao carcinoma invasivo (seta vermelha). Adaptado de: Shanmugasundaram S, You J (23).

A infecção por este vírus induz a expressão de seis proteínas precoces (E, do inglês *early protein*) não estruturais regulatórias (E1, E2, E4, E5, E6, E7) e duas proteínas tardias (L, do inglês *late protein*) estruturais da cápside (L1 e L2) (20). As proteínas E1 e E2 são necessárias para a replicação e tradução viral. A proteína E2 atua como repressor da E6 e da E7 e controla a sua expressão enquanto a E4 e a E5 ajudam no crescimento viral e as proteínas L1 e L2 formam a cápside (20,21). Após a integração do vírus no genoma humano ocorre a desregulação da proteína E2 que, por sua vez, determina o aumento da expressão das proteínas E6 e E7 (21).

O efeito carcinogénico do HPV deve-se à expressão das oncoproteínas E6 e E7, que inativam os genes supressores tumorais, TP53 e RB1, o que provoca um crescimento celular exacerbado e um aumento da expressão da proteína 16 (P16) (24). As oncoproteínas virais, E6 e E7 ligam-se à proteína P53 (proteína p53) e pRB (proteína retinoblastoma) /P21 (proteína p21) respetivamente. O E6 ao ligar-se à P53 promove a sua degradação através da formação de um complexo com a P53 e a enzima de ubiquitinação E6-AP (do inglês, *E6 associated protein*) resultando na transferência da ubiquitina da E6-AP para a proteína P53. Desta forma, a P53 fica marcada para a degradação no proteossoma. Além de inibir a ação da P53, a E6 inibe também a ação da BAK/BAX (BAK, do inglês *Bcl-2 agonist killer* e BAX, do inglês *Bcl-2 associated protein*) inibindo, desta forma, a apoptose e induzindo a instabilidade cromossomal. A E7 ao se ligar a pRB e à P21 promove a transcrição de fatores importantes na progressão do ciclo celular. A ligação da E7 à proteína pRB inibe a interação entre a pRB e a E2F (do inglês, *E2 transcription factor*) o que leva à ativação de genes responsáveis pela proliferação celular. Desta forma as células malignas têm a capacidade de ultrapassar a fase G1 como se pode verificar na figura 1.6 (25–27).

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

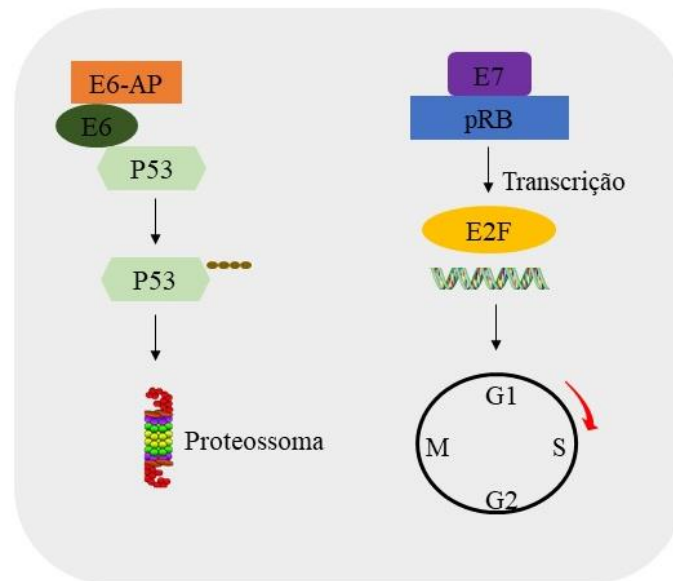


Figura 1.6: Efeito cancerígeno do HPV. A E6 (proteína precoce da região 6) promove a ligação da ubiquitina ligase E6-AP (do inglês *E6 associated protein*) que transfere ubiquitinas para a proteína p53, sendo posteriormente degradada no proteossoma. A proteína E7 (proteína precoce da região 7) ao se ligar à proteína do retinoblastoma (pRB) impede a interação do pRB com o factor de transcrição E2F (do inglês, *E2 transcription factor*). Desta forma ocorre a transcrição do E2F que irá atuar sobre genes que permitirão a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Adaptado de: Yim E and Park J (26).

1.2.2-Prevenção e rastreio

A prevenção primária, ou seja, a vacinação contra o vírus do HPV, é responsável por prevenir cerca de 70% do cancro cervical. Outra estratégia importante é o rastreio que permite identificar lesões precursoras do cancro do colo do útero (14).

Os programas de rastreio têm por objetivo detetar a doença em estádios ainda precoces, assintomáticos, em populações aparentemente saudáveis, de forma a minimizar a mortalidade (28,29). Estas estratégias são promissoras para o combate desta neoplasia porém, os programas de rastreio carecem de uma estrutura que se adeque às necessidades e recursos humanos capacitados. Por outro lado, o programa de vacinação envolve elevados custos principalmente para países em desenvolvimento (30). O sucesso ainda está dependente de um programa que promova a igualdade e a qualidade no acesso aos serviços de saúde (28).

De acordo com a OMS, os métodos de rastreio comumente utilizados são a citologia (teste de Papanicolau), o teste para o HPV, a inspeção visual com recurso ao ácido acético (VIA, do inglês *visual inspection with acetic acid*) (31).

Atualmente estão disponíveis e aprovadas três vacinas contra o HPV: a vacina

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

bivalente (2vHPV), a quadrivalente (4vHPV) e a nonavalente (9vHPV). Todas conferem proteção contra o HPV 16 e o HPV 18. A vacina quadrivalente ainda confere proteção contra o vírus do HPV tipo 11, tipo 6 e contra a proteína estrutural da cápside L1. A vacina nonavalente confere uma proteção mais alargada (HPV 16, 18, 11, 6, 31, 33, 45, 52 e 58) (8,13).

A vacina bivalente demonstrou ser eficaz contra os HPV dos tipos 16 e 18 e é eficaz na prevenção da displasia cervical (13). Já a vacina quadrivalente além de ser eficaz contra o HPV dos tipos 16, 18, 6 e 11 é eficaz na prevenção de lesões de alto grau, vulvar, anal e vaginal e ainda, confere proteção contra os condilomas relacionados com os HPV 6 e HPV 11. A vacina nonavalente tem a capacidade de aumentar a proteção contra o cancro cervical numa percentagem de 70% a 90% (8,32,33).

1.2.3-Tratamento

As opções de tratamento variam desde a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia ou a combinação destas diferentes abordagens (13). A cirurgia é uma opção terapêutica utilizada em estádios precoces podendo variar desde a conização, a traquelectomia ou a histerectomia dependendo do estágio do tumor e da vontade da doente de continuar fértil (13). Em doentes em estágio precoce (IA-IB) o tratamento consiste em histerectomia radical, disseção dos gânglios linfáticos e/ou radioterapia com ou sem quimioterapia. Já em doentes com cancro do colo do útero localmente avançado o tratamento inclui a radioterapia externa em combinação com a cisplatina e a braquiterapia (19).

Na quimioterapia, o tratamento *standard* é a cisplatina, administrada na concentração de $40\text{mg}/\text{m}^2$ (34,35). Nas doentes em estádios avançados, com metastização à distância, ou quando deixam de ser sensíveis ao tratamento com a cisplatina, a combinação com outros quimioterapêuticos constitui uma opção. Nestas circunstâncias, a associação do bevacizumab com a cisplatina/paclitaxel ou a associação do bevacizumab com o topotecan/paclitaxel são opções possíveis (36).

Outros fármacos também utilizados no tratamento desta neoplasia são a carboplatina e o pembrolizumab (37).

1.3-Cisplatina

A cisplatina foi descoberta por Michele Peyrone em 1844. Após ser aprovada pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) em 1978, tem sido utilizada no tratamento de diversas neoplasias como o cancro da cabeça e pescoço, do pulmão, do ovário e cancro do colo do útero (34,38–41).

A cisplatina é um agente alquilante, constituído por um átomo de platina, ligado a duas amidas e a dois cloretos. Após administração intravenosa em solução salina rapidamente se difunde pelos tecidos e cerca de 90% liga-se as proteínas no plasma o que inativa grande parte deste fármaco. Após entrar na célula por difusão passiva ou por difusão facilitada, no citoplasma (baixa concentração de cloreto) uma ou duas moléculas de cloreto são substituídas por moléculas de água tornando-se biologicamente ativa (Figura 1.7). Na sua forma ativa, tem a capacidade de se ligar a proteínas como o RNA ou o DNA, fosfolípidos da membrana, filamentos do citoesqueleto e glutathione reduzida (GSH). Posteriormente, é excretada pela via biliar, intestinal e renal (42–44).

Apenas 1% da cisplatina intracelular tem a capacidade de se ligar ao DNA. A sua ligação ao DNA dá-se de forma covalente formando aductos entre as purinas, localizadas na mesma cadeia ou em cadeias diferentes, o que impede desta forma a transcrição e a síntese de DNA. Também se consegue ligar a duas guaninas adjacentes (65%), a uma adenina e a uma guanina (25%) ou a duas guaninas separadas por uma ou mais bases (10%) (42,43). Ao detetar a formação de aductos, a célula ativa uma cascata de transdução de sinal a fim de reparar os danos no DNA, levando desta forma ao bloqueio no ciclo celular que tanto poderá ocorrer na fase S, na fase G1 ou na fase G2 e quando não é possível reparar ocorre a indução da morte celular (45–47).

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

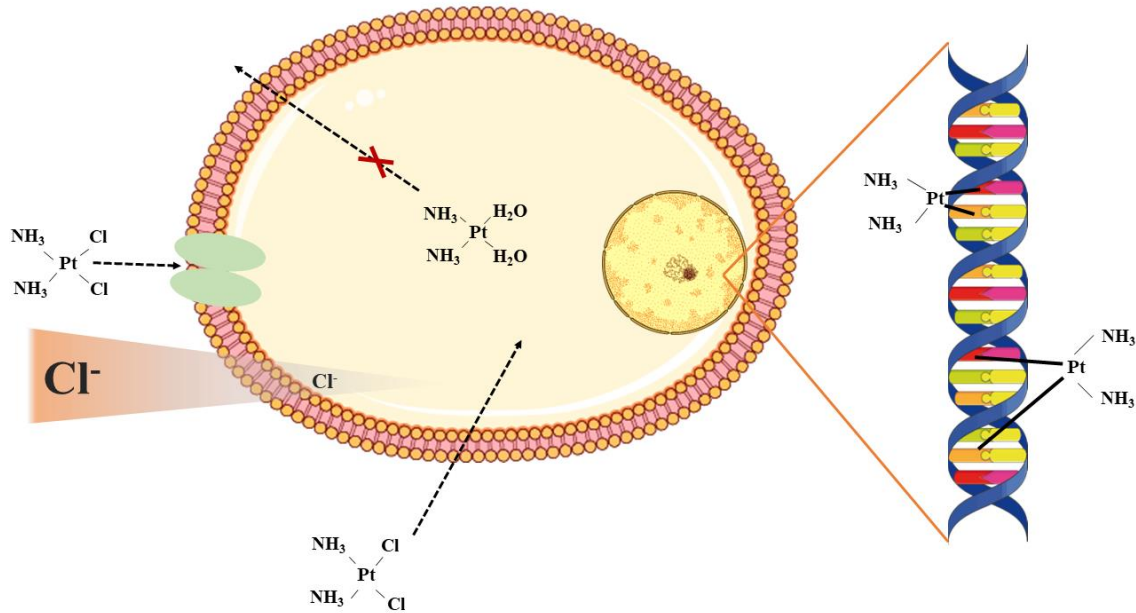


Figura 1. 7: Biotransformação da cisplatina. O meio intracelular e o meio extracelular possuem diferenças na concentração de cloreto. A concentração de íons cloreto (Cl⁻) é maior no meio extracelular do que no meio intracelular. A cisplatina ao entrar na célula, os íons cloretos são substituídos por moléculas de água, desta forma a cisplatina já não consegue sair para o ambiente extracelular. Esta substituição permite ainda que a cisplatina se torne biologicamente ativa. Na sua forma ativa é capaz de interagir com componentes celulares.

1.3.1-Toxicidade

A cisplatina é um dos agentes quimioterapêuticos mais usados no tratamento de neoplasias em tumores sólidos. A formação de aductos causa citotoxicidade não só nas células tumorais como nas células normais em divisão. Possui um efeito nefrotóxico, ototóxico, neurotóxico, elevado efeito emetogénico, além de ser necessário uma hidratação constante (44,47–49). Estes efeitos colaterais limitam a qualidade de vida dos doentes, podendo levar à redução da concentração ou mesmo à descontinuação do tratamento (50). Apesar de atuar nas células em divisão, as células quiescentes do túbulo contornado proximal renal sofrem grandes danos com o uso deste fármaco. Após uma única administração cerca de 25% a 35% das doentes tratadas com cisplatina têm uma diminuição da função renal (51). A nefrotoxicidade da cisplatina deve-se a dois fatores principais: a acumulação da cisplatina a nível renal e ao sistema de transporte tubular renal (51). A cisplatina é maioritariamente excretada por via renal porém, é também no rim que se acumula uma grande parte deste fármaco. Nas células do túbulo contornado proximal renal a concentração de cisplatina é cinco vezes maior do que no soro. A citotoxicidade renal é dose-dependente limitando o aumento da concentração durante o tratamento (51).

A difusão passiva e a difusão facilitada mediada por transportadores, são mecanismos que possibilitam a acumulação da cisplatina nas células tubulares renais. O transportador catiónico orgânico 2 (OCT, do inglês *organic cation transporter*) é o principal transportador a nível renal, responsável por aumentar a concentração deste fármaco e promover a nefrotoxicidade (44).

No adulto, as células do túbulo contornado proximal renal não estão em divisão, pelo que não se pode atribuir aos danos no DNA a causa da nefrotoxicidade. Acredita-se que grande parte da nefrotoxicidade gerada pela cisplatina se deve à formação de espécies reativas de oxigénio (ERO) como o radical hidroxilo e o peróxido de hidrogénio (52,53).

No fígado, a cisplatina conjuga-se com a GSH e no rim, pela ação da gama-glutamyltranspeptidase (γ -GT), é clivada em metabolitos reativos capazes de induzir a nefrotoxicidade (54). Estes metabolitos reativos são capazes de provocar danos na mitocôndria e induzirem a produção de espécies reativas de oxigénio, inflamação e, consequentemente, a morte do tecido renal. Assim, em doentes tratados com cisplatina é comum ocorrer diminuição na taxa de filtração glomerular, diminuição da reabsorção de sódio e de água e aumento de proteínas e de eletrólitos na urina (55,56).

Para a redução destes efeitos adversos é recomendável a hidratação constante e a administração de diuréticos como por exemplo o manitol, que tem a capacidade de inibir a reabsorção de sódio, de cloro e de outros solutos (56).

A toxicidade auditiva causada pela cisplatina normalmente é bilateral e irreversível variando de acordo com a idade dos doentes, a dose, o número de ciclos e a duração do tratamento. Os sintomas mais comuns são a perda da audição, dor auditiva e zumbidos (57,58). A toxicidade auditiva provocada pela cisplatina não ocorre somente pela produção de ERO, mas também pela diminuição das defesas antioxidantes e pela ativação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase 3 (NOX3, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 3*). A NOX3 quando ativada origina ERO que poderão, por sua vez, inativar proteínas, reagir com os ácidos gordos da membrana citoplasmática, inativar enzimas antioxidantes e levar à morte celular por apoptose (50,59). Por vezes a ototoxicidade é detetada apenas quando o problema na fala se torna perceptível, o que poderá implicar gravemente com a qualidade de vida do doente quer a nível social quer emocional. Têm-se proposto estratégias que promovam a proteção auditiva, porém, nenhuma ainda foi adotada a nível clínico (58).

A neurotoxicidade periférica, outro efeito adverso relacionado com a cisplatina, é

referenciada em 50% dos doentes tratados com este fármaco. A neuropatia periférica resulta de danos no sistema nervoso periférico (SNP), impedindo ou diminuindo a correta comunicação entre o SNP e o sistema nervoso central (60,61). A neurotoxicidade induzida pela cisplatina pode resultar de diversos tipos de efeitos, como a morte neuronal por apoptose, a ligação ao DNA mitocondrial, a inibição da síntese e da transcrição de proteínas mitocondriais, a redução da função mitocondrial ou ainda por aumento da expressão da ciclina D1 (62–64).

Devido a estas toxicidades houve a necessidade de desenvolver fármacos que também fossem eficazes, mas com menor toxicidade. A carboplatina é um análogo da cisplatina que possui menor toxicidade e que também é utilizada no tratamento do cancro do colo do útero (37,65).

1.3.2-Resposta celular à cisplatina

A cisplatina é um agente citotóxico com capacidade de provocar morte celular por apoptose e por necrose. Quando se utilizam baixas concentrações deste fármaco as células apresentam uma morfologia característica da apoptose enquanto que com altas concentrações as células apresentam características necróticas (66). A apoptose é caracterizada pela condensação do DNA, fragmentação da cromatina, retração celular, formação de corpos apoptóticos, enquanto a necrose é caracterizada pela perda da integridade da membrana citoplasmática, aumento do volume celular, libertação do conteúdo celular e inflamação (67,68).

Este fármaco também é capaz de promover a paragem no ciclo celular, uma vez que quando a célula deteta a presença dos aductos fica parada no ciclo celular para reparar o dano (46). Sugere-se que o *check-point* existente na fase G2/M está envolvido na indução da apoptose após o tratamento com a cisplatina (69). Além disso a apoptose também pode ser induzida pela expressão da P53 (70).

Como já referido anteriormente, os principais efeitos adversos provocados pela cisplatina estão associados à produção de ERO, como a nefrotoxicidade e a ototoxicidade (50,53). A cisplatina além de causar danos no DNA nuclear, pode acumular-se na mitocôndria e formar aductos com o DNA mitocondrial e com proteínas. A mitocôndria além de ser responsável pela produção de energia é a maior fonte endógena de ERO (71). A formação de ERO é capaz de provocar a peroxidação lipídica que, por sua vez, poderá induzir alterações enzimáticas, alterações na estrutura das proteínas e promover a apoptose (71).

Apesar da cisplatina ser o agente quimioterapêutico *standard* utilizado na clínica do cancro do colo do útero, além da sua alta toxicidade, a resistência a este fármaco também constitui um desafio. Em alguns casos a neoplasia responde inicialmente à terapêutica e, posteriormente, deixa de responder (resistência adquirida) mas em outros casos a resistência é primária (34,37,65).

A célula tumoral pode desenvolver vários mecanismos de resistência a este fármaco desde a diminuição da captação do fármaco, o aumento do efluxo, a indução da destoxificação por ligação covalente à glutatona ou a metaloproteínas e a reparação do DNA (47). No cancro do colo do útero reporta-se ainda o aumento da reparação do DNA, a inativação da apoptose, a ativação da transição epitélio-mesênquima e a alteração do padrão de metilação (65).

A sobreexpressão de transportadores pertencentes à superfamília *ATP binding cassette* (ABC), constitui um mecanismo de resistência à cisplatina já referido em alguns estudos, levando a diminuição da concentração intracelular do fármaco por aumento das proteínas de extrusão (72,73).

A cisplatina pode-se ligar à GSH, à metionina, às metalotioneínas e a outras proteínas ricas em cisteína de onde pode resultar na diminuição das reservas antioxidantes e no aparecimento de stresse oxidativo. Por outro lado, estas proteínas podem atuar como sequestradores deste fármaco diminuído, assim, a quantidade de cisplatina reativa (47). A cisplatina, quando conjugada com a GSH, é exportada para fora da célula com ajuda dos transportadores ABC diminuindo, assim, a sua eficácia (72).

Em linhas celulares resistentes à cisplatina verifica-se que, mesmo com a formação de aductos inter- e intra-cadeias, as células conseguem escapar à apoptose, quer por aumento da reparação do DNA quer por aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas (65). O estudo realizado por Chao et al. demonstrou que a linha celular de cancro de colo do útero HeLa resistente à cisplatina adquiriu maior capacidade de reparação do DNA (74). Brozovic et al. verificou que a expressão da Bcl-2 (do inglês, *B-cell lymphoma 2*) se manteve mais elevada na linha HeLa resistente à cisplatina do que na linha não resistente (75).

1.4-Radioterapia

A radioterapia é uma terapia altamente utilizada no tratamento do cancro, estimando-se que 50% dos doentes precisarão desta abordagem terapêutica durante a evolução da doença. Esta percentagem poderá variar com o estágio da doença, tipo de tumor maligno e o perfil da população. É utilizada com intenção de cura ou como terapêutica paliativa, podendo ser

aplicada isolada ou combinada com outro tratamento de forma neoadjuvante, concomitante e adjuvante (76).

A radiação ionizante é a radiação que tem a capacidade de ionizar átomos ou moléculas (77). Promove a formação de iões que participarão em reações químicas, sendo que em tecidos vivos a ionização poderá levar a alteração de funções resultando em morte celular ou em cancro (77). A radiação ionizante divide-se em dois tipos: a radiação eletromagnética e a radiação sob a forma de partículas. Os raios-X, os raios gama são tipos de radiação eletromagnética enquanto que no tipo de radiações sob a forma de partículas podemos considerar, entre outras, as partículas alfa, as partículas beta, os positrões e os neutrões (77).

A radiação X foi descoberta em 1895 por Rontgen. Os raios-X são fótons de alta energia, produzidos quando ocorre reajustamento eletrónico nas orbitais de um átomo ou por interação entre partículas carregadas com o núcleo (77,78). A modalidade mais frequente de telerradioterapia utiliza raios-X, e a entrega de dose é, maioritariamente, de forma fracionada (76,79).

Diferentes tipos de células possuem diferentes graus de sensibilidade à radiação (78). As células tumorais como têm capacidade de proliferação mais elevada do que as células não tumorais, tornam-se mais sensíveis à radioterapia. Porém, relatam-se alguns efeitos colaterais causados pela radioterapia como a dermatite rádica, toxicidade hematológica e alterações do trato gastrointestinal (80,81).

Com o intuito de reduzir estes danos, a radioterapia tem sofrido melhorias constantes devido a uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na sensibilidade e resistência a este tratamento (80).

Por não ser um procedimento seletivo e afetar as restantes células adjacentes à massa tumoral, a manipulação de fatores como o tempo, o número de doses, o volume de tecido normal irradiado, a transferência linear de energia (LET, do inglês *linear energy transfer*), o desenvolvimento de técnicas imagiológicas e o uso de colimadores permitiram minimizar os danos causados nos tecidos normais e limitar as áreas irradiadas de forma a possibilitar com maior precisão a deposição da dose (78,80).

A radioterapia divide-se em: radioterapia externa, interna e sistémica. Na radioterapia externa utiliza-se uma fonte externa que emite os feixes de radiação, na radioterapia interna a fonte da radiação, líquida ou sólida, é colocada no interior do organismo junto ao alvo a irradiar enquanto que a radioterapia sistémica consiste na administração de radiofármacos (79,82–85).

O fracionamento da dose permite, em grande parte, a redução dos efeitos colaterais em células normais, diminui a progressão local do tumor, uma vez que entre o intervalo de cada dose as células têm um tempo para recuperar os danos ocorridos no DNA (78,80,86). Após a exposição à radiação a célula tenta reparar os danos. A radioterapia quando aplicada, as células poderão estar em diferentes fases do ciclo celular, sendo que as células na fase G2/M são mais sensíveis à radiação enquanto que células na fase S são mais resistentes. Com a progressão no ciclo celular as células que tenham sobrevivido por estarem numa fase mais resistente aos efeitos da radiação podem agora estar numa fase mais sensível. O intervalo de tempo entre uma fração e outra permitirá atingir uma maior morte celular. Nos cancros sólidos, devido à arquitetura dos neovasos sanguíneos existem regiões com pouco aporte sanguíneo e, consequentemente, pouco oxigénio, ou seja, regiões em hipoxia. Esta diminuição da pressão parcial de oxigénio confere radiorresistência à célula. Com o fracionamento da dose, as células poderão ter tempo para reoxigenar e voltar a dividir o que poderá constituir um desafio uma vez que aumenta a sobrevivência e proliferação celular. Além destes fatores a radiosensibilidade intrínseca de cada célula também é um fator importante a ter em conta. Todos estes fatores determinam a base biológica da radioterapia, os chamados cinco R's da radioterapia (reparação, redistribuição, reoxigenação, repopulação e radiosensibilidade) (78,87,88).

Os efeitos biológicos da radiação são classificados como efeitos diretos e efeitos indiretos. Os efeitos diretos resultam da interação direta entre a radiação e importantes componentes celulares como enzimas, RNA e/ou DNA. O efeito indireto é através da formação de radicais livres que funcionam como fontes de espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio, que têm a capacidade de provocar, secundariamente, danos no DNA.

As lesões no DNA podem verificar-se a nível de uma única cadeia (SSB, do inglês *single-strand break*) ou a nível das duas cadeias (DSB, do inglês *double-strand break*) (88,89). Esses danos são passíveis de serem reparados, porém se a célula for incapaz de efetuar a reparação inicia-se o processo de morte celular programada (90,91). As células vizinhas das células irradiadas também sofrem danos causados pela radiação. As células irradiadas comunicam-se com as células adjacentes por junções aderentes e por fatores libertados no meio levando as células não irradiadas a responderem da mesma forma. Esta resposta mimetiza os efeitos da radiação, como o aumento da apoptose, de mutações e de quebra de ligações nas cadeias do DNA. Esta resposta denomina-se efeito *bystander* (88,92). Os efeitos indiretos da radiação dão-se pela radiólise da água havendo a formação de ERO, em especial o radical

hidroxilo e peróxido de hidrogénio. Estas espécies radicalares têm a capacidade de reagir com moléculas na célula, principalmente com o DNA, alterando a sua estrutura (88).

Os danos nas duas cadeias do DNA são mais difíceis de serem reparados do que os danos numa única cadeia. As células respondem aos danos no DNA através da ativação de *checkpoints* do ciclo celular na fase G1/S ou G2/M. A fase do ciclo celular em que a célula se encontra está relacionada com a radiosensibilidade uma vez que na fase G2/M a célula é mais sensível à radiação enquanto que as células que estão na fase S são mais resistentes (67,88). Esses *checkpoints* permitem que a célula pare em determinada parte do ciclo a fim de tentar corrigir o erro. Caso não seja possível corrigi-lo, a célula acaba por morrer, frequentemente, por apoptose (67,90).

A expressão da proteína P53 é muito importante na resposta celular a radioterapia. A ativação da proteína P53 inicia várias respostas celulares como a senescência, a apoptose, a paragem no ciclo celular e a reparação do DNA (93). As células que escapam à apoptose, após danos irreparáveis do DNA, sofrem catástrofe mitótica ou então ficam paradas no ciclo. A paragem no ciclo celular dependente da P53 e dá-se através da ativação da P21 impedindo, desta forma, a célula de entrar na fase S (93,94).

Devido à diferente sensibilidade das células à radioterapia, desenvolveram-se modelos para explicar as diferenças na sobrevivência após a exposição a este tratamento (88). Quando uma célula sobrevive ao tratamento e esta mesma célula isolada tem a capacidade de formar colónias, diz-se que esta célula conseguiu manter a sua capacidade proliferativa ou capacidade clonogénica (77). A avaliação da capacidade clonogénica, através do ensaio clonogénico, permite obter informações sobre a radiosensibilidade celular (67).

O modelo mais utilizado na clínica é o modelo linear quadrático (LQ). Este modelo assume que para ocorrer a morte celular a célula deve possuir mais do que um alvo que devem ser atingidos, num curto período de tempo, a fim de não ocorrer a reparação (77).

O modelo LQ possui duas componentes, a componente linear α e a componente quadrática β . A relação α/β traduz a dose em que a componente linear e a componente quadrática contribuem da mesma forma para a sobrevivência. Valores baixos de α/β (1-5) indicam que a célula é radiorresistente ou responde tardiamente à radiação enquanto valores elevados de α/β (6-12) indicam que a célula é radiosensível ou responde precocemente (77).

1.4.1-Radioterapia e morte celular

O objetivo principal da radioterapia é inibir o potencial proliferativo das células e provocar a morte celular (68,95). Estes processos poderão ocorrer por apoptose, necrose, catástrofe mitótica, indução da senescência e autofagia (68,96).

A apoptose é caracterizada como uma morte celular programada com uma sequência de eventos ocorrendo em cascata. É caracterizada pela condensação do DNA, fragmentação da cromatina, retração celular, formação de prolongamentos na membrana celular (*blebs*), formação de corpos apoptóticos que posteriormente serão fagocitados por macrófagos (67,68). A apoptose está relacionada com a ativação de caspases que poderão ativar a via intrínseca (via mitocondrial) ou a via extrínseca da apoptose (68).

A necrose é caracterizada por um aumento do volume celular, perda da integridade da membrana citoplasmática, libertação do conteúdo celular e inflamação (67).

A catástrofe mitótica é a morte celular que resulta de uma mitose inapropriada, isto é, quando a célula entra em mitose com danos no DNA ou quando esses danos são mal reparados. A catástrofe mitótica resulta na formação de células poliploides, fusão de células e falha na citocinese o que poderá levar à morte celular por apoptose, necrose, senescência ou autofagia (96).

A autofagia é um processo pelo qual as células dissolvem parte do seu próprio citoplasma com o objetivo de obter moléculas pequenas e energia. A autofagia é controlada por mais de vinte proteínas que iniciam a formação de autofagossomas que posteriormente se fundem com os lisossomas para iniciarem o processo de degradação e produção de energia (96).

A senescência está relacionada com a perda permanente da capacidade de divisão das células. À medida que a célula vai envelhecendo ocorre o encurtamento dos telómeros, com perda da capacidade de se replicar. Esta senescência replicativa pode também ser induzida precocemente pela ação da radioterapia (96).

As células reagem de forma diferente à radioterapia pelo que, em alguns tipos de células, a morte pode ocorrer algumas horas após a exposição à radiação enquanto que a grande maioria morre muito tempo após a exposição (96). Desta forma, de acordo com o momento em que a célula morre pode-se classificar a morte celular em dois tipos: morte celular precoce e morte celular tardia. Na morte precoce ocorre a ativação de vias após os danos causados pela radioterapia. A indução da apoptose após danos no DNA é um exemplo de morte celular precoce. A ativação da morte celular precoce pode resultar também de danos causados em outras estruturas celulares sem ser o DNA. Relativamente à morte celular tardia, ela ocorre após a divisão celular. A catástrofe mitótica constitui um exemplo de morte celular tardia (96).

A radioterapia atua a nível celular de forma direta ou indireta. Nos efeitos indiretos ocorre a formação de radicais livres, fundamentalmente, através da radiólise da água (88). As espécies reativas de oxigénio formadas são por exemplo: o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxilo (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (97).

As espécies reativas de oxigénio são importantes em funções biológicas como a fagocitose, produção de energia, regulação do crescimento celular e ainda atuam como segundos mensageiros (97,98). Porém em excesso são prejudiciais podendo provocar danos no DNA, RNA, proteínas e peroxidação dos lípidos (98). O excesso de radicais livre é combatido pelas defesas antioxidantes endógenas ou adquiridos na dieta (98). Esses antioxidantes podem ser a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a GSH (97).

As ERO estão envolvidas na proliferação celular, na sinalização e na metastização das células cancerígenas, sendo por isso consideradas oncogénicas. Por outro lado, a radioterapia, quimioterapia e terapia fotodinâmica promovem a formação de espécies reativas de oxigénio o que provocará a morte celular (99).

1.4.2-Radioterapia e cancro do colo do útero

No tratamento do cancro do colo do útero as formas de radioterapia utilizadas são a radioterapia externa e a braquiterapia (19).

A braquiterapia é utilizada no tratamento de doentes em estádios avançados. É um tratamento *standard* utilizado em combinação com a radioterapia externa sempre que possível (19). Permite a deposição de altas doses no centro do tumor poupando as estruturas adjacentes (19). A braquiterapia é administrada em 3 a 5 frações de 5 a 7Gy cada em combinação com a radioterapia externa (45 a 50Gy de dose total) (100). Alguns estudos relatam o aumento da sobrevida livre de doença quando a radioterapia é associada a braquiterapia (101,102).

Na radioterapia externa a radiação provém de uma fonte externa (79). A passagem da radiação através da pele pode provocar lesões dérmicas rásicas. As estruturas adjacentes como a vagina, os ovários e/ou a bexiga também podem ser afetadas. Quando a radioterapia é administrada em conjunto com a quimioterapia os sinais e os sintomas como a fadiga, as náuseas e a anemia tornam-se mais acentuados (103).

Quando o cancro do colo do útero é diagnosticado em estádios avançados a combinação da radioterapia externa, com a braquiterapia e a quimioterapia constituem opções terapêuticas (104). Em estádios precoces a radioterapia é uma opção terapêutica com alta taxa de cura (18). Quanto mais avançado for o estágio, menor a taxa de sobrevivência. A sobrevivência aos cinco anos é de 66%, 40%, 42% e 22% em estádios IIB, IIIA, IIIB e IVA respetivamente (105). Em

estádios avançados, após a terapêutica com a radioterapia, relata-se recorrência locorregional em 50 a 70% das doentes (18).

A diminuição da sobrevivência dos doentes poderá ser um possível indicador de que são necessárias melhorias no tratamento em estádios avançados (105). Além disso, doentes com o mesmo prognóstico nem sempre respondem da mesma forma ao tratamento, o que poderá estar relacionado com a variabilidade genética dos doentes (104). A radiosensibilidade pode ser afetada por fatores intrínsecos e extrínsecos (106). Alguns fatores como a hipoxia, a ativação de oncogenes, a inativação de supressores tumorais, a reparação no DNA, a apoptose, o ciclo celular, as células estaminais, a sobreexpressão de algumas moléculas de sinalização estão descritas como mecanismos de resistência envolvidos no cancro do colo do útero (18,106).

A formação de radicais livres de oxigénio é um dos principais mecanismos de atuação da radioterapia, o que faz com que células em áreas em hipoxia sejam mais resistentes a este tratamento (107). A hipoxia estimula a produção do fator indutor de hipoxia (HIF, do inglês *hypoxia-inducible factor*). A sua ativação promove a formação de novos vasos, a angiogénese, e alterações no metabolismo celular (107). Alguns estudos já foram realizados no cancro do colo do útero com intuito de avaliar o impacto deste fator de transcrição nesta neoplasia. No estudo realizado por Bachtiry *et al.*, os autores observaram que a sobreexpressão do HIF-1 α está associada a baixa progressão livre de doença (107,108). Em outro estudo realizado por Dellas *et al.*, os autores observaram que a expressão do HIF-1 α está associada a baixa sobrevida (109).

As alterações no metabolismo da glicose como a sobreexpressão de transportadores também estão descritos como mecanismos de resistência à radioterapia (106). A sobreexpressão da família dos transportadores da glicose (GLUT, do inglês *glucose transporter*) promove o aumento da glicose no citoplasma de células cancerígenas e está relacionada com o aumento da glicólise aeróbica no cancro. Em condições hipóxicas HIF-1 α induz a expressão do GLUT-1, aumentando a entrada de glicose na célula (110). Huang *et al.* observaram que a sobreexpressão de GLUT-1 está associado a uma baixa progressão livre de doença (106).

1.5-Células estaminais do cancro

As células estaminais são células com capacidade de auto-renovação, de diferenciação e de proliferação. Têm a capacidade de se diferenciarem em diferentes tipos de células, desde células que poderão dar origem a todos os tipos de tecidos ou em células específicas de um determinado tecido, na dependência do microambiente e dos estímulos durante o processo de diferenciação/desdiferenciação (111,112).

Sabe-se que a maioria dos tecidos humanos, possuem células estaminais. Num tecido normal a célula tem uma capacidade de proliferação limitada, obedecendo a sinais de forma a manter a homeostasia. Quando se fala em células tumorais o panorama torna-se diferente, estas têm a capacidade de desregular estes sinais e crescer de forma exacerbada (113,114).

No que se refere à patologia tumoral acredita-se que a falha a diferentes terapêuticas está relacionada com a heterogeneidade intratumoral associada à presença de células estaminais do cancro (do inglês *cancer stem cells*, CSCs). As CSCs constituem uma pequena população de células cancerígenas com capacidade de auto-renovação e de proliferação (115–117). Sustentam a progressão tumoral permitindo haver sempre clones, crescimento e proliferação celular, metastização mesmo em microambientes com condições pouco favoráveis. Têm a capacidade de evadir o sistema imune, interagem com as células vizinhas de forma a obterem nutrientes e conseguem permanecer quiescentes durante longos períodos. Para além disso, permitem a progressão tumoral inibindo a apoptose, silenciando genes supressores tumorais e silenciando ou transcrevendo miRNA (118–120). As CSCs residem em nichos compostos por fibroblastos, células do sistema imunitário, células endoteliais, perivasculares, citocinas, fatores de crescimento e matriz extracelular. Fazem também parte deste nicho outras CSCs e células tumorais. O nicho mantém as propriedades estaminais das CSCs, protege-as do sistema imunitário e facilita a metastização (120). Devido a presença das CSCs muitos cancros são resistentes à radiação e à quimioterapia o que determina a recidiva. Por outro lado, a exposição a estes tratamentos poderá ainda ser útil no seu isolamento e identificação (115,119,121,122). A resistência a estes tratamentos poderá explicar a recorrência e as metástases à distância. Posto isto, as CSCs ou o seu nicho, poderão ser alvos diretos para o tratamento (120,123).

A resistência associada à presença de CSCs, deve-se ao facto de elas conseguirem sobreviver com alterações genéticas que escapam aos mecanismos de senescência e de morte celular, levando à diversidade genética do tumor (124). Como mecanismo de defesa ao tratamento relata-se ainda a alta expressão de transportadores associados à extrusão de fármacos, elevada ativação de vias de sinalização como a Wnt/ β -catenina, maior capacidade de recuperação dos danos no DNA e resistência à morte por apoptose (125–127).

As CSCs podem ser identificadas pela função enzimática, capacidade de formação de esferas e pela expressão de marcadores de superfície (123). Conhecem-se alguns marcadores de CSCs tais como o CD44, o CD133, o recetor tirosina quinase (RTK), a aldeído desidrogenase (ALDH), a molécula de adesão de células epiteliais/antígeno específico epitelial

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

(EpCAM/ESA) e a subfamília G membro 2 da ATP-binding cassette ABCG2 indicados na Figura 1.8 (115).

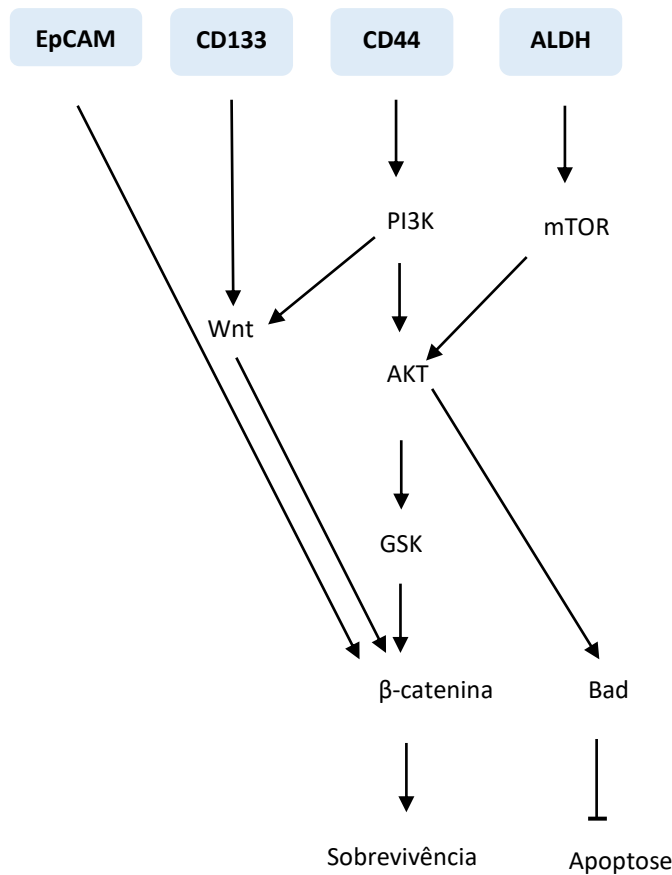


Figura 1. 8: Marcadores e vias de sinalização envolvidos na resistência à terapêutica das cancer stem cells.. EpCAM- molécula de adesão de células epiteliais/antígeno específico epitelial; PI3K - fosfatidilinositol 3-quinases ; Gsk- glicogénio sintase quinase; mTOR- mammalian target of rapamycin; ALDH- aldeído desidrogenase. Adaptado de: Ranji P (115).

O CD133 (*prominin-1*) pertence a família da glicoproteína transmembranar (128). Localiza-se nas microvilosidades e protusões da membrana e possui um peso molecular de 117 KDa. Foi descrito como um marcador de células estaminais cancerígenas em células hematopoiéticas, mas posteriormente foi também identificado como marcador das células estaminais em outros tecidos (126,129,130). Está associado a regeneração, diferenciação, metabolismo e tumorigênese (131). O aumento da expressão desta proteína é utilizado como marcador em tumores sólidos incluindo tumores escamosos da cavidade oral. Em alguns casos permanece controverso a sua utilização como marcador, uma vez que alguns tumores CD133 negativos apresentam maior capacidade tumorigénica. Porém, em casos de leucoplaquia oral com expressão de CD133, a probabilidade de evolução da doença é três

vezes maior do que em casos sem expressão de CD133. A expressão desta proteína aumenta com a agressividade da transformação, isto é, apresenta-se em menores níveis em tecidos normais e em níveis mais elevados nos tecidos tumorais (129). Diversos estudos realizados sugerem que a sobreexpressão deste marcador está envolvido na sobrevivência, na invasão, na metastização e na resistência ao tratamento (122,132,133).

Whang *et al.* observou que uma população isolada da linha celular HeLa, exibia uma maior capacidade de proliferação, de diferenciação e de formação de colónias. Apesar da baixa expressão de CD133 nesta população, apresentava maior capacidade de resistência à quimioterapia e à radioterapia quando comparada com a população que não expressava este marcador (134). Por sua vez, Javed *et al.* ao estabelecerem culturas primárias a partir de amostras de cancro do colo do útero invasivo de doentes não tratados, observaram que as células que expressavam CD133 tinham maior capacidade de formação de esferas e exibiam maior expressão de genes de pluripotência, como o OCT4 (do inglês, *octamer-binding transcription factor 4*) e o NANOG (do inglês, *Homeobox protein NANOG*) (135). No estudo realizado por Zhang *et al.* em células da cavidade oral, verificou-se que as CSCs que expressavam CD133 tinham maior capacidade de formação de tumor, de invasão e de resistência à quimioterapia (122). Em alguns estudos já se verificou a interação entre o CD133 e a β -catenina (128,136). No estudo realizado por Mak *et al.*, verificou-se que o CD133 interagiu com a desacetilase das histonas HDAC6 promovendo a estabilização da β -catenina, molécula central da via canónica do Wnt (136). Rappa *et al.* observou que a diminuição da expressão de CD133 em células do melanoma aumentava a capacidade de metastização e da expressão de inibidores da via Wnt (137). Posteriormente, verificaram que após a diminuição da expressão da prominin-1 ocorria a diminuição da expressão nuclear da β -catenina em células de melanoma (128).

Participam na sinalização mediada por Wnt, 19 glicoproteínas envolvidas na via canónica (via dependente da β -catenina) e na via não canónica (via não dependente da β -catenina). Esta sinalização está envolvida na regulação epitelial tanto do tecido normal como do tumoral. Esta via está envolvida na regulação do desenvolvimento embrionário, na auto-renovação e na proliferação das CSCs, no ciclo celular, na inflamação, na polaridade celular, na migração, na diferenciação e na sobrevivência celular (138–141).

A β -catenina desempenha um papel importante nas junções celulares estando associada a E-caderina que desempenha um papel importante nas junções aderentes, ajudando a manter a estrutura das células epiteliais e impedindo a metastização. Quando

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

ocorre a perda da E-caderina é frequente ocorrer a translocação nuclear da β -catenina e transcrição de genes (140).

Na via Wnt/ β -catenina quando Wnt não se liga ao seu receptor *frizzled* (FZD), a β -catenina é fosforilada pela caseína quinase 1 α (CK1 α) e pelo glicogénio sintase quinase 3 β (GSK3 β) existente no complexo formado pela APC (do inglês *adenomatous polyposis coli*), GSK3 β , Axin e CK1 α . Quando fosforilada pela GSK3 fica marcada para a degradação no proteossoma. A sua degradação impede a transcrição de genes alvos como o c-Myc, a ciclina D1 e a sobrevivência celular. Por outro lado, quando o Wnt se liga ao receptor FZD e ao co-receptor proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP, do inglês *Low density lipoprotein receptor-related protein*), ocorre a ligação da *Dishevelled* (Dvl) ao receptor (FZD) e posterior recrutamento da Axin. O LRP é fosforilado pela CK1 α e GSK3 β e ocorre a ligação da Axin ao LRP fosforilado e disrupção do complexo de destruição da β -catenina (138–140,142–146). Desta forma a β -catenina acumula-se no citoplasma e posteriormente transloca-se para o núcleo ligando-se ao domínio fator de célula T/fator potenciador linfoide (TCF/LEF, do inglês *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) (Figura 1.9) (140).

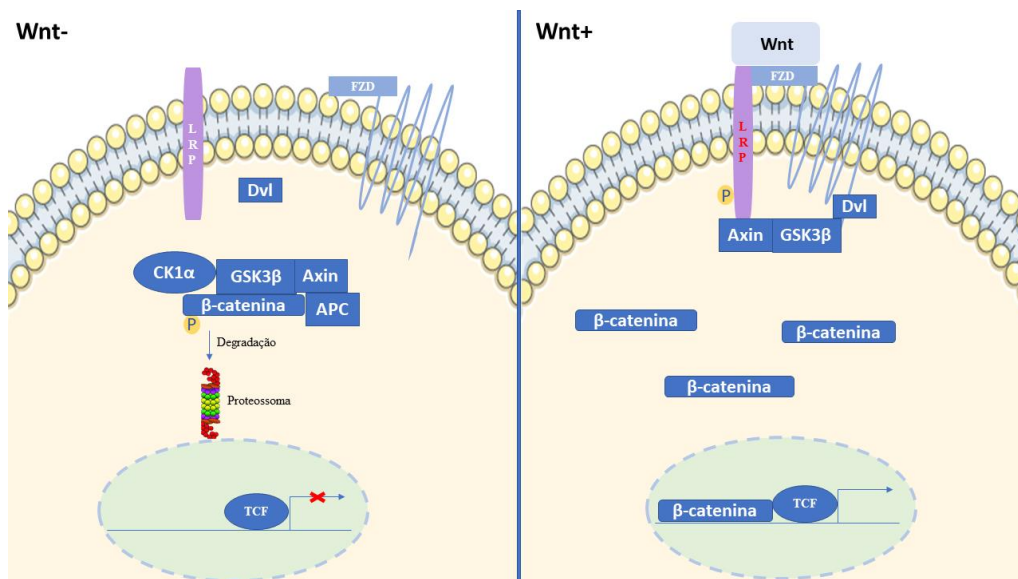


Figura 1. 9: Via de sinalização Wnt/ β -catenina. Na via Wnt/ β -catenina quando Wnt não se liga ao seu receptor frizzled (FZD), a β -catenina é fosforilada pela caseína quinase 1 α (CK1 α) e pelo glicogénio sintase quinase 3 β (GSK3 β) existente no complexo formado pela APC (do inglês *adenomatous polyposis coli*), GSK3 β , Axin e CK1 α e posteriormente é degradada no proteossoma. Quando o Wnt se liga ao receptor FZD e ao co-receptor Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP), o LRP é fosforilado e ocorre a disrupção do complexo de destruição. Desta forma a β -catenina entra no núcleo e promove a transcrição de genes alvos. Adaptado de: MacDonald *et al.*(146).

Nesta via de sinalização as proteínas Naked e Axin funcionam como inibidores (147). Nos vertebrados existem duas isoformas de Naked, a Naked1 e a Naked2. A Naked1 participa em quase todas as sinalizações mediadas pela via Wnt durante o desenvolvimento e está sobreexpressa em tumores com mutação na via Wnt/ β -catenina. A Naked2 além de estar envolvida na sinalização Wnt, também está associada a outras moléculas envolvidas na polarização celular. Desta forma acredita-se que a Naked1 seja específica da via Wnt/ β -catenina (147). A Naked1 tem a capacidade de interagir com a β -catenina de forma direta impedindo a sua acumulação nuclear. Além disso, também tem a capacidade de inibir a ação Dvl, um regulador positivo da via (147,148). Zhang *et al.* demonstraram que a diminuição da expressão da Naked1 em células do cancro do pulmão levou ao aumento da expressão da β -catenina e da Dvl1. Observaram que a sua baixa expressão está associada a estádios mais avançados do tumor, menor diferenciação, pior prognóstico e maior metastização (148). Posteriormente, no estudo realizado por Lv *et al.* observou-se que a baixa expressão de Naked1 no cancro da mama estava relacionado com a pouca diferenciação, a metastização ganglionar e diminuição da sobrevivência (149).

A proteína Axin possui duas isoformas, a Axin1 e a Axin2, com funções idênticas. Ambas são capazes de se ligarem à β -catenina e induzirem a sua degradação (149). Esta proteína funciona como um *scaffold* que possui sítios de interação com diversas outras proteínas envolvidas nesta via, como β -catenina, a GSK, a CK1, a APC, a Dvl e o receptor LRP. Por formar este complexo, facilita a interação entre a β -catenina e a GSK 3 β , havendo a posterior degradação da β -catenina (150,151). A via não canónica (não dependente da β -catenina) encontra-se menos associada ao desenvolvimento tumoral. Está maioritariamente associada à migração, à diferenciação e à polarização, estando dividida em duas vias: a polaridade planar celular (PCP, do inglês *planar cell polarity pathway*) e a via dependente de cálcio (140,141).

Na via PCP, após a ligação do Wnt ao FZD ocorre o recrutamento da Dvl e ativação de duas rotas diferentes: a Rho (do inglês, *Ras homolog gene family member*) GTPase e ao substrato de toxina botulínica C3 relacionado a Ras (RAC, do inglês *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*) GTPase. A ativação desta via leva a modulação do citoesqueleto e ativação da transcrição de genes responsáveis pela adesão e migração (141).

Na via dependente de cálcio, quando o Wnt se liga ao FZD, este complexo ligando-receptor associa-se a uma proteína G heterotrimérica, formada pela subunidade α , subunidade β e subunidade γ . Posteriormente, a subunidade α liberta a guanosina difosfato

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

(GDP) e liga-se à guanosina trifosfato (GTP) o que resultará na ativação da fosfodiesterase. Por outro lado, as subunidades β e γ ativam a fosfolipase C (PLC β , do inglês *phospholipaseC- β*) resultando na ativação da proteína quinase C (PKC, do inglês *protein kinase C*) e aumento de cálcio (140).

1.6-Hipótese

De uma forma geral, e de acordo com os conhecimentos obtidos na parte Introdução deste trabalho, surgem as seguintes hipóteses:

- 1) Se a proteína CD133 é responsável pela resistência à quimioterapia e à radioterapia então após o tratamento com a cisplatina e a exposição à radioterapia a sua expressão manter-se-á constante ou irá aumentar.
- 2) Se as CSCs estão associadas à resistência à quimioterapia e à radioterapia e a via Wnt/ β -catenina está associada a manutenção e a proliferação das células estaminais então é expectável que a expressão destas proteínas esteja alterada após o tratamento com a cisplatina e a exposição à radioterapia.

1.7-Objetivos

O cancro do colo do útero é um dos principais cancros ginecológicos femininos, responsável por uma mortalidade acentuada principalmente em países em desenvolvimento. A heterogeneidade tumoral é uma das principais razões pela qual as células que constituem o tumor são capazes de escapar aos tratamentos convencionais (quimioterapia e radioterapia) tornando-se resistentes e eventualmente induzir a recaída. Além do mais, os tratamentos convencionais estão associados a alta toxicidade por não serem terapias diretamente dirigidas a um único alvo/marcador. Acredita-se que as CSCs assim como a sustentação de vias responsáveis pela sua manutenção, proliferação sejam responsáveis por estes mecanismos de resistência. Desta forma, a presente dissertação teve como principal objetivo avaliar a expressão da CD133, Wnt, β -catenina e outras proteínas envolvidas nesta via (LRP6, pLRP6, Naked1 e Axin1) após a exposição à radioterapia e o tratamento com a cisplatina na tentativa de perceber se estas proteínas poderão ser utilizadas como alvo direto no tratamento, de forma a minimizar a toxicidade. Como objetivo secundário pretendeu-se perceber se a alteração da expressão da CD133 irá interferir com a expressão da β -catenina. Para o efeito, estabeleceram-se dois objetivos concretos:

- 1) Numa primeira abordagem pretendeu-se avaliar o efeito da cisplatina na linha celular HeLa. Estudou-se o efeito anti-proliferativo, alterações no stresse oxidativo, na morte celular, ciclo e avaliaram-se as expressões proteicas da CD133, Wnt, β -catenina, LRP6, pLRP6, Naked1 e Axin1.
- 2) Numa segunda abordagem, pretendeu-se avaliar o efeito da radioterapia na linha celular HeLa. Avaliou-se a capacidade clonogénica, alterações no stresse oxidativo, na morte celular e avaliaram-se as expressões proteicas da CD133, Wnt, β -catenina, LRP6, pLRP6, Naked1 e Axin1.

2-Materiais e métodos

2.1-Cultura celular

A linha celular HeLa (ATCC® CCL-2™), derivada do cancro do colo do útero (adenocarcinoma) foi cedida pela professora Doutora Carmen Lima da Universidade Campinas, São Paulo, Brasil. A linha celular foi propagada em culturas aderentes em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Sigma D5648) suplementada a 5% com soro bovino fetal (do inglês *Fetal Bovine Serum*, FBS, Sigma F7524), 1% de antibiótico (Sigma A5955, constituído por 10 000 U/mL de penicilina, 10 μ g/mL de estreptomicina e 25 μ g/mL de anfotericina B) e 0,25 mM de piruvato de sódio (Gibco 11360-039) e incubada numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂ a 37°C na incubadora Binder (Binder®, CB60).

Com a finalidade de se obter uma suspensão celular o meio de cultura (DMEM) foi removido, e o frasco foi lavado com uma solução tampão de fosfato (do inglês, *phosphate buffered saline*, PBS, pH a 7,4), constituída por 137 mM de cloreto de sódio (Sigma S7653), 2,7 mM de cloreto de potássio (Sigma P9333), 0,8 mM de fosfato de sódio monohidratado (Sigma S9638), 1,5 mM de fosfato de potássio monobásico (Sigma P0662) e 0,54 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, Ameresco M101). De seguida, descartou-se o PBS e adicionaram-se 2 mL de tripsina-EDTA (0,25%, Sigma T4049) para destacar as células, e durante 5 minutos permaneceram na incubadora. De seguida procedeu-se à inativação da tripsina-EDTA seguida de desagregação mecânica com 5 mL de DMEM. Posteriormente, para se obter a suspensão celular com a quantidade de células necessárias para cada experimento efetuou-se a contagem celular recorrendo-se à técnica do azul tripano (Sigma T0776) na diluição de 1:20 em água ultra-pura. Para este procedimento, adicionaram-se 20 μ L da suspensão celular a 20 μ L do azul tripano e contaram-se as células utilizando uma câmara de Neubauer no microscópio óptico invertido (Nikon eclipse TS100), numa ampliação a 10x.

2.2-Ensaio de sobrevivência, proliferação e viabilidade celular

2.2.1- Determinação das concentrações inibitórias de cisplatina

O ensaio de sulforodamina B (SRB) utilizado para avaliar a citotoxicidade *in vitro*, baseia-se na ligação eletrostática entre o corante SRB com os resíduos de aminoácidos das células que foram previamente fixadas. A quantidade de corante ligado é proporcional à massa celular, ou seja, quanto maior for o número de células maior será a quantidade de corante e maior será a absorvância medida, o que permitirá extrapolar a proliferação celular. Este ensaio é caracterizado por ser simples, sensível, reproduzível e de baixo custo (152–156).

Este ensaio foi utilizado com a finalidade de determinar as diferentes concentrações inibitórias (IC, do inglês *inhibitory concentration*), nomeadamente a IC₂₀, a IC₅₀ e a IC₈₀. Para tal, preparou-se uma suspensão celular na concentração de $0,05 \times 10^6$ células por mililitro em DMEM, distribuindo-se 500 μ L por poço, numa placa de 48 poços (Costar® 3548). Após 24 horas, as células foram incubadas com cisplatina (1 mg/mL, TEVA 93.150.834-D) com concentrações crescentes (0,5-33 μ M) durante 24, 48 e 72 horas. Cada ensaio foi realizado em triplicado e ainda se realizaram dois controlos, um com as células não tratadas e outro com o solvente (solução salina estéril a 0,9%).

Após o período de incubação com os diferentes fármacos, eliminou-se o meio de cultura dos poços, lavaram-se as células com PBS e procedeu-se à fixação das células pela adição de 200 μ L de ácido acético a 1% (Sigma 33209) em metanol (Sigma 32213) a cada poço, ficando a incubar durante 2 horas a 4°C. Após este período, eliminou-se o ácido acético a 1% em metanol e adicionaram-se 200 μ L de SRB 0,5% (Sigma S9012) em ácido acético a 1% após a placa estar seca. Posteriormente, incubou-se a placa durante 40 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. De seguida, as células foram lavadas com água corrente e, após remover o excesso, adicionaram-se 200 μ L de TRIS-NaOH (10 mM, pH=10). Após homogenização, as suspensões celulares foram transferidas para uma placa de 96 poços (Costar 3596®). Efetuou-se a leitura da absorvância com o comprimento de onda de 540 nm com um filtro de referência de 690 nm no espectrofotómetro ELISA (Biotek® Synergy HT, EUA). A percentagem de inibição de proliferação foi calculada para as células tratadas, após normalização ao respetivo controlo. Os dados obtidos permitiram traçar as curvas de proliferação e determinar o IC₂₀, o IC₅₀ e o IC₈₀ recorrendo ao *software* OriginPro 8.0.

2.2-Avaliação dos efeitos da terapêutica com raios-X

Para irradiar a linha celular HeLa preparou-se uma suspensão celular com a concentração final de $0,5 \times 10^6$ células por mililitro, utilizando *eppendorfs* com um volume final de 600 μ L, tendo sempre em atenção perfazer o volume total de modo a minimizar a presença de ar. As suspensões foram irradiadas com diferentes doses entre 0,5 Gy e 10 Gy no acelerador linear acelerador *Varian Clinac 600C* (Varian, California, EUA), com raios-X de energia de 4 MeV no Serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). Realizou-se ainda, um controlo que acompanhou todo o processo com exceção da irradiação.

Para garantir que a distribuição das doses fosse homogénea e a irradiação reprodutível, utilizou-se uma caixa de irradiação em acrílico com paredes de 1 cm de espessura, com marcas para o posicionamento gravadas em relevo possibilitando, assim, o alinhamento em paralelo com os feixes da *gantry* de acordo com o referenciado em Mendes *et al.* (figura 2.1) (157). A caixa foi construída no Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, encontra-se certificada e foi submetida a um estudo dosimétrico por imagens de tomografia computadorizada igual à executada nos doentes, como demonstrada a figura 2.2.

O procedimento iniciou-se por colocar a caixa em cima da mesa de tratamento, que posteriormente foi enchida com água, a 37°C de forma a garantir a homogeneidade das doses e os *eppendorfs* previamente marcados para cada condição, foram completamente submersos em água, com exceção do controlo que foi mantido fora da sala durante o processo de irradiação. A caixa foi alinhada longitudinalmente, horizontalmente e verticalmente com o feixe de luz da *gantry*. De seguida, as doses foram depositadas, com a *gantry* posicionada a 270° e a 90° de forma a perfazer os 0,5 Gy num campo de 40×40 cm. As doses foram cumulativas até à dose de 10 Gy (270° e 90°). As doses para cada condição encontram-se na tabela 1 abaixo indicada:

Tabela 2. 1: Doses administradas em unidades de monitor (UM, do inglês *monitor units*, 1 MU=0,022 Gy), com a *gantry* posicionada a 270° e a 90°.

Dose	0,5 Gy	1 Gy	1,5 Gy	2 Gy	3 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
270°	23 UM	23 UM	23 UM	23 UM	47 UM	47 UM	93 UM	93 UM	93 UM
90°	23 UM	23 UM	23 UM	23 UM	46 UM	46 UM	92 UM	92 UM	92 UM

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

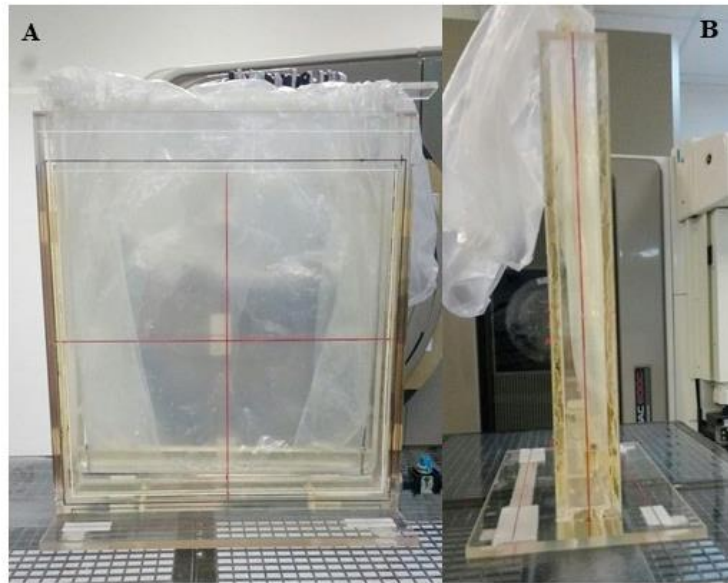


Figura 2. 1: Caixa da irradiação construída em acrílico. Marcas para o posicionamento gravadas em relevo, plano sagital (A) e plano frontal (B).

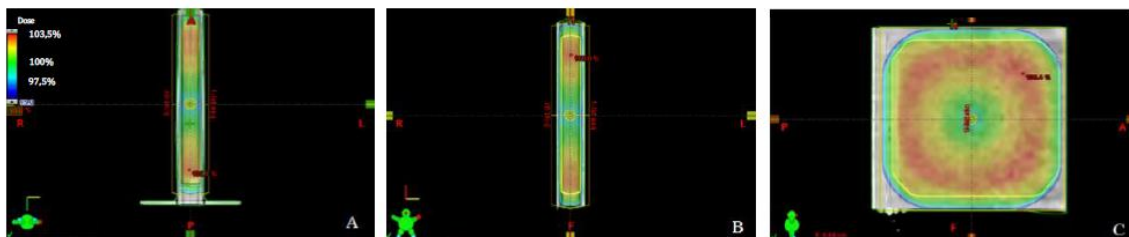


Figura 2. 2: Distribuição da dose na caixa de irradiação. Representação dos planos transversal (A), frontal (B) e sagital (C) com distribuição da dose, determinada por tomografia computadorizada. A azul distribuição mínima da dose correspondendo a 95% e a vermelho a distribuição máxima correspondendo a 106%. Mendes *et al* (157).

2.2.1- Determinação da dose letal

O ensaio clonogénico é um ensaio que avalia a capacidade de uma única célula formar colónias, considerando-se uma colónia um grupo com pelo menos 50 células. Permite avaliar a viabilidade e a sobrevivência celulares em células submetidas a radiação ionizante ou expostas a agentes citotóxicos (152,158,159). Para a realização deste ensaio, as placas de 6 poços (Costar 3516) foram revestidas com poli-D-lisina (Sigma P6407). Este revestimento foi feito por se ter verificado um aumento no destacamento celular com o decorrer do ensaio. Para tal preparou-se uma solução de poli-D-lisina, numa concentração final de 0,1 mg/mL.

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

Adicionou-se 1 mL dessa solução por poço e, após 10 minutos, removeu-se o excedente por lavagem dos poços com água ultrapura estéril. Após a lavagem, as placas permaneceram na câmara de fluxo durante a noite expostas a radiação ultravioleta. Posteriormente foram seladas e mantidas a 4°C até ao momento da utilização. Após a irradiação, ao chegar à sala de cultura, as suspensões celulares foram diluídas em *ependorfs* previamente marcados para cada condição de forma a obter uma concentração final de $0,1 \times 10^6$ células por mililitro. De seguida as células foram plaqueadas em placas de 6 poços, em triplicado, com o número de células por poço respetivas a cada condição como mostra a tabela 2. Adicionaram-se três mililitros de meio de cultura DMEM em cada poço e, posteriormente, as placas foram incubadas durante 10 dias a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Durante este período mudaram-se os meios das respetivas placas duas vezes. Após o período de incubação o meio das placas foi descartado, as placas foram lavadas com PBS, fixadas com 2 mL de metanol durante 20 minutos. Descartou-se o metanol e, após deixar secar as placas, adicionou-se um mL de violeta de cristal (Sigma C3886) a 0,5% em metanol durante cinco minutos. Efetuou-se a remoção do excesso de corante e após as placas estarem secas, efetuou-se a contagem das colónias formadas. Desta forma, foi possível calcular a eficiência da placa (PE, do inglês *plate efficiency*) e o fator de sobrevivência (SF, do inglês *surviving factor*) de acordo com a Equação 1 e com a Equação 2, respetivamente.

Tabela 2. 2: Número de células por cada condição.

Controlo	0,5 Gy	1 Gy	1,5 Gy	2 Gy	3 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
1200	1200	1200	1200	1200	1400	1400	1600	1600	2500

Eficiência da placa (PE, do inglês *plate efficiency*) (%)

Equação 1

$$PE = \frac{\text{Número de colónias contadas}}{\text{Número de colónias semeadas}} \times 100$$

Fator de sobrevivência (%)

Equação 2

$$SF = \frac{\text{PE amostras tratadas}}{\text{PE amostras controlo}} \times 100$$

Relacionando as doses de radiação com o fator de sobrevivência (Fs) foi possível estabelecer uma curva dose-resposta, utilizando o modelo linear quadrático.

Fator de sobrevivência

Equação 3

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

onde D corresponde à dose de radiação, α ao parâmetro linear e β ao parâmetro quadrático de ajuste.

2.3-Avaliação dos efeitos da quimioterapia e da radioterapia na linha celular HeLa

Após a obtenção da DL₅₀ e da IC₅₀ e para determinar a radiosensibilidade utilizaram-se doses acima (10 Gy), inferior (2 Gy) e igual à DL₅₀ e concentrações superiores (IC₈₀), inferiores (IC₂₀) e iguais à IC₅₀, após um período de incubação de 48 horas.

Para analisar o efeito da cisplatina na linha celular, por citometria de fluxo, distribuiu-se uma suspensão celular com $2,5 \times 10^6$ células por mililitro e adicionou-se meio (DMEM) de modo a perfazer o volume final de 12 mL. Após 24h, incubaram-se as células em frascos de 75 cm², com a respetiva concentração dos fármacos previamente calculada para corresponder à IC₂₀, à IC₅₀ e à IC₈₀. Após 48 horas, removeu-se o meio de cultura dos frascos, as células foram lavadas com PBS e posteriormente destacadas com tripsina-EDTA, após incubação durante 5 minutos numa atmosfera com 5% de CO₂. De seguida, realizou-se uma centrifugação a 2500 rpm durante 5 minutos (Heraeus, multifuge 1LR). Após a centrifugação, decantou-se o sobrenadante e adicionou-se um mililitro de PBS para cada condição. Após ressuspender o *pellet*, distribuiu-se a suspensão pelos respetivos tubos de citometria (Sarstedt 55.1579) e voltou-se a centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos, com exceção dos tubos destinados à avaliação do stresse

oxidativo e das defesas antioxidantes. Cada condição foi efetuada em duplicado, realizando-se no mínimo 3 experiências independentes.

Para avaliar o efeito da radioterapia na linha celular, por citometria de fluxo, a suspensão celular foi preparada como referida anteriormente, mas utilizando um *ependorf* de 2 mililitros, tendo sempre em atenção de perfazer o volume total do *ependorf* de forma a minimizar a presença de ar. Para a condição controlo, 2 Gy e 3 Gy foram necessários quatro *ependorfs* e para a condição de 10 Gy cinco *ependorfs*. Após a irradiação, as suspensões celulares irradiadas para cada condição foram colocadas nos respetivos frascos, previamente marcados, e após 48 horas realizaram-se os estudos abaixo indicados.

De seguida iniciaram-se os protocolos para avaliar a morte celular, a viabilidade celular, o ciclo celular, o stresse oxidativo e as defesas antioxidantes.

2.3.1-Avaliação da viabilidade celular e do tipo de morte

Com o intuito de avaliar a viabilidade celular e a morte celular provocada pela cisplatina e pela radioterapia utilizou-se a dupla marcação com anexina V acoplada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e com iodeto de propídeo. A apoptose é uma forma de morte programada que pode ser desencadeada por diversos fatores como, por exemplo, agentes quimioterapêuticos e ativação de receptores de morte celular. Este processo é caracterizado pela exposição da fosfatidilserina na membrana celular, formação de corpos apoptóticos, fragmentação da membrana nuclear e diminuição do volume celular. A exposição da fosfatidilserina pode ocorrer tanto num processo inicial (apoptose inicial) ou tardio (apoptose tardia). Estando a fosfatidilserina exposta na membrana, a anexina V consegue-se ligar a este fosfolípido o que permite identificar células em apoptose (160). Na necrose e na apoptose tardia ocorre a quebra da membrana citoplasmática possibilitando a entrada do iodeto de propídeo na célula. O iodeto de propídeo tem a capacidade de se ligar aos ácidos nucleicos, sendo a fluorescência emitida proporcional à quantidade de ácidos nucleicos. Posto isto, é possível identificar quatro populações: a população das células viáveis (duplamente negativas para a anexina V e o iodeto de propídeo), a população das células em apoptose inicial (positivas para a anexina V), a população das células em apoptose tardia/necrose (duplamente positivas para a anexina V e o iodeto de propídeo) e a população das células em necrose (positivas para o iodeto de propídeo) (160,161). Para a realização deste protocolo, decantaram-se os sobrenadantes e adicionaram-se ao *pellet* de células, após ressuspensão, 100 μ L de tampão de ligação (1 \times) constituído por 139,9 mM de cloreto de sódio (Sigma S7653), 7 mM de HEPES (Sigma H7523) e 3,3 mM de cloreto de cálcio (Sigma

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

C4901). Posteriormente adicionaram-se 2,5 μ L de anexina V (Immunostep s.l) e 1 μ L de iodeto de propídeo (Immunostep) e homogenizou-se no vórtex. Os tubos foram incubados durante 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. Seguidamente, adicionaram-se novamente 400 μ L de tampão de ligação (1 \times) e, após agitação suave no vórtex, foram avaliados recorrendo ao citómetro FACSCalibur nos comprimentos de onda excitação de 488 nm e de emissão de 530 nm para AnV-FITC e de 640 nm para o iodeto de propídeo. Os resultados, em percentagem, correspondem às células marcadas presentes em cada população, isto é, células viáveis, células em apoptose inicial, células em apoptose tardia/necrose e células em necrose.

Adicionalmente, avaliou-se a morfologia celular com recurso à microscopia, para identificar os diferentes tipos de morte, utilizando a coloração *May-Grünwald-Giemsa*. Esta coloração permite avaliar a estrutura celular com os núcleos a corar de vermelho-violeta e o citoplasma de rosa a azul.

Para a realização deste ensaio foram plaqueadas $0,01 \times 10^6$ células por mililitro em placas de doze poços. Após 24 horas, adicionaram-se a cada poço os fármacos a testar, nas concentrações correspondentes ao IC₂₀, ao IC₅₀ e ao IC₈₀. Realizou-se cada condição (controlo, IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀) em triplicado.

Para avaliar o efeito da radioterapia, após expor as células ao tratamento plaquearam-se $0,01 \times 10^6$ células por mililitro em placas de doze poços, realizando-se cada condição (controlo, 2Gy, 3Gy e 10Gy) em quadriplicado.

Após 48 horas dos tratamentos acima mencionados, removeu-se o meio de cultura dos poços, lavou-se cada poço com PBS e de seguida as células foram destacadas. Para cada condição o meio, o PBS e as células foram adicionadas ao *falcon* previamente marcado minimizando assim a exclusão das células (vivas e mortas) do ensaio. As suspensões celulares foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos. Descartaram-se os sobrenadantes, adicionaram-se 2 mililitros de PBS e realizou-se uma nova centrifugação nas mesmas condições mencionadas anteriormente. O *pellet* foi ressuspensão e adicionaram-se 20 μ L de suspensão de cada condição na lâmina. De seguida, as células foram fixadas em metanol (Ficher chemical, M/4000/FP21) durante cinco minutos. Após a fixação utilizou-se o corante May-Grünwald (Merck, Darmstadt, 25% v/v em metanol) durante três minutos. De seguida incubaram-se as lâminas com Giemsa (Merck, Darmstadt, 5,56% v/v em água) durante dez minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas em água corrente durante cinco minutos.

2.3.2-Avaliação do ciclo celular

Para avaliar a distribuição das células pelo ciclo celular utilizou-se o iodeto de propídeo com RNase. Neste ensaio a quantidade de luz emitida é proporcional à quantidade de DNA ligado, o que permite distinguir células na fase G0/G1, na fase S ou na fase G2/M. Com esta metodologia é ainda possível identificar células na fase pré-G0/G1, que correspondem a células em apoptose (162). Para a realização deste protocolo, procedeu-se à decantação dos sobrenadantes e adicionaram-se 200 μ L de etanol a 70% com os tubos em agitação constante no vórtex. De seguida, foram incubados durante 30 minutos no escuro a 4°C. Posteriormente, adicionaram-se 2 mL de PBS (1 \times) e centrifugaram-se a 2500 rpm durante 5 minutos. Novamente, decantaram-se os sobrenadantes e adicionaram-se 200 μ L de iodeto de propídeo com RNase (PI/Solução de RNase, Immunostep). Realizou-se uma nova homogeneização no vórtex e de seguida uma incubação durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Posteriormente, foram agitados no vórtex e efetuou-se a leitura com os comprimentos de onda de excitação de 488 nm e de emissão de 640 nm. Os resultados foram quantificados com recurso ao software ModFit LT™, Verity, Software House e apresentados como percentagem de células no pico apoptótico e em cada fase do ciclo celular nomeadamente G0/G1, S e G2/M.

2.3.3-Avaliação das espécies reativas de oxigénio e defesas antioxidantes

Para avaliar as espécies reativas de oxigénio e as defesas antioxidantes analisou-se, por citometria de fluxo, a produção de peróxidos, o radical superóxido e a glutatona reduzida respetivamente. Para tal recorreu-se ao uso da DCFH₂-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceínadiacetato), da DHE (dihidroetidina) e do alaranjado de mercúrio, respetivamente. Para analisar a influência do radical hidroxilo na proliferação celular, realizou-se o ensaio SRB na presença do manitol (inibidor do radical hidroxilo).

2.3.3.1-Avaliação da produção intracelular dos peróxidos

A DCFH₂-DA é uma sonda que tem a capacidade de atravessar a membrana celular. Ao entrar na célula é clivada pelas esterases originando a 2',7' diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Posteriormente a DCFH é oxidada pelos peróxidos originando o composto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). O DCF emite uma fluorescência na zona do verde, proporcional à quantidade de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (163,164). Para a realização deste protocolo adicionou-se 1 μ L de DCFH₂-DA numa concentração de 5 μ M, dissolvida em dimetilformamida a 1 mM (Molecular Probes®, D-399). De seguida, os tubos foram

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

homogeneizados no vórtex e incubados durante 45 minutos no escuro a 37°C. Após este tempo de incubação adicionaram-se 2 mL de PBS (1×) sendo posteriormente centrifugados a 2500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente decantaram-se os sobrenadantes e adicionaram-se 400 μ L de PBS (1×). Novamente, voltou-se a homogeneizar os tubos no vórtex. De seguida efetuou-se a leitura no citómetro FACSCalibur nos comprimentos de onda de excitação de 488 nm. Os dados obtidos estão expressos como a razão da média das intensidades de fluorescência (MIF), normalizadas pelo controlo.

2.3.3.2-Avaliação da produção intracelular do radical superóxido

O DHE quando oxidado pelo superóxido origina um composto vermelho fluorescente que tem a capacidade de se ligar ao DNA (165,166). Para a análise do radical superóxido adicionaram-se 5 μ L de DHE dissolvido em DMSO (dimetilsulfóxido) numa concentração final de 5 μ M. De seguida, os tubos foram homogeneizados no vórtex e incubados durante 15 minutos no escuro a 37°C. Posteriormente adicionaram-se 2 mL de PBS (1×). Centrifugaram-se os tubos a 2500 rpm durante 5 minutos, decantaram-se os sobrenadantes e adicionaram-se 400 μ L de PBS (1×). Novamente, homogeneizaram-se os tubos e efetuou-se a leitura com os comprimentos de onda de excitação de 620 nm. Os dados obtidos estão expressos como MIF, normalizadas pelo controlo.

2.3.3.3-Avaliação da produção intracelular do glutathiona reduzida

A GSH desempenha um papel importante na proteção das células contra os efeitos do stresse oxidativo. Apesar da sua função na proteção celular, em níveis elevados a GSH pode constituir um mecanismo de resistência a fármacos, pelo que a sua análise se torna importante para avaliar a capacidade antioxidante da célula. Para a determinação dos níveis da GSH utilizou-se o alaranjado de mercúrio. Este composto tem a capacidade de formar aductos com os grupos sulfidril presentes na GSH (167–169). Para este ensaio, adicionou-se 1 μ L de alaranjado de mercúrio (Sigma, M7750) numa concentração de 40 μ M e de seguida, os tubos (previamente homogeneizados no vórtex) foram incubados durante 15 minutos a 37°C. Adicionaram-se 2 mL de PBS (1×). Posteriormente foram centrifugados a 2500 rpm durante 5 minutos, decantaram-se os sobrenadantes e adicionaram-se 400 μ L de PBS (1×). Novamente voltou-se a homogeneizar os tubos no vórtex. Posteriormente, efetuou-se a leitura no citómetro com o comprimento de onda de excitação de 620 nm. Os dados obtidos estão expressos como MIF, normalizadas pelo controlo.

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

2.3.3.4-Avaliação da influência do radical hidroxilo na proliferação celular

Na tentativa de perceber a ação citotóxica da cisplatina, além de se avaliarem as ERO também se avaliou o inibidor do radical hidroxilo, o manitol. Esta avaliação foi realizada por não ser possível quantificar diretamente o radical hidroxilo. Este radical é conhecido por ser o radical mais biologicamente ativo (causa danos no DNA, lípidos e proteínas) (170–173).

Para a realização deste ensaio seguiu-se o protocolo referenciado na determinação das concentrações inibitórias. Após 24 horas mudou-se o meio de cultura e adicionaram-se em cada poço 500 μ L de meio com 40 mM de manitol (Sigma, M9647) como referido na literatura (171). Realizaram-se três controlos, um em que ao meio com manitol (40mM) se adicionaram 5 μ L de soro fisiológico (solvente), o segundo com meio com 40 mM de manitol e terceiro com apenas o meio. Posteriormente, os restantes poços foram tratados com cisplatina com concentrações crescentes (0,5–33 μ M) e após 48 horas efetuou-se o restante protocolo acima referido (determinação das concentrações inibitórias).

2.3.4- Determinação da expressão das proteínas

De modo a perceber os efeitos causados pela ação da cisplatina e da radiação ionizante procedeu-se à avaliação das proteínas CD133, Wnt e β -catenina por imunocitoquímica e da CD133, da Wnt, da β -catenina, da LRP6, da pLRP,6 da Axin1 e da Naked1 por *western blot*.

2.3.4.1- Avaliação da expressão por imunocitoquímica

A imunocitoquímica assim como a imunohistoquímica tem por base a deteção de antigénios com recurso a anticorpos específicos. Diferenciam-se pela natureza da amostra, pois a primeira deteta anticorpos em amostras citológicas e a segunda deteta anticorpos em tecidos (174,175).

Para a realização deste ensaio as células foram preparadas e tratadas como referido anteriormente na citometria. Após um período de incubação de 48 horas com os respetivos fármacos, as quatro condições (controlo, IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀) foram tripsinizadas e centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min. Posteriormente adicionaram-se 2 mL de PBS e centrifugaram-se novamente a 1500 rpm durante 5 min. De seguida as células foram fixadas com 2 mL de etanol a 96 %.

Como controlo foram utilizadas amostras de tecido humano, sem patologia conhecida, da amígdala, do apêndice, do fígado, do pâncreas, da próstata, do rim, da placenta e do pulmão. Estas amostras funcionaram como controlo multitecido dos anticorpos

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

de referência. Estas amostras foram fixadas em formol neutro tamponado a 4% (FNT 4%, VWR 9713.9010) à temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente foram processadas *overnight* no processador Leica ASP300 (Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha) de acordo com a rotina do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. De seguida, foram incluídas em blocos de parafina. Os cortes histológicos de 4 μ m de espessura (micrótomo Leica RM2125 RTM) foram avaliados morfológicamente após a coloração por Hematoxilina-Eosina. Para promover a adesão dos mesmos à lâmina Superfrost Plus (Thermo Scientific, J1800AMNZ) foram colocados na estufa (Memmerth UFE500, Schwabach, Alemanha) a 80°C durante 20 minutos. Após a adesão e arrefecimento da lâmina, adicionaram-se 50 μ L de cada condição e deixou-se secar durante 20 minutos. Os cortes foram desparafinados com xilol (VWR chemical 100%, álcool absoluto). A recuperação antigénica dos cortes foi realizada na solução tampão de EDTA-Tris, (CC1, Ventana Medical Systems, 950-124, EUA, pH=8) a 95°C, durante 8 min num módulo de pré-tratamento PT Link (Dako, Glostrup, Dinamarca). De seguida as lâminas foram colocadas no equipamento Benchmark Ultra (Ventana Medical Systems, Arizona, EUA) para completar o restante protocolo de imunocitoquímica. Utilizaram-se os seguintes anticorpos abaixo indicados na Tabela 2.3.

Tabela 2. 3: Anticorpos primários e condições utilizadas no protocolo.

Anticorpo	Clone	Período de incubação (minuto)	Diluição	Fabricante	Referência
CD133	pAb	12	1/150	GeneTex	GTX1022109 Texas,EUA
Wnt	pAb	40	Pronto a usar	Spring biosciences	053034478001 California,EUA
β -catenina	p120	4	Pronto a usar	Ventana medical systems	790-4517 Arizona, EUA

2.3.4.2-Avaliação dos níveis proteicos (LRP6, pLRP6, β -catenina, Axin1, Naked1 e CD133) na linha celular

O *western blot* é uma técnica que permite separar e identificar proteínas de acordo com o seu peso molecular. É composto por três etapas principais: separação por tamanho, transferência para um suporte sólido e marcação por anticorpo primário e secundário de interesse (176).

Para realizar este ensaio plaquearam-se $0,3 \times 10^6$ células por poço numa placa de 6 poços (SPL *life sciences*) com um volume final de dois mililitros para os diferentes tratamentos, radioterapia e quimioterapia, para as condições controlo, IC₂₀, IC₅₀, 2 Gy, 3 Gy em duplicado. Para a condição IC₈₀ e 10 Gy plaquearam-se $0,6 \times 10^6$ células por mililitro em frascos de 25 cm² em triplicado perfazendo o volume final de quatro mililitros. Cada experiência foi realizada de forma independente 4 vezes.

Na quimioterapia após 24 horas das células serem plaqueadas, as placas e os frascos foram incubados com as respetivas concentrações de cisplatina correspondendo ao IC₂₀, ao IC₅₀ e ao IC₈₀. Após um período de exposição (48 horas) aos tratamentos (radioterapia e quimioterapia) obtiveram-se os extratos proteicos.

O protocolo iniciou-se por remover o meio de cultura das respetivas condições, de seguida lavaram-se os poços e frascos com um mililitro de PBS (1 \times) a 4°C. Após remover o PBS, efetuou-se a lise com 200 μ L de tampão de Laemmli 1 \times constituído por 3,13 mM de Tris-HCl (Nzytech MB01610), 54 mM de glicerol (Sigma G9891), 17,3 mM de dodecil sulfato de sódio (do inglês, *sodium dodecil sulfate*, SDS, Nzytech, MB18101), 1,6 mM de β -mercaptoetanol (Sigma M6250) e 0,037 mM de azul de bromofenol (Sigma B8026-5G). Com o auxílio de um raspador soltaram-se as células do poço e do frasco, que foram transferidas para um *ependorff* e centrifugadas (centrífuga, Sigma 3-16K) a 14 000 rpm durante vinte minutos a 4°C. De seguida transferiram-se os sobrenadantes para *ependorfs* previamente identificados e foram armazenados a -20°C até ao momento de utilização. Antes da utilização, as amostras foram sonicadas (sonics vibra cell) durante 5 segundos e aquecidas durante 5 minutos em banho-maria a 100 °C. Aos poços adicionaram-se 20 μ L de condição, normalizando-se o volume com o controlo de carga usado (calnexina, *sigen* AB0037).

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

2.3.4.2.1-Preparação dos géis

Utilizou-se o gel de migração (*resolving gel*) a 8% constituído por 0,75 mM de Tris-HCl, SDS a 0,2%, pH=8,8 em que se adicionaram 1120 mM de acrilamida (Grisp Gb 16.4029), 33 mM de persulfato de amónia (APS, Honeyweel 248614-100G) e 4,2 mM tetrametiletilenodiamina (TEMED, Nzytech MB03501). O gel de migração foi colocado no suporte de 1 mm de espessura (*Biorad*). Após polimerização, adicionou-se o *stacking gel* constituído por 0,25 M de Tris, SDS a 0,2%, pH=6,8, em que se adicionaram previamente 645 mM de acrilamida, 2,69 mM de APS e 9,1 mM de TEMED.

Posteriormente, após polimerização do *stacking gel*, removeram-se os pentes e carregaram-se os poços com o marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Standard*, Biorad) e as respetivas amostras. De seguida, realizou-se a corrida da eletroforese vertical para separar as proteínas consoante o peso molecular com o tampão de corrida (125 mM de Tris-base, 480 mM de glicina, SDS a 1%, pH=8,8) a 60 V durante trinta minutos e posteriormente a 120 V. Posteriormente, as membranas de *polyvinylidene fluoride* (PVDF) foram ativadas passando sucessivamente por metanol, H₂O-miliQ e tampão de transferência (50 mM de CAPS, NaOH a 2%, metanol a 10%, pH=11). A transferência das amostras do gel para as membranas foi realizada com o auxílio do *Biorad Trans-Bolt[®] Cell* durante 1 hora e meia a 250 mA até 120 V com tampão de transferência. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com albumina sérica bovina (do inglês, *bovine serum albumin*, BSA, Sigma) a 5% durante duas horas. De seguida, foram incubadas com os anticorpos primários de interesse, LRP6 total, LRP6 fosforilado (pLRP6), Naked1, Axin1 (Wnt Signaling Antibody Sampler Kit #2915; Cell signaling), CD133 (GTX1022109), calnexina (AB0037, *sicgen*) diluídos a 1:1000 em tampão TBS Tween (250 mM de Tris, 1,5 mM de NaCl, Tween20 a 1%, pH=7,6 suplementada com 5% soro bovino fetal) durante a noite. Posteriormente, foram lavadas em tampão TBSTween a 0,5% durante 1 hora em agitação constante para se remover o excesso de anticorpos. Após a lavagem as membranas foram incubadas com o respetivo anticorpo secundário (anti-rabbit, Cell signalling; anti-goat 611620 *Invitrogen* 1:5000) durante 2 horas. Novamente as membranas foram lavadas com TBSTween a 0,5% durante duas horas em agitação constante. A leitura das membranas foi realizada no equipamento *versadoc system Biorad* e a quantificação foi efetuada com recurso ao programa *Imagequant5.0*.

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

2.4-Análise estatística

O tratamento estatístico foi efetuado com o *software* IBM SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) v. 22.0.

A análise da normalidade foi realizada com o teste de Shapiro-Wilk. No caso de comparação entre médias de dois grupos independentes foi usado o teste de *U-Mann-Witney*. Os gráficos foram gerados pelo GraphPad Prism versão 6.01.

Para a comparação entre mais de dois grupos utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis e nas comparações múltiplas considerou-se a correção de Bonferroni.

Todos os cálculos tiveram em conta um nível de significância de 0,05.

As curvas de dose-resposta para o estudo da citotoxicidade foram obtidas com recurso ao *software* OriginPro (modelo “DoseResp”). Relativamente ao ensaio clonogénico as curvas foram obtidas de acordo com o modelo linear quadrático ($SF = e^{-\alpha D - \beta D^2}$).

3-Resultados

As terapêuticas convencionais utilizadas no tratamento do cancro do colo do útero, estão associadas a uma toxicidade e resistência notável (51,65,104). A realização desta dissertação teve como principal objetivo avaliar a expressão da CD133, da Wnt, da β -catenina e outras proteínas envolvidas na via Wnt/ β -catenina (LRP6, pLRP6, Naked1 e Axin1), após a exposição à radioterapia e ao tratamento com cisplatina, na tentativa de perceber se estas proteínas poderão ser utilizadas como alvo direto no tratamento desta neoplasia, para minimizar a toxicidade e a resistência. E ainda, como objetivo secundário pretendeu-se perceber se a alteração da expressão da CD133 irá interferir com a expressão da β -catenina. Desta forma, após a obtenção da IC_{50} e da DL_{50} utilizaram-se concentrações e doses de radiação superiores, iguais e inferiores àqueles valores, isto é, concentrações correspondentes à IC_{80} , à IC_{50} e à IC_{20} e doses de 10 Gy, de DL_{50} (3 Gy) e de 2 Gy após um período de incubação de 48 horas. Estas concentrações e doses foram utilizadas para avaliar a morte celular, a distribuição das células pelo ciclo celular, a produção de espécies reativas de oxigénio assim como a situação das defesas antioxidantes através da expressão de GSH. Os resultados da morte celular, avaliados pela citometria de fluxo, foram corroborados com a coloração de *May-Grünwald-Giemsa*. Posteriormente, com o intuito de avaliar a expressão das proteínas CD133, Wnt, β -catenina, LRP6, pLRP6, Axin1 e Naked1

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

após os diferentes tratamentos (radioterapia e quimioterapia) realizaram-se os ensaios de *western blot* e de imunocitoquímica. Os resultados apresentados na secção dos efeitos da cisplatina na linha celular HeLa (análise da proliferação, viabilidade e morte celulares, ciclo celular, stresse oxidativo e espécies reativas de oxigénio) e efeitos da radiação na linha celular HeLa (sobrevivência, viabilidade e morte celulares e stresse oxidativo e espécies reativas de oxigénio), são resultados partilhados com os trabalhos conferentes ao grau de mestre da Adriana Duarte, do André Salvada e do Paulo Teixeira realizados na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

3.1-Efeitos da cisplatina na linha celular HeLa

3.1.1-Proliferação celular

Após a exposição da linha celular HeLa à cisplatina com diferentes concentrações e tempos de incubação (24, 48 e 72 horas) foi possível traçar as curvas de proliferação abaixo indicadas (Figura 3.1). Os respetivos valores da IC_{50} e R^2 para os diferentes tratamentos estão representados na tabela 3.1.

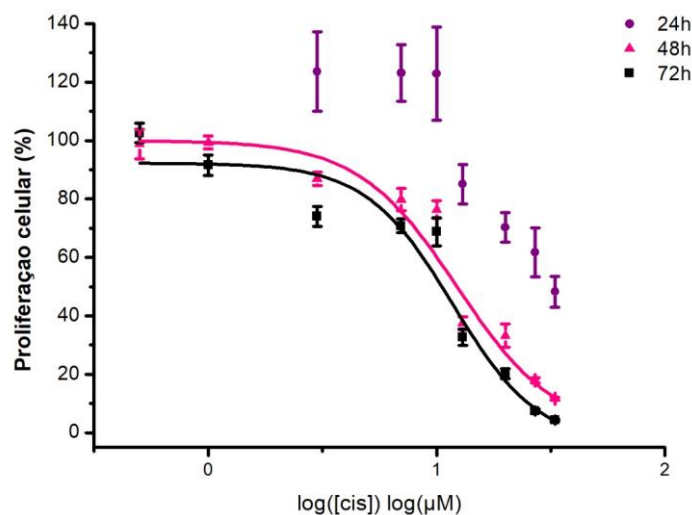


Figura 3. 1: Cisplatina diminui a proliferação celular na linha HeLa com o aumento da concentração e tempo de tratamento. Curvas de proliferação da linha celular HeLa após, 48 e 72 horas de incubação com cisplatina. Os resultados foram obtidos através do ensaio sulforodamina b e estão expressos em percentagem (%) de proliferação celular em função do logaritmo da concentração da cisplatina e expressam a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes. Não foi possível traçar a curva para as 24 horas.

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

Tabela 3. 1: Determinação dos valores IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ para os diferentes tempos de exposição à cisplatina e respetivos valores de R².

	R ²	IC ₂₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	IC ₈₀ (μ M)
48 horas	0,98	6,17 \pm 0,93	12,27 \pm 1,04	24,43 \pm 1,21
72 horas	0,97	5,92 \pm 0,78	10,20 \pm 0,88	17,54 \pm 1,00

*Não foi possível determinar os valores acima representados para as 24 horas após a exposição à cisplatina.

3.1.2- Viabilidade e morte celulares

A cisplatina é um agente quimioterapêutico que induz morte celular por apoptose e por necrose. Desta forma para averiguar o efeito deste fármaco na linha celular HeLa recorreu-se à citometria de fluxo utilizando a dupla marcação com anexina V, acoplada ao fluorocromo FITC, e com iodeto de propídeo. Estes resultados também foram corroborados pela coloração de *May-Grünwald-Giemsa*. Na Figura 3.2 observou-se uma diminuição na percentagem de células viáveis com o aumento da concentração do fármaco. Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas na condição IC₂₀ (70,25% \pm 0,7%; p <0,001), IC₅₀ (59,13% \pm 2,32%; p <0,001) e IC₈₀ (37,38% \pm 2,19%; p <0,001) relativamente ao controlo (91,63% \pm 1,25%). Observaram-se ainda diferenças, estatisticamente significativas, entre diferentes condições nomeadamente IC₅₀ (59,13% \pm 2,32%; p <0,01) e IC₈₀ (37,38% \pm 2,19%; p <0,001) relativamente à condição IC₂₀ (70,25% \pm 0,7%) e entre as condições IC₅₀ (59,13% \pm 2,32%; p <0,001) e IC₈₀ (37,38% \pm 2,19%; p <0,001).

Verificaram-se também um aumento da fração celular que se encontra na fase inicial do processo apoptótico aquando do aumento da concentração do fármaco. Observaram-se diferenças estatisticamente significativas (p <0,001) nas condições IC₂₀ (15,63% \pm 0,56%), IC₅₀ (19,50% \pm 0,68%) e IC₈₀ (22,25% \pm 1,62%) quando comparadas com a condição controlo (2,38% \pm 0,42%). Estes dados da citometria de fluxo foram corroborados com a coloração de *May-Grünwald-Giemsa*. Na Figura 3.3 foi possível verificar características de morte por apoptose como a formação de corpos apoptóticos (A) na condição IC₂₀. Na condição IC₅₀ assim como na condição IC₈₀ também se verificou a vacuolização do citoplasma (C). Adicionalmente, também se observou o aumento da percentagem de células em apoptose tardia/necrose com o aumento da concentração da cisplatina. Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas nas condições IC₂₀ (4,75% \pm 0,41%, p <0,05), IC₅₀ (7,25% \pm 0,62%; p <0,001) e IC₈₀ (10,13% \pm 1,11%; p <0,001) quando comparadas com a condição controlo (1,5% \pm 0,22%). Entre

as condições observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$; $p < 0,05$) entre o IC₂₀ (4,75%±0,41%) e o IC₈₀ (9,43%±0,10%) e entre o IC₈₀ (9,43%±0,10%) e o IC₅₀ (7,25%±0,62%) respetivamente.

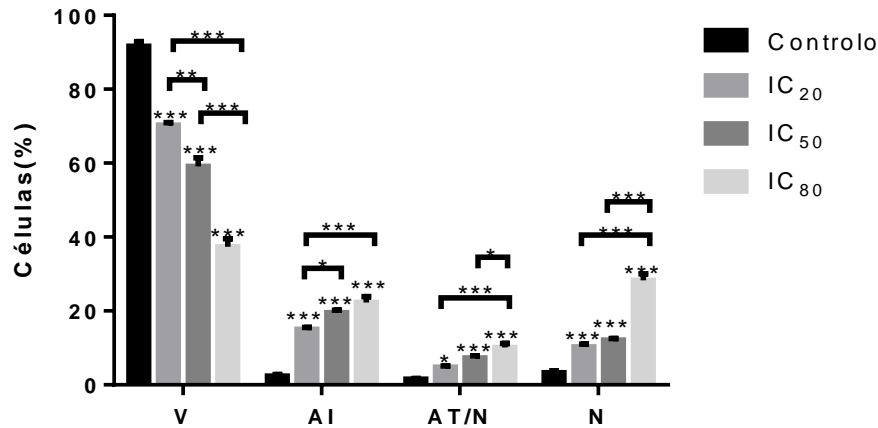


Figura 3. 2: Aumento da concentração de cisplatina diminui a viabilidade celular na linha HeLa. Morte celular da linha HeLa 48 horas após o tratamento com cisplatina. A análise da morte celular realizada com recurso à citometria de fluxo através da dupla marcação com anexina V, acoplada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), e com iodeto de propídeo. O gráfico representa a percentagem de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N) obtida após o tratamento com as concentrações que inibem em 20, 50 e 80 por cento a proliferação celular (IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀) respetivamente. Os resultados foram expressos em média e erro padrão de quatro ensaios independentes. As diferenças estatisticamente significativas foram representadas com * para $p < 0,05$; com ** para $p < 0,01$ e com *** para $p < 0,001$ obtidos através do teste estatístico *Mann-Whitney* calculado considerando a ausência de normalidade da amostra.

A população de células em necrose também aumentou com o aumento da concentração do fármaco, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) nas condições IC₂₀ (10,25%±0,80%), IC₅₀ (12,13%±0,40%) e IC₈₀ (28,25%±1,77%) quando comparadas com a condição controlo (3,25%±0,56%). Entre as condições IC₂₀ (10,25%±0,80%) e IC₈₀ (28,25%±1,77%) observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$). Para além disso foi possível observar diferenças com significado estatístico ($p < 0,001$) entre as condições IC₅₀ (12,13%±0,40%) e IC₈₀ (28,25%±1,77%). A análise morfológica realizada pela coloração de *May-Grünwald-Giemsa* corroborou estes resultados. Na Figura 3.3 foi possível verificar o extravasamento do conteúdo citoplasmático (B) para o meio extracelular patente na condição IC₂₀, na condição IC₅₀ e na condição IC₈₀. Verificou-se que na condição IC₈₀ o extravasamento do conteúdo citoplasmático para o meio extracelular foi maior quando comparado com as outras condições, destacando-se a necrose como o tipo de morte celular predominante nesta condição.

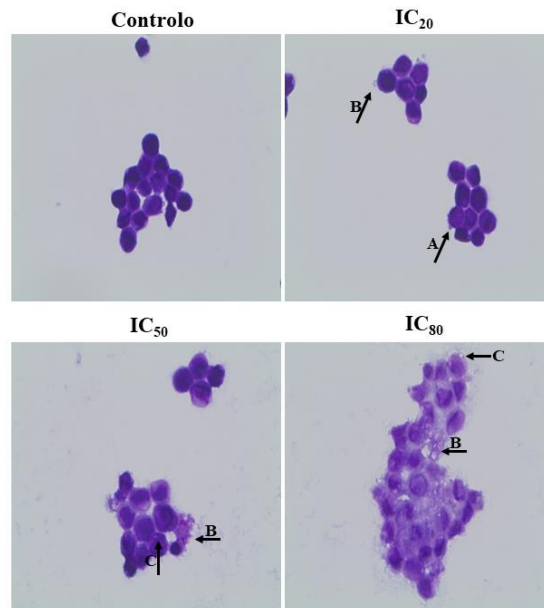


Figura 3. 3: A cisplatina induz o aparecimento de características morfológicas de necrose com o aumento da concentração na linha HeLa. Imagens obtidas após a coloração por *May-Grünwald-Giemsa* com a ampliação 400 \times . As imagens ilustram os resultados obtidos sem à exposição à cisplatina (controlo) e com a exposição durante 48 horas às concentrações inibitórias de cisplatina (IC), que inibem em 20, 50 e 80 por cento a proliferação celular IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ respetivamente. **A-** formação de corpos apoptóticos, **B-** extravasamento do conteúdo citoplasmático e **C-** vacuolização do citoplasma.

3.1.3-Ciclo celular

A cisplatina devido ao seu mecanismo de ação, que se traduz pela formação de aductos, tem a capacidade de induzir a paragem das células em diferentes fases do ciclo celular a fim de promover a reparação do DNA. Devido a esta característica avaliou-se o ciclo celular com recurso a citometria de fluxo utilizando o iodeto de propídeo.

Analisando o ciclo celular (Figura 3.4) verificou-se uma tendência para a diminuição não significativa da percentagem de células na fase pré-G0/G1 com o aumento da concentração do fármaco. Na fase G0/G1 verificou-se uma diminuição da percentagem de células na condição IC₅₀, havendo um posterior aumento na condição IC₈₀. Observou-se ainda, que a maior percentagem de células bloqueadas nesta fase do ciclo celular corresponde à condição controlo. Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) na condição IC₂₀ ($7,13\% \pm 1,51\%$), IC₅₀ ($9\% \pm 1,31\%$) e IC₈₀ ($24,63\% \pm 3,57\%$) quando comparadas com o controlo ($66,88\% \pm 1,01\%$). Observou-se também diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre a condição IC₅₀ ($9\% \pm 1,31\%$) e a condição IC₈₀ ($24,63\% \pm 3,57\%$). O aumento da concentração do fármaco também induz aumento da percentagem de células em fase S, sendo este aumento

mais evidente na condição IC₈₀. Verificaram-se ainda diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) na condição IC₅₀ ($55,88\% \pm 4,90\%$) e na condição IC₈₀ ($63,50\% \pm 4,66\%$) quando comparadas com a condição controlo. Para além disso, também se verificou diferenças com significado estatístico entre as condições IC₂₀ ($33\% \pm 2,51\%$) e IC₅₀ ($55,88\% \pm 4,90\%$) ($p < 0,01$) e entre as condições IC₂₀ ($33\% \pm 2,51\%$) e IC₈₀ ($63,50\% \pm 4,66\%$) ($p < 0,001$). Na fase G2/M verificou-se um aumento da percentagem de células até a condição IC₂₀, diminuindo na condição IC₈₀. Observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) na condição IC₂₀ ($59,88\% \pm 3,96\%$) e na condição IC₅₀ ($35,38\% \pm 5,14\%$) quando comparadas com a condição controlo ($11,63\% \pm 0,84\%$). Também se observou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) quando comparada a condição IC₂₀ ($59,88\% \pm 3,96\%$) com a condição IC₅₀ ($35,38\% \pm 5,14\%$) e com a condição IC₈₀ ($11,88\% \pm 1,26\%$). Entre as condições IC₅₀ ($35,38\% \pm 5,14\%$) e IC₈₀ ($11,88\% \pm 1,26\%$) também se observaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$).

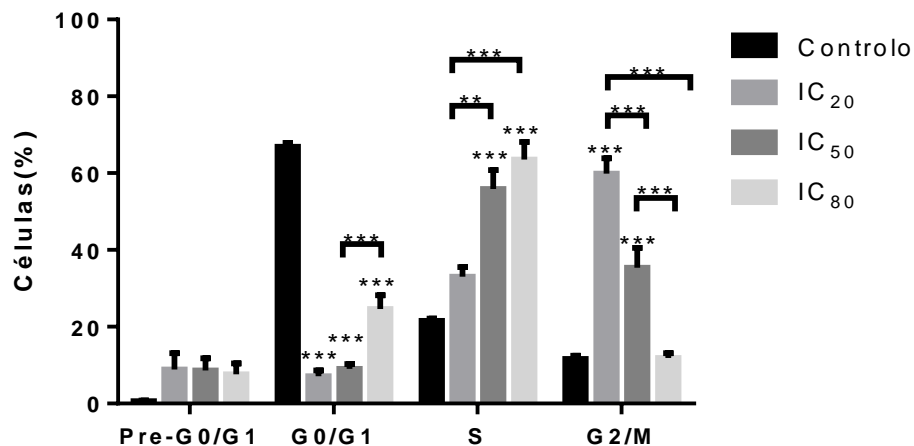


Figura 3. 4: Cisplatina induz a progressão no ciclo celular da linha HeLa. Distribuição em percentagem de células (HeLa) pelas diferentes fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) e pico apoptótico 48 horas após o tratamento com cisplatina. Avaliação realizada com recurso a citometria de fluxo utilizando o iodeto de propídeo com RNase. Os resultados foram expressos em média e erro padrão de quatro ensaios independentes. As concentrações inibitórias (IC), que inibem em 20, 50 e 80 por cento a proliferação celular estão representadas como IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ respetivamente. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas com * para $p < 0,05$; com ** para $p < 0,01$ e com *** para $p < 0,001$ obtidos através do teste estatístico *Mann-Whitney* calculado considerando a ausência de normalidade da amostra.

3.1.4- Stresse oxidativo e espécies reativas de oxigénio

O stresse oxidativo é descrito como um dos principais mecanismos de toxicidade celular provocada pelos fármacos. Desta forma, com o propósito de avaliar o impacto da produção intracelular do radical superóxido, de peróxidos e da defesa antioxidante GSH recorreu-se à

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

citometria de fluxo e para a avaliação do efeito radical hidroxilo utilizou-se o ensaio SRB com e sem o seu inibidor, o manitol.

Na figura 3.5 foi possível observar o aumento da produção intracelular do radical superóxido com o aumento da concentração do fármaco, verificando-se diferenças significativas ($p < 0,001$) entre a condição controlo e as condições IC₂₀ (2,52MIF \pm 0,068MIF), IC₅₀ (2,67MIF \pm 0,15) e IC₈₀ (2,82MIF \pm 0,14MIF). Os valores foram normalizados em relação à condição controlo.

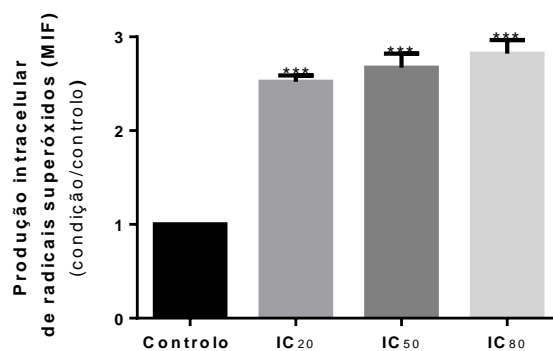


Figura 3.5: Cisplatina induz o aumento da produção intracelular de superóxidos com o aumento da concentração. Produção intracelular de radicais superóxidos na linha celular HeLa, 48 horas após o tratamento com a cisplatina. Análise realizada com recurso à citometria de fluxo através da DHE (dihidroetidina). O gráfico representa a produção intracelular do radical superóxido na condição controlo e 48 horas após o tratamento com as concentrações inibitórias (IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀), que inibem em 20, 50 e 80 por cento a proliferação celular respetivamente. Os resultados foram normalizados em relação ao controlo e os valores referem-se à média \pm erro padrão de quatro ensaios independentes expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF). As diferenças estatisticamente significativas foram representadas com * para $p < 0,05$; com ** para $p < 0,01$ e com *** para $p < 0,001$ obtidos através do teste estatístico *Mann-Whitney* calculado considerando a ausência de normalidade da amostra.

Na figura 3.6 verificou-se um aumento da produção intracelular dos peróxidos na condição IC₂₀, diminuindo a concentração de espécies reativas de oxigénio com o aumento da concentração do fármaco. Observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) entre a condição IC₂₀ (1,68MIF \pm 0,03MIF) e a condição controlo e entre a condição IC₂₀ (1,68 MIF \pm 0,03MIF) quando comparada com a condição IC₈₀ (1,07MIF \pm 0,20MIF).

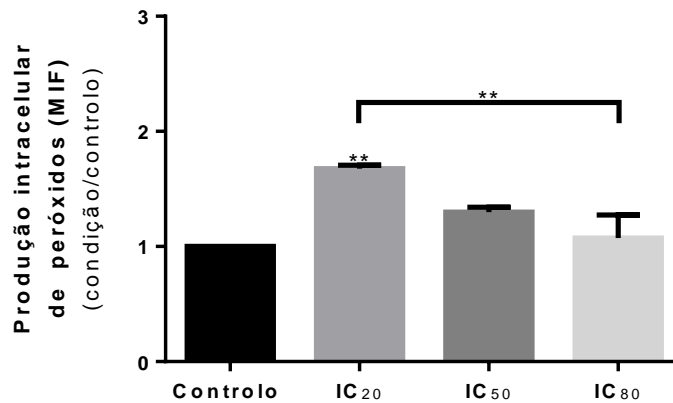


Figura 3. 6: Cisplatina induz a alteração da produção intracelular de peróxidos. Produção intracelular de peróxidos na linha celular HeLa, 48 horas após o tratamento com a cisplatina. A análise foi realizada com recurso à citometria de fluxo através da sonda DCFH2-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceíndiacetato). O gráfico representa a produção intracelular de peróxidos após 48 horas sem tratamento (controlo) e após o tratamento com as concentrações inibitórias (IC), que inibem em 20, 50 e 80 por cento a proliferação celular IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ respetivamente. Os resultados foram normalizados pelo controlo, e os valores referem-se a média±erro padrão de quatro ensaios independentes expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF). As diferenças estatisticamente significativas foram representadas com * para $p<0,05$; com ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$ obtidos através do teste estatístico *Mann-Whitney* calculado considerando a ausência de normalidade da amostra.

Analisando a produção intracelular de glutatona reduzida (Figura 3.7) observou-se aumento da produção intracelular de GSH com o aumento da concentração do fármaco. Verificaram-se diferenças significativas ($p<0,05$) entre a condição IC₂₀ (1,59MIF±0,13MIF) e a condição IC₅₀ (1,64MIF±0,16MIF) quando comparadas com a condição controlo. Os valores foram normalizados em relação à condição controlo.

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

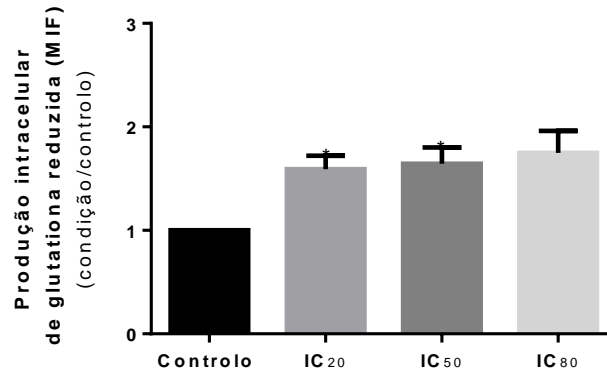


Figura 3. 7: Cisplatina induz o aumento da produção intracelular do glutatona reduzida com aumento da concentração. A análise foi realizada com recurso à citometria de fluxo através do alaranjado de mercúrio. O gráfico representa a produção intracelular de glutatona reduzida após 48 horas sem tratamento (controlo) e após o tratamento com as concentrações inibitórias (IC), que inibem em 20, 50 e 80 por cento a proliferação celular IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ respetivamente. Os resultados foram normalizados pelo controlo, representam a média e erro padrão de quatro ensaios independentes expressos em média de intensidade de fluorescência. As diferenças estatisticamente significativas foram representadas com * para $p < 0,05$; com ** para $p < 0,01$ e com *** para $p < 0,001$ obtidos através do teste estatístico *Mann-Whitney* calculado considerando a ausência de normalidade da amostra.

Na impossibilidade de detetar os níveis do radical hidroxilo de forma direta utilizou-se o seu inibidor, manitol. O tratamento com o manitol induziu um aumento na proliferação celular quando comparado com o tratamento com a cisplatina isolada. Na Figura 3.8 encontram-se os resultados da proliferação celular da linha celular HeLa, 48 horas após o tratamento com cisplatina e com cisplatina associada com manitol (40 mM). Os respetivos valores do R^2 e de IC₅₀ para os diferentes tratamentos estão representados na tabela 3.2.

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

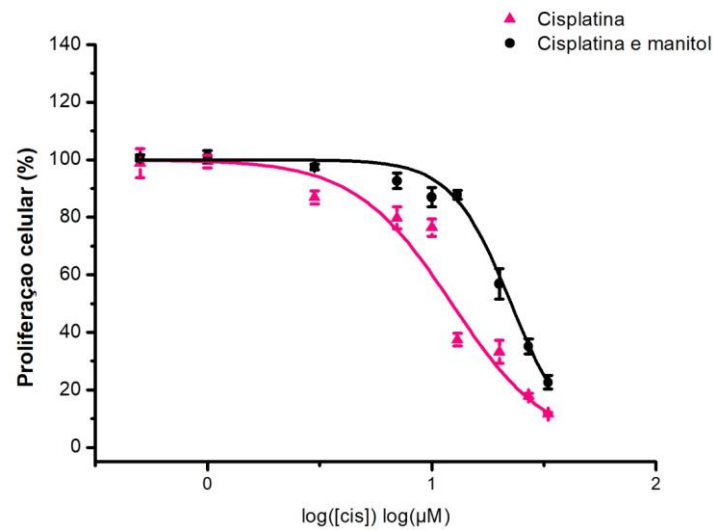


Figura 3. 8: Aumento da proliferação celular na linha HeLa após o tratamento com cisplatina e manitol (40mM). Curvas de proliferação da linha celular HeLa 48 horas após a exposição a cisplatina e a cisplatina com manitol (40mM) obtidos pelo ensaio de sulforodamina B. Os resultados foram expressos em percentagem (%) de proliferação celular em função do logaritmo da concentração da cisplatina e cisplatina com manitol, e expressam a média e o erro padrão de pelo menos quatro experiências independentes em triplicado.

Tabela 3. 2: Determinação do IC₅₀ na linha HeLa 48 horas após o tratamento com cisplatina e com cisplatina associada a manitol (40 mM) e respectivos valores de R².

	R ²	IC ₅₀ (μM)
Cisplatina	0,98	12,27±1,04
Cisplatina e manitol	0,99	22,57±0,71

3.1.5-Avaliação da expressão das proteínas (CD133, Wnt, β -catenina, LRP6, pLRP6, Naked1 e Axin1) após a exposição à cisplatina.

O CD133 tem sido descrito como marcador de células estaminais cancerígenas. Diversos estudos sugerem que a sobreexpressão deste marcador está envolvido na sobrevivência, na invasão, na metastização e na resistência ao tratamento(122,131–133). Para além disso, considera-se que este marcador poderá ser um potencial ativador da via Wnt/ β -catenina. Tendo em conta esta informação, decidiu-se avaliar a expressão deste

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

marcador assim como as demais proteínas da via Wnt/ β -catenina após as diferentes terapêuticas.

Na Figura 3.9 observou-se que a expressão da CD133 na condição IC₂₀ é igual ao controlo, diminui na condição IC₅₀ e aumenta na condição IC₈₀. Os resultados demonstraram a existência de significância estatística ($p=0,04$). Também na Figura 3.9-C, foi possível verificar o mesmo padrão com marcação com o anticorpo anti-CD133 dirigido contra a sequência de aminoácidos 170-430 da proteína *Prominin-1* através da técnica imunocitoquímica.

Verificou-se uma imunomarcação semelhante na condição controlo e IC₂₀ com posterior diminuição da intensidade de marcação na condição IC₅₀. Na condição IC₈₀, observou-se um aumento da expressão deste marcador quando comparado com a condição IC₅₀.

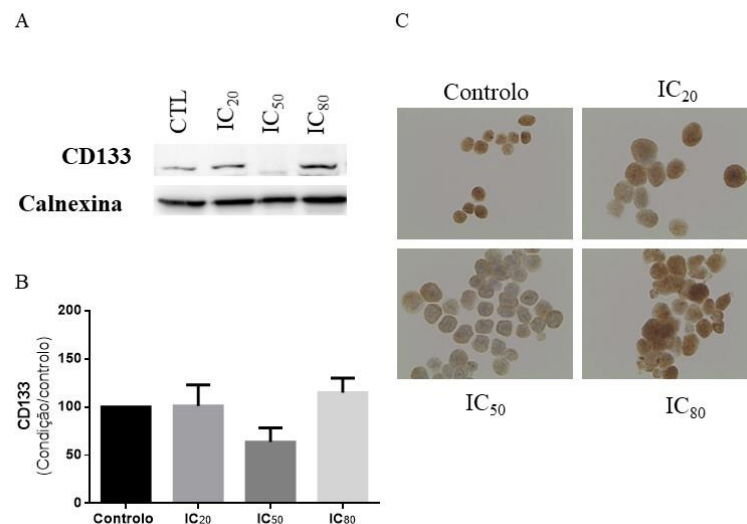


Figura 3. 9: Cisplatina induz a alteração da expressão da CD133 (117 kDa) na linha celular HeLa, 48 horas após o tratamento. A análise foi realizada com recurso ao *western blot* e imunocitoquímica. (A) *Immunoblot* ilustrativo da expressão da CD133 e da calnexina (90 kDa). (B) O gráfico representa os resultados do *western blot*, normalizados em relação ao controlo (CD133/calnexina), expressos em média e erro padrão de pelo menos quatro experiências independentes. (C) Análise da expressão da CD133 por imunocitoquímica com a ampliação a 400 \times . CTL-controlo; IC- concentrações inibitórias (IC), que inibem em 20, 50 e 80 por cento a proliferação celular IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ respetivamente. Os resultados possuem uma significância estatística de $p=0,04$, obtidos através do teste estatístico *Mann-Whitney* calculado considerando a ausência de normalidade da amostra.

Na Figura 3.10 observou-se um aumento da imunomarcação Wnt nas condições IC₂₀ (imagem A) e IC₅₀ (imagem B) relativamente à condição controlo. Enquanto que na condição IC₈₀ (imagem C) verificou-se uma diminuição da imunomarcação.

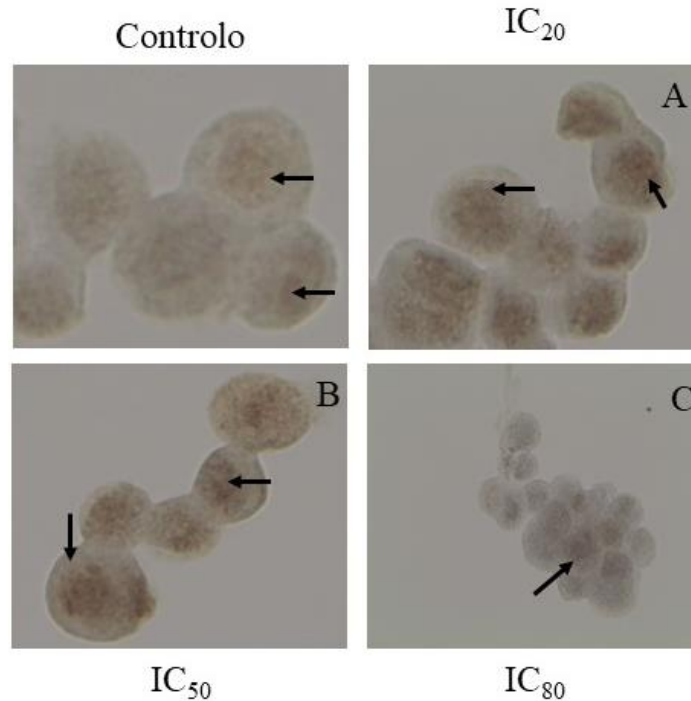


Figura 3. 10: Cisplatina altera a expressão da Wnt na linha celular HeLa. Análise da expressão da Wnt por imunocitoquímica 48 horas após o tratamento com a cisplatina com a ampliação a 400 \times . As imagens ilustram a imunomarcação com o anticorpo Wnt após 48 horas sem tratamento (controlo) e após o tratamento com as concentrações inibitórias (IC), que inibem em 20, 50 e 80 por cento a proliferação celular IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ respetivamente. **A-** condição IC₂₀, aumento da imunomarcação relativamente ao controlo; **B-** condição IC₅₀; aumento da imunomarcação relativamente ao controlo, **C-** condição IC₈₀, diminuição da imunomarcação relativamente ao controlo. As setas indicam a imunomarcação.

Na Figura 3.11 observou-se uma tendência para o aumento da expressão da β -catenina na condição IC₅₀ e diminuição da expressão na condição IC₈₀. Também na Figura 3.11 (imagem C) se observou o mesmo padrão. Observou-se o aumento da intensidade da marcação da β -catenina na condição IC₅₀ e diminuição da intensidade de marcação na maior concentração do fármaco (IC₈₀).

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

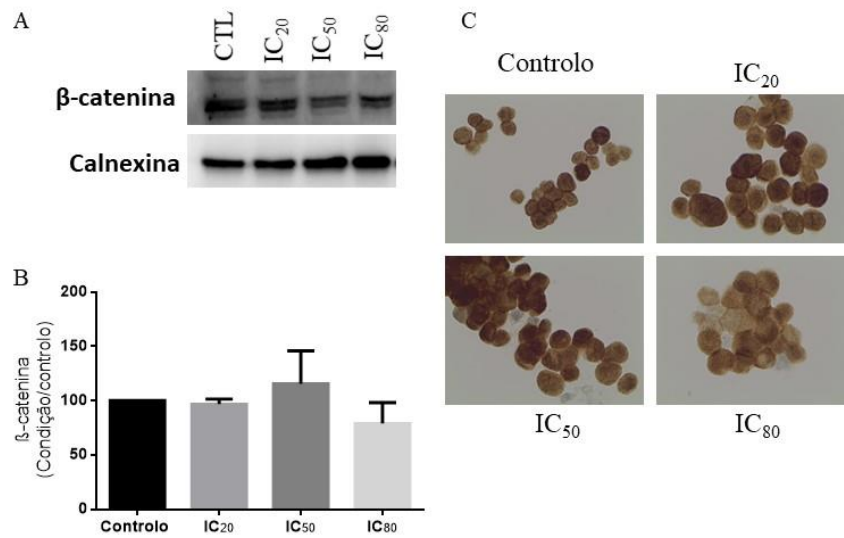


Figura 3. 11: Cisplatina induz a alteração da expressão da β -catenina (92 kDa) na linha celular HeLa, 48 horas após o tratamento. A análise foi realizada com recurso ao *western blot* e imunocitoquímica. (A) *Immunoblot* ilustrativo da expressão da CD133 e calnexina (90 kDa). (B) O gráfico representa os resultados (β -catenina/calnexina), obtidos por *western blot* normalizados pelo controlo expressos em média e erro padrão de três experiências independentes. (C) Análise da expressão da CD133 por imunocitoquímica com a ampliação a 400 \times . CTL-controlo; IC- concentrações inibitórias (IC), que inibem em 20, 50 e 80 por cento a proliferação celular IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ respetivamente. Aplicou-se o teste estatístico *Mann-Whitney* considerando a ausência de normalidade da amostra.

O Wnt ao ligar-se ao recetor FZD e ao co-recetor LRP6 promovendo a fosforilação da LRP6 e posterior recrutamento da Axin, ocorrendo assim a disrupção do complexo de destruição da β -catenina. Além da Axin, a Naked1 também é descrito como um potencial inibidor desta via (138–140,142–147). Desta forma, após o tratamento com a cisplatina avaliou-se a expressão destas proteínas (LRP6, pLRP6, Axin1 e Naked1) na tentativa de perceber de melhor forma a possível influência destas proteínas nesta linha celular.

Na Figura 3.12 verificou-se uma tendência para a diminuição da expressão da LRP6 com o aumento da concentração do fármaco.

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

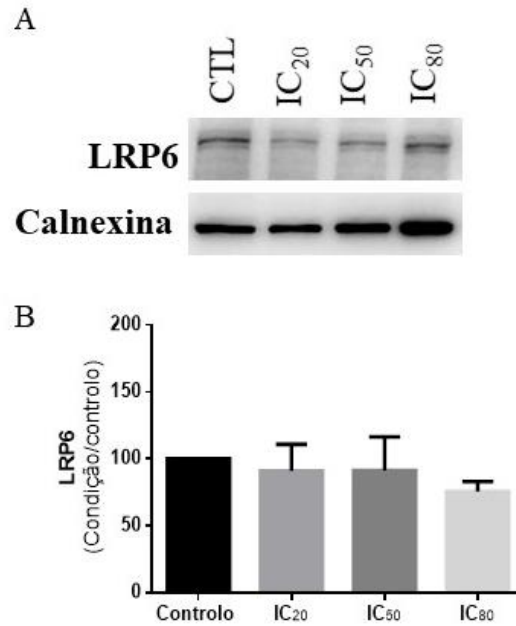


Figura 3. 12: A Cisplatina induz a diminuição da expressão da LRP6 (180,210 kDa) na linha celular HeLa, 48 horas após o tratamento. A análise foi realizada com recurso ao *western blot*. **(A)** *Immunoblot* ilustrativo da expressão da LRP6 e calnexina (90 kDa). **(B)** O gráfico representa os resultados (LRP6/calnexina), obtidos por *western blot* normalizados pelo controlo expressos em média e erro padrão de três experiências independentes com exceção da condição IC₅₀. CTL-controlo; IC-concentrações inibitórias (IC), que inibem em 20, 50 e 80 por cento a proliferação celular IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ respetivamente. Aplicou-se o teste estatístico *Mann-Whitney* considerando a ausência de normalidade da amostra.

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

Na Figura 3.13 observou-se uma tendência para o aumento da expressão do marcador pLRP6 (Ser1490) após o tratamento com a cisplatina.

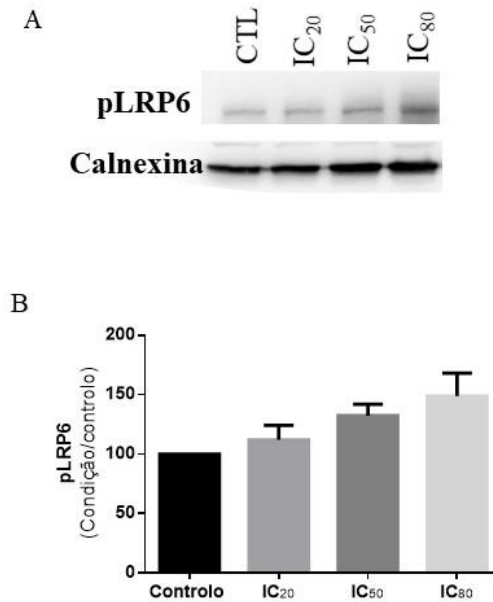


Figura 3. 13: Cisplatina induz o aumento da expressão da pLRP6 (180,210 kDa) na linha celular HeLa, 48 horas após o tratamento. A análise foi realizada com recurso ao *western blot*. (A) *Immunoblot* ilustrativo da expressão da pLRP6 e de calnexina (90 kDa). (B) O gráfico representa os resultados (pLRP6/calnexina), obtidos por *western blot* normalizados pelo controlo expressos em média e erro padrão de quatro experiências independentes. CTL-controlo; IC- concentrações inibitórias (IC), que inibem em 20, 50 e 80 por cento a proliferação celular IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ respetivamente. Aplicou-se o teste estatístico *Mann-Whitney* considerando a ausência de normalidade da amostra.

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

Analisando a expressão da proteína Naked1, verificou-se uma tendência para a sua diminuição com o aumento da concentração do fármaco (Figura 3.14).

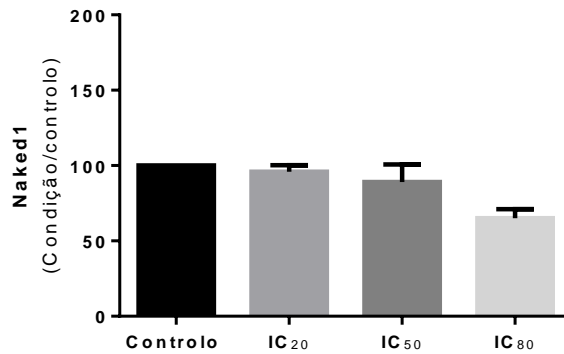


Figura 3. 14: Cisplatina induz a diminuição da expressão da Naked1 (59,61kDa) na linha celular HeLa, 48 horas após o tratamento. A análise foi realizada com recurso ao *western blot*. Os resultados (Naked1/calnexina), normalizados pelo controlo estão expressos em média e erro padrão de duas experiências independentes. CTL-controlo; IC- concentrações inibitórias (IC), que inibem em 20, 50 e 80 por cento a proliferação celular IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ respetivamente. Resultados preliminares.

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

Na Figura 3.15 observou-se uma tendência para a diminuição da expressão da Axin1 com o aumento da concentração do fármaco.

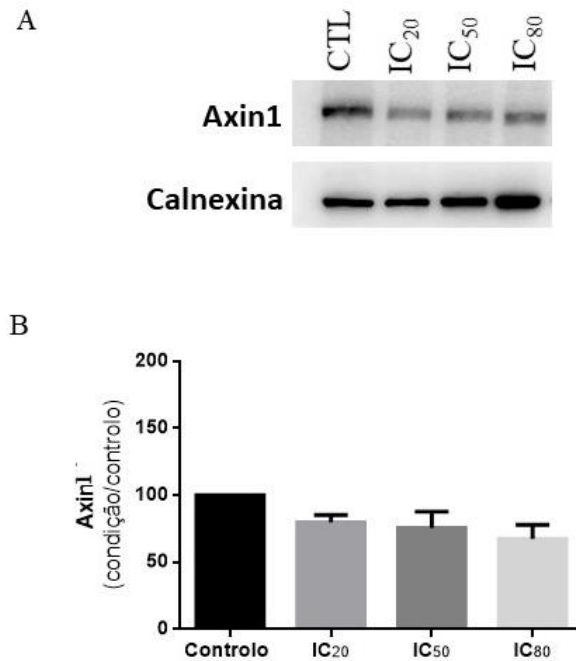


Figura 3. 15: Cisplatina induz a diminuição da expressão da Axin1 (110 kDa) na linha celular HeLa, 48 horas após o tratamento. A análise foi realizada com recurso ao *western blot*. (A) *Immunoblot* ilustrativo da expressão da Axin1 e calnexina (90 kDa). (B) O gráfico representa os resultados (Axin1/calnexina), normalizados pelo controlo expressos em média e erro padrão de pelo menos três experiências independentes com exceção da condição IC₅₀. CTL-controlo; IC- concentrações inibitórias (IC), que inibem em 20, 50 e 80 por cento a proliferação celular IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ respetivamente. Aplicou-se o teste estatístico *Mann-Whitney* considerando a ausência de normalidade da amostra.

3.2-Efeitos da radiação ionizante na linha celular HeLa

3.2.1-Sobrevivência celular

A radiação ionizante é capaz de induzir uma diminuição da capacidade de sobrevivência celular e proliferação da linha HeLa. Após realizar o ensaio clonogénico foi possível traçar a curva dose resposta (Figura 3.16) e determinar a DL_{50} (Tabela 3.3).

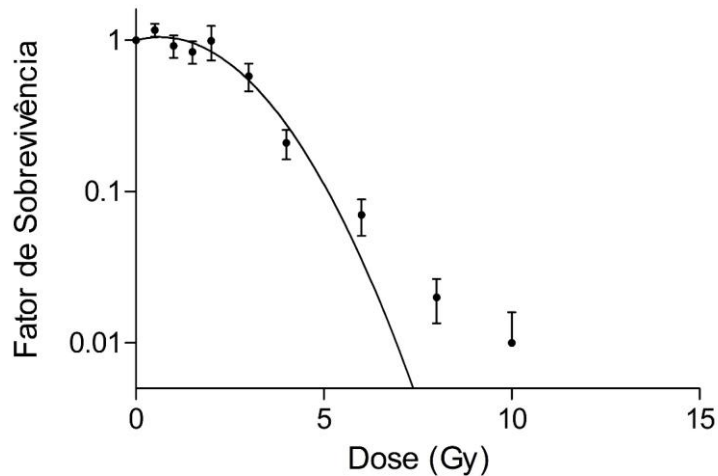


Figura 3. 16: Exposição à radiação-X diminui a sobrevivência da linha celular HeLa com o aumento da dose. Curva de sobrevivência da linha celular HeLa, obtida pelo ensaio clonogénico com pelo menos quatro experiências independentes. Dez dias após a exposição à radioterapia efetuou-se a contagem das colónias, considerando como colónia um grupo com pelo menos 50 células.

Tabela 3. 3: Resultados obtidos com recurso ao modelo linear quadrático para α , β , α/β , DL_{50} e o fator de sobrevivência com a dose de a 2Gy ($F_s(2)$) e respetivo R^2 associado.

α	-
	0,1499
β	0,1174
α/β	-1,28
DL_{50}	3,15
$F_s(2)$	1,02
R^2	0,8996

3.2.2- Viabilidade e morte celular

A radioterapia tem como principal objetivo inibir o potencial proliferativo das células e provocar a morte celular (68,95). Estes processos poderão ocorrer por apoptose, necrose, catástrofe mitótica, indução da senescência e autofagia (68,96).

Desta forma, recorreu-se a citometria de fluxo utilizando a dupla marcação com anexina V, acoplada ao fluorocromo FITC, e com iodeto de propídeo.

Analisando a morte celular, 48 horas após o tratamento com a radioterapia (Figura 3.17), verificou-se que com o aumento da dose houve uma diminuição da percentagem de células viáveis. Observou-se uma redução estatisticamente significativa da viabilidade celular na condição 3 Gy ($82,60\% \pm 1,96\%$; $p < 0,05$) e na condição de 10 Gy ($74,60\% \pm 1,88\%$; $p < 0,001$), quando comparadas com a condição controlo ($90,25\% \pm 0,83\%$). Quanto a diferença entre condições, verificou-se uma diminuição na percentagem de células viáveis, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a condição de 2 Gy ($88,88\% \pm 0,72\%$) e a condição de 3 Gy ($82,60\% \pm 1,96\%$). Entre condição de 2 Gy ($88,88\% \pm 0,72\%$) e a condição de 10 Gy ($74,60\% \pm 1,88\%$) verificou-se uma diminuição da viabilidade celular, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$).

Relativamente à apoptose inicial, verificou-se um aumento da percentagem de células com o aumento da dose. Observaram-se alterações estatisticamente significativas entre a condição de 3 Gy ($5,7\% \pm 0,86\%$; $p < 0,05$) e a condição de 10 Gy ($8,88\% \pm 1,99\%$; $p < 0,01$) quando comparadas com o controlo ($2,31\% \pm 0,37\%$). Entre a condição de 2 Gy ($3,50\% \pm 0,38\%$) e a condição de 10 Gy ($8,88\% \pm 1,99\%$) observou-se um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na percentagem de células em apoptose inicial. Na Figura 3.18 foi possível verificar, pela coloração de *May-Grünwald-Giemsa*, a formação de corpos apoptóticos (A) na condição de 2 Gy.

A análise da percentagem de células em apoptose tardia/necrose revelou que não se verificaram alterações significativas quando comparadas com a condição controlo e entre condições. Verificou-se uma tendência para o aumento na percentagem de células na condição de 3 Gy ($3,50\% \pm 0,65\%$), diminuindo ligeiramente a percentagem de células em apoptose tardia/necrose na condição de 10 Gy ($3,30\% \pm 0,65\%$).

Analisando a percentagem de células em necrose observou-se um aumento com o aumento da dose de radiação, verificando-se um aumento com significado estatístico ($p < 0,01$) na condição de 10 Gy ($13,10\% \pm 1,35\%$) quando comparada com o controlo ($5,69\% \pm 0,85\%$). Entre a condição de 2 Gy ($5,63\% \pm 0,53\%$) e a condição de 10 Gy ($13,10\% \pm 1,35\%$) verificou-se um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,01$). Estes resultados foram corroborados

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

pela coloração de *May-Grünwald-Giemsa*, mostrada na Figura 3.18, onde se observou o extravasamento do conteúdo citoplasmático (B) para o meio extracelular nas condições de 2 Gy, de 3 Gy e de 10 Gy, sendo que na condição 10 Gy verificaram-se características necróticas mais acentuadas.

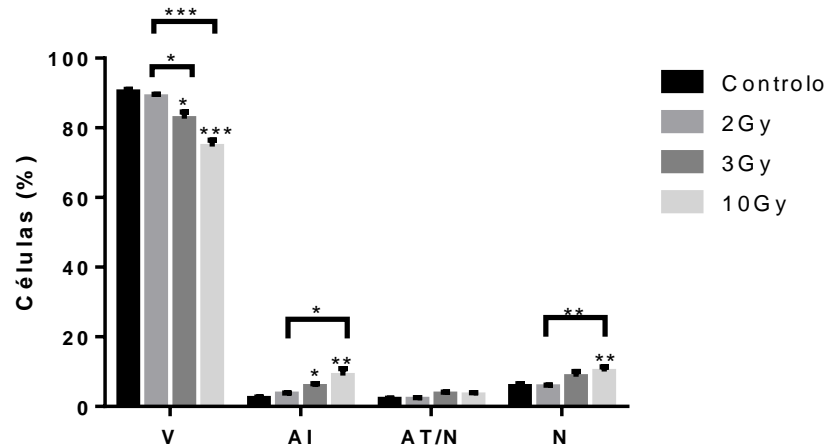


Figura 3.17: Radioterapia diminui a viabilidade celular da linha HeLa, 48 horas após a exposição.

A análise da morte celular foi realizada com recurso à citometria de fluxo através da dupla marcação com anexina V, acoplada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), e com iodeto de propídeo. O gráfico representa a percentagem de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados foram expressos em média e erro padrão de pelo menos cinco ensaios independentes. As diferenças estatisticamente significativas foram representadas com * para $p < 0,05$; com ** para $p < 0,01$ e com *** para $p < 0,001$ obtidos através do teste estatístico *Mann-Whitney* calculado considerando ausência de normalidade da amostra.

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

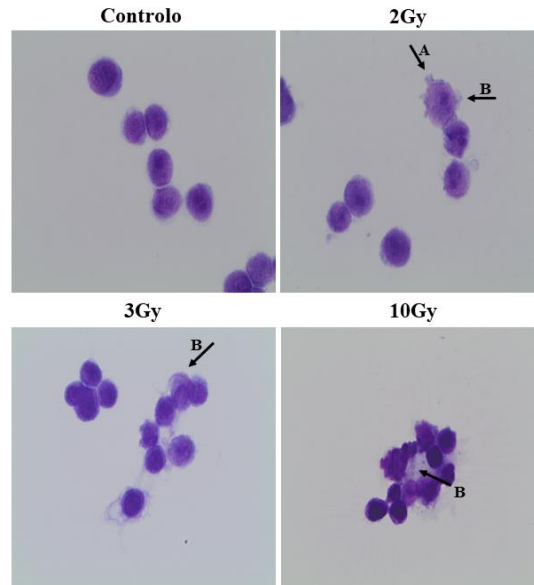


Figura 3.18: Radioterapia induz o predomínio de características morfológicas de necrose com o aumento da dose. As imagens foram obtidas após a coloração por May-Grünwald-Giemsa com a ampliação 400 \times . Os resultados indicam a resposta celular 48h após a exposição à radioterapia (2 Gy, 3 Gy e 10 Gy) e sem exposição (controlo). As letras indicam a formação de corpos apoptóticos (A), extravasamento do conteúdo citoplasmático (B).

3.2.3- Stresse oxidativo e espécies reativas de oxigénio

Um dos principais mecanismos de ação da radioterapia é através da formação de radicais livres originados principalmente da radiólise da água, o que poderá provocar danos no DNA, RNA, proteínas e/ou lípidos. Sendo assim, avaliou-se o impacto desta terapêutica na formação do radical superóxido, dos peróxidos e da produção de defesas antioxidantes nomeadamente a concentração de GSH.

Analisando a produção intracelular de radicais superóxidos, 48 horas após o tratamento com a radioterapia (Figura 3.19), verificou-se um aumento crescente com o aumento da dose. Na condição de 10 Gy ($1,57\text{MIF}\pm 0,057\text{MIF}$) verificou-se uma alteração estatisticamente significativa ($p<0,001$) quando comparada com o controlo. Também se verificaram alterações significativas entre a condição de 2 Gy ($1,17\text{MIF}\pm 0,117\text{MIF}$) e a condição de 10 Gy ($1,57\text{MIF}\pm 0,057\text{MIF}$) ($p<0,01$) e entre a condição de 3 Gy ($1,31\text{MIF}\pm 0,19\text{MIF}$) e a condição de 10 Gy ($1,57\text{MIF}\pm 0,057\text{MIF}$) ($p<0,05$).

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

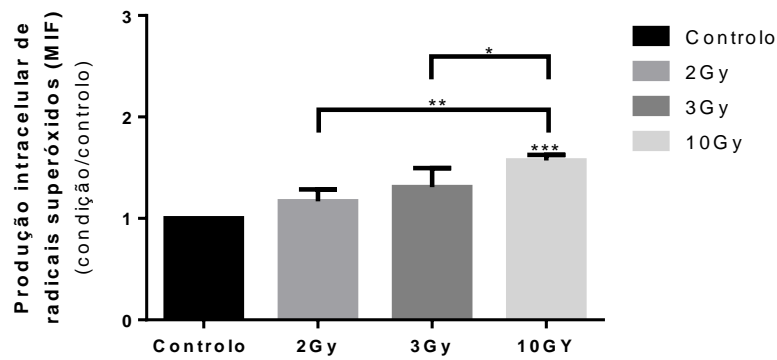


Figura 3.19: Radioterapia aumenta a produção intracelular de radicais superóxidos na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição. A análise foi realizada com recurso à citometria de fluxo através da DHE (dihidroetidina). O gráfico representa a produção intracelular de superóxido após 48 horas sem tratamento (controlo) e após a exposição à radioterapia (2 Gy, 3 Gy e 10 Gy). Os resultados foram normalizados pelo controlo e os valores referem-se a média e erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF). As diferenças estatisticamente significativas foram representadas com * para $p < 0,05$; com ** para $p < 0,01$ e com *** para $p < 0,001$ obtidos através do teste estatístico *Mann-Whitney* calculado considerando ausência de normalidade da amostra.

Relativamente à produção intracelular de peróxidos (Figura 3.20) observou-se um aumento tendencial com o aumento da dose, 2 Gy (1,03MIF \pm 0,60MIF); 3 Gy (1,94MIF \pm 0,62MIF); 10 Gy (2,38MIF \pm 0,55MIF), não se verificando alterações estatisticamente significativas. Os valores foram normalizados em relação à condição controlo.

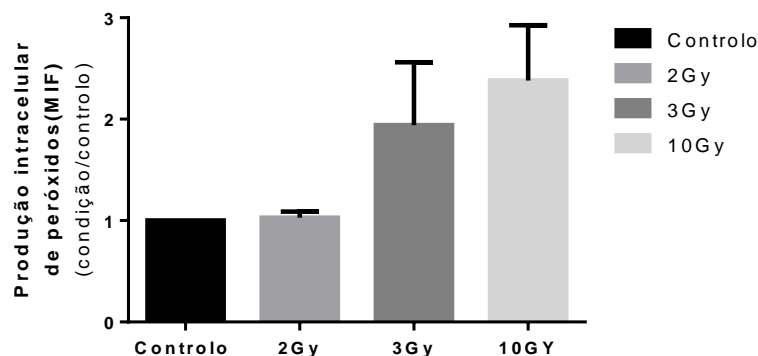


Figura 3.20: Radioterapia aumenta a produção intracelular de peróxidos na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição. A análise foi realizada com recurso à citometria de fluxo através da sonda DCFH2-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceínadiacetato). O gráfico representa a produção intracelular de superóxido após 48 horas sem tratamento (controlo) e após a exposição à radioterapia (2 Gy, 3 Gy e 10 Gy). Os resultados foram normalizados pelo controlo os valores referem-se a média e erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF). As diferenças estatisticamente significativas foram representadas com * para $p < 0,05$; com ** para $p < 0,01$ e com *** para $p < 0,001$ obtidos através do teste estatístico *Mann-Whitney* calculado considerando ausência de normalidade da amostra.

Verificou-se uma diminuição nos níveis da glutathione redutase (Figura 3.21) com o aumento da dose na condição de 3 Gy. No entanto, com a dose de 10 Gy verificou-se um aumento da concentração de glutathione reduzida ao contrário do que se tinha verificado quando se depositaram doses inferiores. Verificaram-se alterações estatisticamente significativas entre a condição de 2 Gy ($0,87\text{MIF}\pm 0,03\text{MIF}$; $p<0,05$) e a condição de 3 Gy ($0,52\text{MIF}\pm 0,042\text{MIF}$, $p<0,01$) quando comparadas com o controlo. Observaram-se diferenças significativas entre a condição de 2 Gy e a condição de 3 Gy ($p<0,001$) e entre a condição de 3 Gy e a condição de 10 Gy ($1,35\text{MIF}\pm 0,15\text{MIF}$) ($p<0,05$). Os resultados foram normalizados relativamente ao controlo.

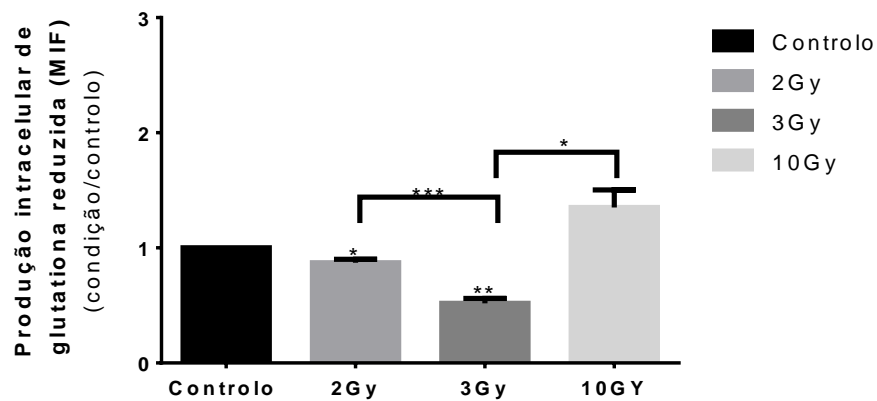


Figura 3. 21: Radioterapia altera a produção intracelular de glutathione reduzida na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição. A análise foi realizada com recurso à citometria de fluxo através do alaranjado de mercúrio. O gráfico representa a produção intracelular de glutathione reduzida após 48 horas sem tratamento (controlo) e após a exposição à radioterapia (2 Gy, 3 Gy e 10 Gy). Os resultados foram normalizados pelo controlo e os valores representam a média e erro padrão de quatro ensaios independentes expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF). As diferenças estatisticamente significativas foram representadas com * para $p<0,05$; com ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$ obtidos através do teste estatístico *Mann-Whitney* calculado considerando ausência de normalidade da amostra.

3.2.4-Avaliação da expressão das proteínas (CD133, Wnt, β -catenina, LRP6, pLRP6, Naked1 e Axin1) após a exposição à cisplatina.

Além de se ter avaliado a expressão da CD133, da Wnt, da β -catenina, da LRP6, da pLRP6, da Naked1 e da Axin1 após o tratamento com a cisplatina, avaliou-se também o efeito da radioterapia na expressão destes marcadores uma vez que o CD133 é considerado um marcador de células estaminais cancerígenas e um possível ativador da via Wnt/ β -

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

catenina que está relacionada com a sobrevivência celular e sobreexpressa em diversos cancros.

Na Figura 3.22 observou-se uma diminuição tendencial na condição de 2 Gy, com aumento na condição de 3 Gy e diminuição na condição de 10 Gy. Foi possível verificar o mesmo padrão com a imunohistoquímica (imagem C). Na condição de 2 Gy verificou-se uma diminuição da intensidade de marcação, havendo um reforço na intensidade de marcação na condição de 3 Gy e uma diminuição na condição de 10 Gy.

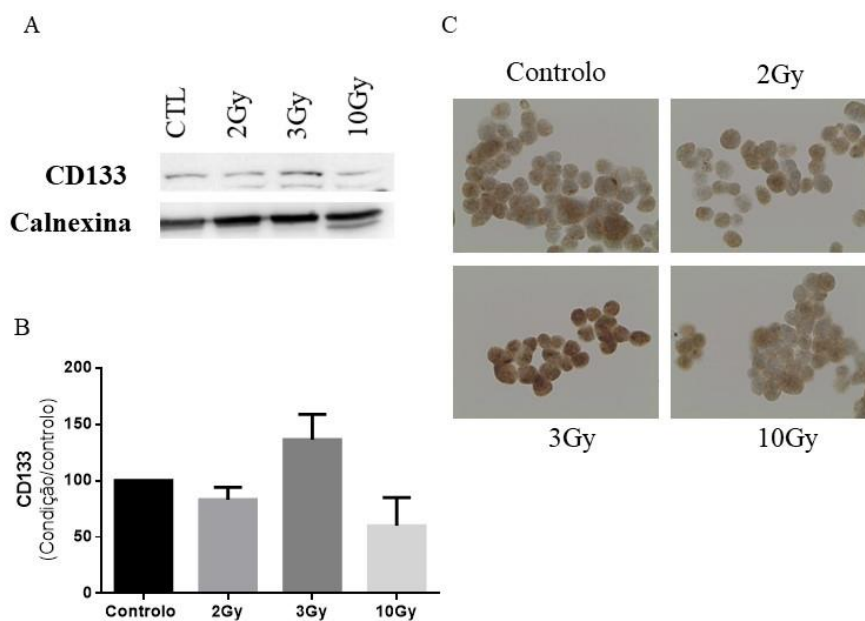


Figura 3.22: Radioterapia altera a expressão da CD133 (117 kDa) na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição. A análise foi realizada com recurso ao *western blot* e imunocitotoquímica. (A) *Immunoblot* ilustrativo da expressão da CD133 e calnexina (90 kDa). (B) O gráfico representa os resultados (CD133/calnexina), normalizados pelo controlo e expressam a média e erro padrão de pelo menos quatro experiências independentes. (C) Análise da expressão da CD133 por imunohistoquímica com a ampliação a 400 \times . CTL-controlo. Aplicou-se o teste estatístico *Mann-Whitney* considerando a ausência de normalidade da amostra.

Relativamente à expressão da Wnt após a exposição à radioterapia, observou-se um aumento da imunomarcagem nas condições expostas à radioterapia (2 Gy, 3 Gy e 10 Gy) quando comparadas com a condição controlo. A imunomarcagem mantém-se relativamente constante nas condições expostas à radioterapia (Figura 3.23).

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

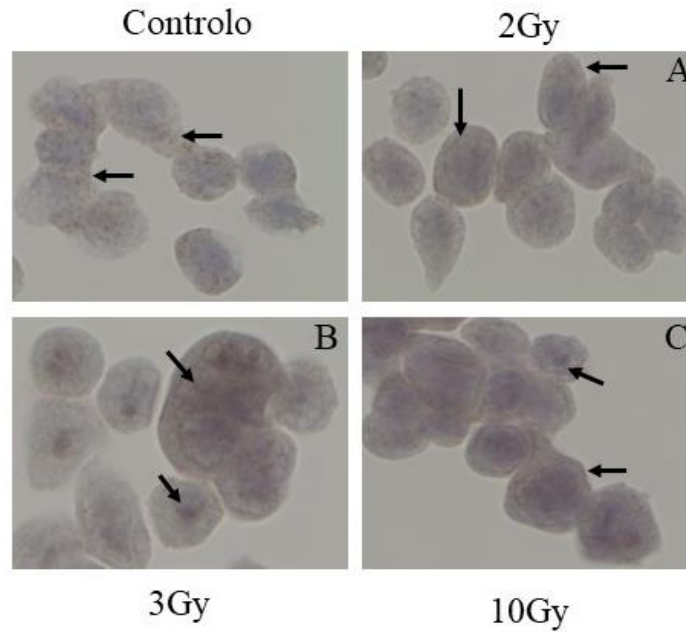


Figura 3.23: Radioterapia induz o aumento da expressão da Wnt nas células HeLa com o aumento da dose. Análise da expressão da Wnt por imunocitoquímica 48 horas após a exposição á radioterapia com a ampliação a 400 \times . **A**-condição 2 Gy, aumento da expressão de Wnt relativamente ao controlo; **B**-condição 3 Gy, aumento da expressão de Wnt relativamente ao controlo; **C**- aumento da expressão de Wnt relativamente ao controlo.

Na Figura 3.24 observou-se uma tendência para a diminuição na expressão da proteína β -catenina com dose de 3 Gy com aumento na condição de 10 Gy. Verificou-se o mesmo padrão com a imunocitoquímica (imagem C), isto é um aumento na intensidade de marcação na condição de 2 Gy, diminuição na intensidade de marcação na condição de 3 Gy e aumento na intensidade de marcação na condição de 10 Gy mas sem diferenças relativamente à condição controlo.

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

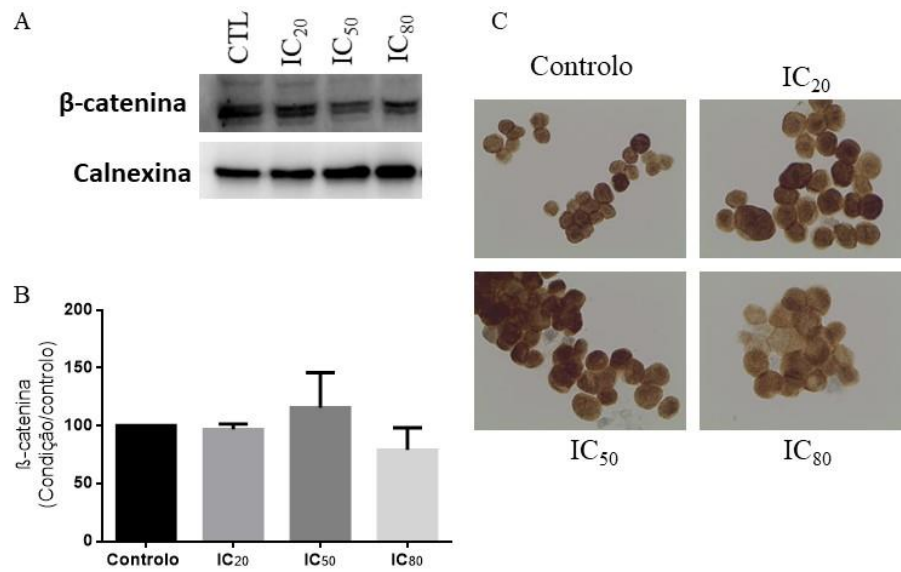


Figura 3.24: Radioterapia altera a expressão da β -catenina na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição. A análise foi realizada com recurso ao *western blot* e imunocitoquímica. **(A)** *Immunoblot* ilustrativo da expressão da CD133 e calnexina (90 kDa). **(B)** O gráfico representa os resultados (β -catenina/calnexina), normalizados ao controlo e expressos em média e erro padrão de pelo menos quatro experiências independentes. **(C)** Análise da expressão da CD133 por imunohistoquímica com a ampliação a 400 \times . Aplicou-se o teste estatístico *Mann-Whitney* considerando a ausência de normalidade da amostra.

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

Na Figura 3.25 verificou-se uma tendência para a diminuição da expressão da LRP6 com o aumento da dose na radioterapia.

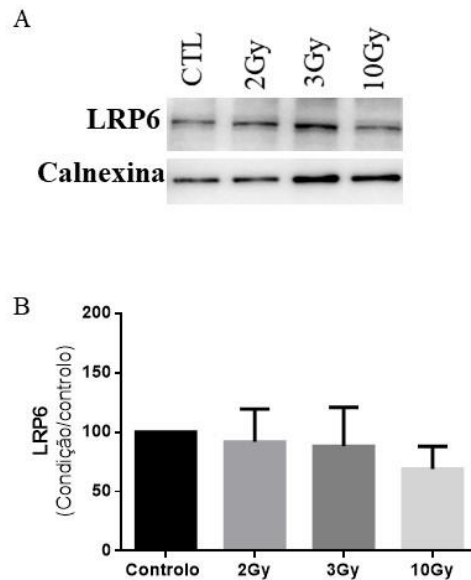


Figura 3.25: Radioterapia diminui a expressão da LRP6 na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição. A análise foi realizada com recurso ao *western blot*. **(A)** *Immunoblot* ilustrativo da expressão da LRP6 e calnexina (90 kDa). **(B)** O gráfico representa os resultados (LRP6/calnexina), normalizados pelo controlo expressos em média e erro padrão de pelo menos três experiências independentes. CTL-controlo. Aplicou-se o teste estatístico *Mann-Whitney* considerando a ausência de normalidade da amostra.

Na Figura 3.26 verificou-se uma tendência para o aumento da expressão da pLRP6 (Ser1490) na condição de 2 Gy e para a diminuição da expressão para as doses mais elevadas de radioterapia.

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

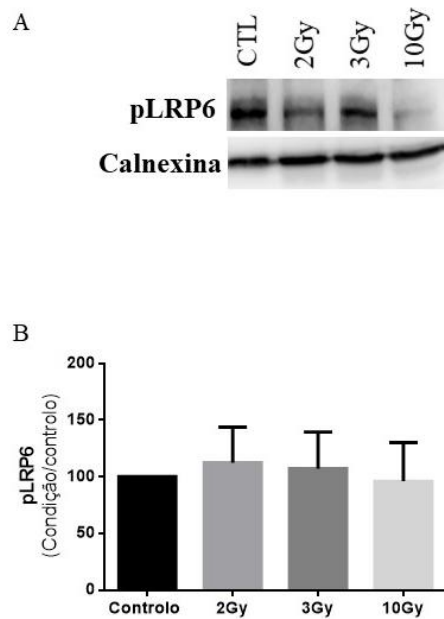


Figura 3.26: Radioterapia altera a expressão da pLRP6 (180,210 kDa) na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição. A análise foi realizada com recurso ao *western blot*. (A) *Immunoblot* ilustrativo da expressão da pLRP6 e calnexina (90 kDa). (B) O gráfico representa os resultados (pLRP6/calnexina), normalizados pelo controlo expressos em média e erro padrão de pelo menos três experiências independentes. Aplicou-se o teste estatístico *Mann-Whitney* considerando a ausência de normalidade da amostra.

Observou-se uma tendência para a diminuição da expressão de Naked1 nas condições de 2 Gy e de 3 Gy e de aumento com a dose de 10 Gy (Figura 3.27).

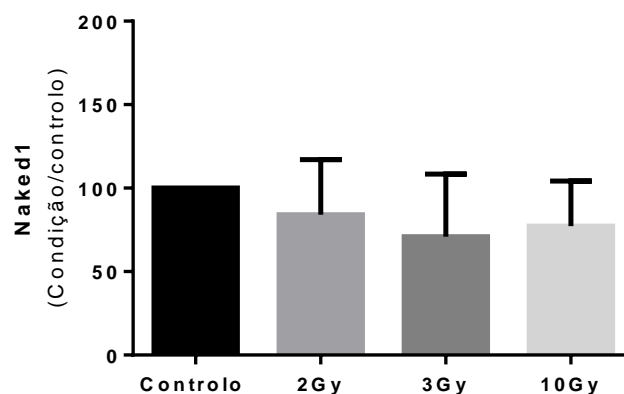


Figura 3.27: Radioterapia diminui a expressão da Naked1 na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição à radioterapia. A análise foi realizada com recurso ao *western blot*. Os resultados (Naked1/calnexina), normalizados pelo controlo estão expressos em média e erro padrão de duas experiências independentes. Resultados preliminares.

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

Relativamente à expressão da Axin1 após o tratamento com a radioterapia, observou-se uma tendência para a diminuição na condição de 2 Gy quando comparada com a condição controlo e posterior aumento da expressão na condição de 3 Gy, e de diminuição da expressão na condição de 10 Gy (Figura 3.28).

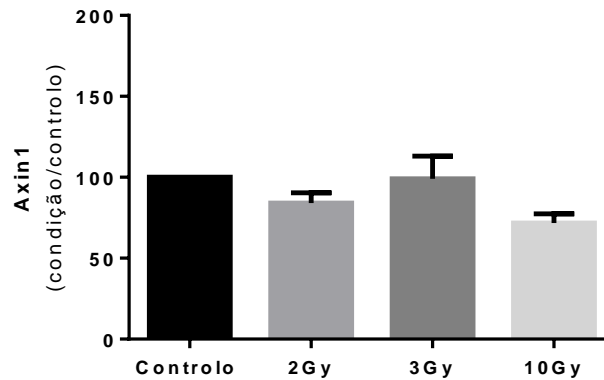


Figura 3.28: Radioterapia altera a expressão da Axin1 na linha celular HeLa, 48 horas após a exposição à radioterapia. A análise foi realizada com recurso ao *western blot*. Os resultados (Axin1/calnexina), foram normalizados pelo controlo estão expressos em média e erro padrão de duas experiências independentes. Resultados preliminares.

4-Discussão

O cancro do colo do útero é o quarto cancro mais comum a nível mundial (3). Em países em desenvolvimento é o segundo cancro mais comum em mulheres e a terceira causa de morte. Na Europa mais de 58000 casos são diagnosticados, e morrem por ano aproximadamente 24000 pessoas (3). Os programas de rastreio do cancro do colo do útero permitem a deteção em estádios precoces e a vacinação contra o HPV permite prevenir o desenvolvimento desta neoplasia. Porém, estes recursos não estão disponíveis em todos os países, principalmente, nos países em desenvolvimento (177). O tratamento desta neoplasia varia com o estágio, sendo que nos estádios avançados os tratamentos aplicados são a quimioterapia e a radioterapia (19). Além da toxicidade provocada por estes tratamentos, outro dos problemas associados a nível clínico é o desenvolvimento de resistência por parte dos doentes (37,49,106).

A presença de células estaminais do cancro está associada muitas vezes à resistência às terapêuticas. Essas células têm a capacidade de auto-renovação e de proliferação (115). As células estaminais do cancro são muito importantes na progressão tumoral porque sustentam a proliferação celular, o crescimento e a metastização (118). Estão descritos na literatura alguns marcadores de células estaminais do cancro como a EpCAM (molécula de adesão de células epiteliais), a ALDH (aldeído desidrogenase), o CD44, o CD133 que nos permitem identifica-las e isola-las das restantes células presentes no ambiente tumoral (115,178–180). O CD133 é um marcador de células estaminais cuja expressão está associada a regeneração, diferenciação, metabolismo e tumorigénese (131). Vários estudos têm demonstrado que a expressão deste marcador está relacionada com a resistência à quimioterapia e à radioterapia, à capacidade invasora das células tumorais e que a sua expressão é um possível indicador de baixa sobrevida (122,134,181). Verificou-se ainda que a CD133 é capaz de interagir com a HDAC6 (histona desacetilase 6) e promover a estabilização da β -catenina (136). Por outro lado, também existem trabalhos que associam a diminuição da expressão de CD133 com a diminuição da capacidade de metastização e a localização nuclear da β -catenina (128,137). A via Wnt/ β -catenina está envolvida em diversos processos de desenvolvimento embrionário e homeostasia das células adultas. Relativamente às CSCs a via Wnt/ β -catenina está relacionada com a sua auto-renovação, proliferação e manutenção no nicho tumoral (141,182).

Devido à heterogeneidade tumoral, algumas células conseguem “escapar” ao tratamento (183). A heterogeneidade tumoral pode ser devida a diversos fatores como as alterações genéticas, as alterações epigenéticas e as alterações proteicas (182). Estas alterações poderão ter como consequência o aumento da proliferação celular, a evasão aos supressores tumorais, a

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

angiogénese e a ativação da invasão e da metastização. Contudo, as terapêuticas convencionais não valorizam estas diferenças e os tratamentos desenvolvidos consideram o cancro como uma doença homogénea. Tendo em conta estes fatores, é extremamente importante o desenvolvimento de terapias dirigidas a alvos específico de cada tipo de cancro (183,184).

Posto isto, o **objetivo** deste trabalho foi avaliar a expressão da CD133, Wnt, β -catenina e outras proteínas envolvidas na via Wnt/ β -catenina (LRP6, pLRP6, Naked1 e Axin1) após a exposição à radioterapia e ao tratamento com a cisplatina na tentativa de perceber se estas proteínas poderão ser utilizadas como alvo direto no tratamento, de forma a minimizar a toxicidade. Como objetivo secundário pretendeu-se perceber se a alteração da expressão da CD133 irá interferir com a expressão da β -catenina. Para a realização deste estudo utilizou-se a linha celular HeLa exposta ao tratamento com o fármaco cisplatina e a radiação-X.

De modo a analisar os efeitos da quimioterapia nestas proteínas procedeu-se à análise da proliferação celular, análise do ciclo celular, da viabilidade e morte celulares, das espécies reativas de oxigénio e da defesa antioxidante GSH (glutathiona reduzida).

Os efeitos da quimioterapia na proliferação celular foram avaliados utilizando o ensaio SRB. As células da linha celular HeLa foram tratadas com concentrações crescentes de cisplatina (0,5-33 μ M) durante 24, 48 e 72 horas. Após a realização deste ensaio foi possível obter curvas de dose-resposta e calcular os valores de IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ às 48 e 72 horas. Para as 24 horas não foi possível determinar os valores de IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ uma vez que, mesmo com a concentração mais alta do fármaco (33 μ M), o valor de proliferação celular mínima encontrada foi de 48,29%. Para as 48 horas o valor de IC₂₀ de 6,17 μ M, o valor de IC₅₀ foi de 12,27 μ M e o valor de IC₈₀ foi de 24,43 μ M, enquanto para as 72 horas o valor de IC₂₀ foi de 5,92 μ M, o valor de IC₅₀ foi de 10,20 μ M e o valor de IC₈₀ foi de 17,54 μ M (Tabela 3.1). O efeito da cisplatina na linha HeLa demonstrou ser dependente da concentração do fármaco e do tempo de exposição ao tratamento. Posteriormente, utilizaram-se os valores de IC₂₀, de IC₅₀ e de IC₈₀ obtidos às 48 horas para avaliar a expressão das diferentes proteínas (CD133, Wnt, β -catenina, LRP6, pLRP6, Naked1 e Axin1) que pretendemos estudar.

O ensaio da sulforodamina B (SRB) permite inferir sobre o nível de proliferação celular, na medida em que o corante SRB se liga aos aminoácidos previamente fixados. Desta forma, a quantidade de corante ligado é proporcional à massa celular, ou seja, quanto maior for o número de células maior será a quantidade de corante e maior será a absorvância medida (152–156). A linha celular HeLa é caracterizada por ser uma linha aderente, porém, quando as células morrem ficam em suspensão. Desta forma, neste ensaio antes da utilização do corante

efetuou-se a lavagem dos poços com PBS de modo a eliminar as células mortas, impedindo qualquer interferência destas nos resultados. É no entanto, de notar que as células que estejam em apoptose inicial podem não se ter destacado completamente o que poderá influenciar no resultado proliferativo obtido. Neste contexto seria também interessante realizar o ensaio MTT, (do inglês, *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) para corroborar os resultados obtidos no ensaio SRB. O ensaio MTT baseia-se na formação de cristais de formazano pela redução do sal de tetrazólio presente no MTT pelas células metabolicamente ativas (185). Desta forma, o número de células metabolicamente ativas será proporcional à quantidade de cristais de formazano formados (185).

A nível celular a cisplatina atua a diversos níveis, pois é capaz de promover a paragem no ciclo celular induzindo a formação de espécies reativas de oxigénio e de induzir a morte celular (46,66). Desta forma, com recurso à citometria de fluxo, avaliámos o impacto deste fármaco na distribuição das células pelo ciclo celular, tipos de morte, formação de espécies reativas de oxigénio e da defesa antioxidante GSH. Os dados obtidos para os tipos de morte celular foram seguidamente corroborados pela coloração de *May-Grünwald-Giemsa*.

Nos estudos de viabilidade e de morte celulares (Figura 3.2) verificou-se que a percentagem de células viáveis diminuiu com o aumento da concentração do fármaco acompanhado por um crescente aumento de células em apoptose e em necrose. Observou-se também que, a morte celular provocada por este fármaco na linha HeLa ocorreu por necrose e por apoptose. Analisando a população de células não viáveis, verificou-se uma maior percentagem de células em apoptose nas condições da IC₂₀ e da IC₅₀ enquanto na condição da IC₈₀ há uma maior percentagem de células em necrose (28,25%±1,77%). Os resultados obtidos neste estudo, por citometria de fluxo, foram também corroborados pela coloração de *May-Grünwald-Giemsa* (Figura 3.3): de facto, as imagens mostraram características apoptóticas (vacuolização do citoplasma e formação de corpos apoptóticos) e necróticas (extravasamento do conteúdo citoplasmático para o meio extracelular) em todas as condições, apesar de na condição de IC₈₀ haver um predomínio das características necróticas. Estes resultados vão de encontro aos resultados esperados, ou seja, predomínio da apoptose nas concentrações correspondentes ao IC₂₀ (6,17 μ M) e ao IC₅₀ (12,27 μ M) e predomínio da necrose na concentração correspondente ao IC₈₀ (24,43 μ M). Os valores obtidos evidenciaram o que já se encontra descrito na literatura. Ou seja, que o tipo morte celular induzido por este fármaco depende da concentração do mesmo. Deste modo, as células expostas a menores concentrações de cisplatina apresentaram características apoptóticas enquanto que concentrações mais elevadas

induziram características necróticas (66). Além de avaliar a apoptose e a necrose também seria interessante avaliar a P53, proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas como a BCL-2 e a BAX, caspase-8 e caspase-9 por *western blot*. Esta avaliação permitiria caracterizar de melhor forma a resposta apoptótica face ao tratamento com a cisplatina.

No estudo realizado por Yano *et al.* em que avaliaram a morte celular induzida pela cisplatina em células de uma linha celular de epitélio renal (LLC-PK1) também recorreram à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo e verificaram que a morte celular ocorria tanto por necrose como por apoptose (186). Shino *et al.* verificaram que a exposição contínua (30 μ M, durante 24 horas) das mesmas células à cisplatina aumentava o número de células em apoptose (marcadas por anexina V e *deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*-TUNEL) porém, a exposição transiente a este fármaco (500 μ M, durante 1 hora) não provocava alterações quando comparada com as células não expostas (187). Já no estudo realizado por Lieberthal *et al.* Onde utilizaram o corante *Hoechst* e o homodímero etídeo verificaram que o tipo de morte provocada em células do epitélio renal dependia da concentração do fármaco, isto é, em baixas concentrações de cisplatina a morte celular ocorria por apoptose enquanto que em concentrações aumentadas a morte celular ocorria por necrose (188). Os resultados obtidos por Yano *et al.* e por Lieberthal *et al.* vão ao encontro com os resultados por nós obtidos. No estudo realizado por Shino *et al.* apenas verificaram o aumento de células em apoptose não referindo a necrose. O que poderá ser explicado pelo próprio método utilizado pelos autores (TUNEL e anexina V) que detetam células em apoptose e não em necrose.

Avaliando a distribuição de células pelas diferentes fases do ciclo celular (Figura 3.4) foi possível verificar que a percentagem de células correspondente à fase pré-G0/G1 na condição controlo foi de $0,63\% \pm 0,18\%$ enquanto que nas condições de IC₂₀, de IC₅₀ e de IC₈₀ exibiram uma maior percentagem de células em fase pré-G0/G1. A presença de células na fase pré-G0/G1 nas condições tratadas (IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀) corrobora os resultados referentes ao tipo de morte celular (apoptose) presentes nas condições anteriormente referidas. O iodeto de propídeo com RNase (utilizado como reagente no ciclo celular) tem a capacidade de se ligar de forma estequiométrica ao DNA, pelo que a quantidade de luz emitida é proporcional a quantidade de DNA ligado. A fase pré-G0/G1, devido a fragmentação do DNA e libertação dos corpos apoptóticos, possui menor quantidade de DNA, enquanto as células nas restantes fases (células pré-replicativas (fase G0/G1), replicativas (fase S) e pós-replicativas e mitóticas

(G2/M)) possuem maior quantidade de DNA. Desta forma, a fase pré-G0/G1 correlaciona-se com as células em apoptose (162).

A maior percentagem de células ($66,88\% \pm 1,01\%$) paradas na fase G0/G1 corresponde à condição controlo. Nas concentrações referentes ao IC₅₀, IC₈₀, verificou-se uma maior percentagem de células paradas na fase S ($55,88\% \pm 4,90\%$ e $63,50\% \pm 4,67\%$ respetivamente). Por outro lado, observou-se que a condição de IC₂₀ induziu maior bloqueio ($59,88\% \pm 3,96\%$) na fase G2/M do ciclo celular. Estes resultados poderão ser explicados pelo próprio mecanismo de ação da cisplatina. Este fármaco tem a capacidade de se ligar ao DNA por meio de ligações covalentes sendo mais tóxico em células em replicação do que em células quiescentes, pelo que poderá ter induzido a progressão no ciclo celular de forma a provocar maiores erros a nível do DNA e, conseqüentemente, a morte celular.

Os bloqueios observados pelas diferentes fases do ciclo celular, de acordo com a concentração do fármaco, poderão ser explicados pelos respetivos danos a nível do DNA e a ação dos *check-points* existentes nas diferentes etapas do ciclo celular.

O bloqueio observado com as concentrações correspondentes ao IC₅₀ e ao IC₈₀ na fase S, poderá ser explicado pelo facto dessas concentrações serem elevadas e produzirem danos a nível do DNA, de tal ordem que não as permitiu avançar no ciclo celular. Apesar desses erros, as células conseguiram ultrapassar o *check-point* na fase G1 do ciclo celular, porém, nota-se um bloqueio na fase S. Ao ultrapassar a fase G1, posteriormente poderá ter ocorrido um atraso ou bloqueio na fase S devido a presença de erros que não foram reparados. As células expostas à concentração correspondente à condição IC₂₀ (menor concentração de fármaco) terão ultrapassado os *check-points* anteriores (G1-S), provavelmente, por terem menos erros no DNA. No entanto, não tiveram a capacidade de escapar ao *check-point* na fase G2/M, possivelmente devido à acumulação de erros (189,190). Estes resultados permitem apontar que a cisplatina tem a capacidade de permitir a progressão no ciclo celular. Além disso, indicam que a paragem das células HeLa nas diferentes fases do ciclo celular varia de acordo com a concentração de cisplatina. Para uma melhor perceção destes resultados seria interessante realizar o ensaio cometa que permite avaliar os danos causados no DNA pelas diferentes concentrações do fármaco. O ensaio cometa baseia-se na ligação de um corante com afinidade para o DNA. O DNA que está danificado, durante a migração, forma uma cauda devido à perda da sua estrutura enquanto que o DNA não danificado não migra. Desta forma, o tamanho da cauda será proporcional aos danos no DNA (191,192). Este ensaio permitirá avaliar a proporção de danos causados pela cisplatina.

A análise da expressão de genes envolvidos na regulação dos *check-points* do ciclo celular, por *microarray*, também seria interessante de se realizar, na medida em que permitiria perceber como a cisplatina modela a expressão destes genes e, conseqüentemente, a distribuição das células HeLa pelas diferentes fases do ciclo celular.

No estudo realizado por Schloffer *et al.*, os autores verificaram que o fármaco induzia uma paragem na fase S do ciclo celular após incubar células HeLa S3 com 40 μ M de cisplatina durante 6 horas (193). Velma *et al.* observaram que havia uma acumulação de células na fase pré-G0/G1, S e G2 do ciclo celular após incubar células HL-60 com 1 μ M de cisplatina duante 24 horas (194). O aumento do período de incubação com a mesma concentração de fármaco (1 μ M) induziu uma acumulação de células na fase S e pré-G0/G1. Células tratadas com 2 μ M e 3 μ M de cisplatina mostraram acumulação de células na fase pré-G0/G1. Neste estudo, os autores concluíram que a distribuição das células pelo ciclo celular, após o tratamento com a cisplatina, não depende somente da concentração do fármaco, mas também do tempo de exposição (194). Os resultados obtidos por Schloffer *et al.* e por Velma *et al.* vão de encontro aos resultados por nós obtidos, ou seja, as distribuições das células pelas fases do ciclo dependem da concentração do fármaco, embora não se tenha avaliado a exposição ao longo do tempo.

As espécies reativas de oxigénio como o radical superóxido, o radical hidroxilo ou o peróxido de hidrogénio têm papel importante em funções biológicas como a fagocitose, a produção de energia, o crescimento celular, porém, em excesso são prejudiciais. Para evitar este excesso, os agentes antioxidantes como a SOD (superóxido dimutase), a catalase e o glutathione reduzida desempenham um papel importante (97,98). O radical superóxido é dismutado pela SOD originando o peróxido de hidrogénio que, posteriormente, é decomposto em água e oxigénio pela catalase. O peróxido de hidrogénio também pode ser convertido em água pela ação da GSH, sendo necessário o consumo de duas moléculas de GSH para reduzir uma molécula de peróxido de hidrogénio (98,170). O peróxido de hidrogénio também origina o radical hidroxilo, um dos radicais biologicamente mais reativos (170–173).

Nesta dissertação avaliámos a produção intracelular do radical superóxido, do peróxido de hidrogénio, do radical hidroxilo e da glutathione reduzida. Assim, como esperado, observou-se que o radical superóxido aumentou com o aumento da concentração do fármaco (Figura 3.5). Uma vez que a cisplatina induz a formação de espécies reativas de oxigénio, que provoca danos a nível do DNA, podendo resultar em morte celular, espera-se que a produção de espécies reativas seja tanto maior quanto maior for a concentração do fármaco. Relativamente à

produção intracelular dos peróxidos (Figura 3.6) observou-se que a condição do IC₂₀ exibe uma maior produção intracelular de peróxidos (1,68MIF \pm 0,03MIF). Quanto à GSH, a produção intracelular também aumenta com o aumento da concentração do fármaco (Figura 3.7).

Relativamente à GSH o resultado obtido vai de encontro ao esperado uma vez que um dos mecanismos de ação da cisplatina é através da formação de espécies reativas. O aumento da produção intracelular da GSH poderá ter ocorrido na tentativa de converter o peróxido de hidrogénio em água. Porém, os resultados obtidos para os peróxidos não vão de encontro aos resultados esperados, ou seja, o aumento da produção dos peróxidos com o aumento da concentração da cisplatina. Estes resultados podem ser explicados, uma vez que a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) pode ser oxidada em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) em menor proporção por outras ERO sem ser o peróxido de hidrogénio, o que interferirá na quantidade de peróxidos medidos. Consegue reagir também com os peroxinitritos e as hidroxidases lipídicas (195). Adicionalmente, as espécies reativas de oxigénio possuem uma semi-vida muito curta, podendo-se converter em outras espécies reativas de oxigénio, alterando assim a quantidade final das mesmas (196). Posto isto, a análise da GSH peroxidase (GPx) também seria interessante uma vez que a GSH é oxidada em GSSG (dissulfeto de glutatona) pela ação da GPx utilizando como substrato o peróxido de hidrogénio. Nesta reação, o peróxido de hidrogénio é convertido em água por intermédio da GPx (197). A análise da GPx, uma das principais enzimas responsáveis pela eliminação dos peróxidos permitiria uma melhor compreensão deste processo oxidativo.

Verifica-se ainda que há stresse oxidativo uma vez que é necessário o consumo de duas moléculas de GSH para reduzir uma molécula de peróxido. Por outro lado, o aumento da expressão da GSH pode também indicar um mecanismo de defesa/resistência da célula a este fármaco, uma vez que a cisplatina quando conjugada com a GSH é exportada para fora da célula (72). Sabendo que cerca de 60% da cisplatina se liga à GSH, seria também interessante avaliar o transporte da GSH para fora da célula (198). A GSH é exportada através dos transportadores ABC (do inglês, *ATP - binding cassette*), em especial pelas MRP 1 e 2 (do inglês, *multidrug resistance proteins*) (199). Poder-se-ia inibir estes transportadores e, posteriormente, medir a GSH, comparando os níveis extracelulares pré e pós-inibição dos transportadores.

Relativamente ao anião superóxido não se pode concluir se há ou não stresse oxidativo, uma vez que este resulta do desequilíbrio entre a formação das espécies reativas de oxigénio e a sua remoção. Desta forma, não analisando a SOD, enzima importante no combate desta ERO, nada se pode concluir.

Num estudo realizado por Whang *et al.* onde utilizaram a sonda DHE (dihidroetidina) para avaliar a produção de espécies reativas de oxigénio observaram que, 24 horas após o tratamento de células de uma linha celular do cancro do colon, a expressão das ERO era dependente da concentração da cisplatina, isto é, quanto maior a concentração do fármaco maior os níveis intracelulares de ERO (200). Este estudo está em concordância com os resultados que obtivemos, uma vez que a produção intracelular dos superóxidos aumentou com o aumento da concentração do fármaco. Que *et al.* Observaram, com recurso a marcação com DCFH, aumento das espécies reativas de oxigénio, após tratar com cisplatina células de duas linhas de cancro hepatocelular (201). Este estudo não vai de encontro com os resultados por nós obtidos, uma vez que a produção intracelular dos peróxidos não aumentou com o aumento da concentração do fármaco. O que poderá ser justificado pelo facto das linhas celulares serem diferentes.

Por fim utilizou-se o manitol como neutralizador do radical hidroxilo com o intuito de perceber o efeito do radical hidroxilo na proliferação das células HeLa. Como referido em Ding X *et al.* utilizou-se a concentração de 40 mM de manitol (171) e após 48 horas de incubação, assim como esperado observou-se um aumento de $12,27\mu\text{M} \pm 1,04\mu\text{M}$ para $22,57\mu\text{M} \pm 0,71\mu\text{M}$ no IC_{50} sugerindo que o radical hidroxilo está envolvido na citotoxicidade provocada nas células HeLa (Figura 3.7).

Relativamente à expressão da CD133 observou-se, por *western blot*, que este diminuiu na condição IC_{50} com posterior aumento na condição IC_{80} ($p=0,04$) (Figura 3.9 A). Os resultados foram corroborados pela imunomarcação da CD133 (Figura 3.9 C). Estes resultados não vão de encontro aos resultados esperados. Como a CD133 está associada à resistência à quimioterapia era espectável que a expressão se mantivesse relativamente constante com o aumento da concentração do fármaco ou que a expressão deste marcador aumentasse na tentativa de combater a ação da cisplatina. Porém, estes resultados indicam que a expressão da CD133 se altera com a concentração do fármaco. Este resultado poderá ter sido provocado pela alteração da expressão génica das células HeLa após a exposição à cisplatina, resultando em diferentes expressões proteicas. Neste contexto, a avaliação da expressão por PCR (do inglês, *polymerase chain reaction*) após o tratamento seria também importante permitindo elucidar o comportamento do gene (PROM-1) que codifica para expressão da proteína CD133.

No estudo realizado por Liu Y *et al.* em que células de duas linhas de cancro do pulmão, a H460 e a H661, foram tratadas com diferentes concentrações de cisplatina (1 $\mu\text{M/L}$, 10 $\mu\text{M/L}$ e 2 $\mu\text{M/L}$, 20 $\mu\text{M/L}$ respetivamente) durante 24 horas, os autores observaram um aumento da

expressão génica por PCR e proteica por citometria de fluxo da CD133 (196). Os resultados obtidos neste estudo não possuem o mesmo padrão de expressão proteica quando comparados com os resultados por nós obtidos; como referido anteriormente, a análise da expressão génica nesta dissertação seria muito importante facilitando a compreensão dos diferentes padrões proteicos observados.

Na Figura 3.10 observa-se o aumento da imunomarcação da Wnt (nas condições de IC₂₀ e de IC₅₀) e posterior diminuição relativamente ao controlo na condição IC₈₀. Observa-se que a expressão da β -catenina foi mais elevada na condição de IC₅₀ diminuindo, tendencialmente, na condição de IC₈₀ (Figura 3.11 A). O aumento da expressão da β -catenina na condição de IC₅₀, poderá indicar uma tentativa da célula combater a ação do fármaco, porém em concentrações mais elevadas o fármaco consegue reverter este aumento. A análise da expressão da LRP6 revelou que há uma tendência para a diminuição da expressão desta proteína com o tratamento, sendo que a concentração mais elevada (IC₈₀) do fármaco corresponde a menor expressão desta proteína (Figura 3.12). Na Figura 3.13 é possível observar o aumento tendencial da pLRP6 com o aumento da concentração do fármaco. O diferente padrão de expressão observado entre a proteína total (LRP6) e a proteína fosforilada (pLRP6), poderá ser explicado pelo facto de não se ter realizado análise por *western blot* no mesmo gel, o que poderá expor os diferentes géis a variáveis diferentes que poderão afetar a quantificação. Sendo assim, seria necessário a realização deste ensaio no mesmo gel. Porém, devido ao aumento tendencial da pLRP6, e à diminuição tendencial da Naked1 (figura 3.14, resultados preliminares) e da Axin1 (Figura 3.15), poderá ser expectável haver a localização nuclear da β -catenina. Estudos para confirmar a localização nuclear da β -catenina seriam importantes de se realizar. A β -catenina ao entrar no núcleo consegue-se ligar ao domínio fator de célula T/fator potenciador linfoide (TCF/LEF, do inglês *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) e promover a transcrição de genes alvos. A realização de uma imunoprecipitação permitiria avaliar essa interação.

No tratamento do cancro, a radioterapia constitui uma das principais opções terapêuticas. A escolha desta terapêutica poderá variar com o estágio, tipo de tumor e perfil da população (76). Apesar dos avanços feitos nesta área, a radioterapia não é uma terapia seletiva, afeta também as restantes células adjacentes. Existem relatos de efeitos adversos como a dermatite, a toxicidade hematológica e as alterações do trato gastrointestinal (78,80,81).

Um dos principais objetivos da radioterapia é inibir o potencial proliferativo ou a capacidade clonogénica das células (68). A inibição da capacidade clonogénica pode ser avaliada pelo ensaio clonogénico, o que permite obter informações sobre a radiosensibilidade

celular (67,77). Desta forma, neste estudo, para avaliar o efeito da radioterapia nas células da linha HeLa, avaliou-se a capacidade clonogénica (ensaio clonogénico) 10 dias após a exposição à radioterapia utilizando doses compreendidas entre 0 Gy e 10 Gy. Após a realização desse ensaio foi possível traçar a curva dose-resposta e determinar a DL_{50} (dose letal média) utilizando-se o modelo linear quadrático. Os valores obtidos foram de 3,15 Gy para o DL_{50} , de -0,1499 Gy para o α , de 0,1174 Gy para o β e de 1,02 para o Fator de Sobrevivência (2). A razão α/β foi de -1,28. Este valor não permite inferir sobre a radiosensibilidade da linha, uma vez que valores α/β compreendidos entre 1 e 5 indicam que a linha celular é radio-resistente ou que responde de forma tardia à radioterapia enquanto que valores compreendidos entre 6 e 12 indicam que a linha é radiosensível ou que responde de forma precoce à radioterapia (77). Por se ter obtido um valor de α negativo a razão α/β também foi negativa. O valor de alfa negativo pode ser explicado pelo início da curva em que se verifica o aumento da sobrevivência celular, pois até aos 2 Gy as células HeLa não respondem à radioterapia, o que traduz radiorresistência. Nos estudos posteriores utilizaram-se as doses de 2 Gy, de 3 Gy e de 10 Gy após 48 horas de exposição.

A inibição da capacidade clonogénica poderá ocorrer por apoptose, necrose, catástrofe mitótica, indução da senescência e/ou autofagia (68,96). A nível biológico a radioterapia consegue atuar de forma direta e indireta. Os efeitos diretos resultam da interação direta da radiação com os componentes celulares. O efeito indireto é através da formação de espécies radiculares como as espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio (88,89). Desta forma, analisou-se a morte celular, a produção de espécies reativas de oxigénio (superóxido e peróxidos) e a defesa antioxidante GSH.

Assim como esperado a análise da morte celular, por citometria de fluxo (dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo), revelou uma diminuição da percentagem de células viáveis com o aumento da dose, acompanhado por um aumento de morte celular. Observou-se ainda que há um predomínio da necrose em todas as condições quando comparadas com a apoptose, e estes valores são estatisticamente significativos em células tratadas com a maior dose de radioterapia, ou seja, dose de 10 Gy (Figura 3.17). Estes resultados foram corroborados parcialmente pela coloração de *May-Grünwald-Giemsa*. É possível observar a existência de características apoptóticas e necróticas na condição de 2 Gy, características necróticas na condição de 3 Gy e de 10 Gy (Figura 3.18). A condição de 10 Gy exhibe características necróticas ainda mais acentuadas quando comparada com as restantes condições. Esta diferença pode dever-se à utilização de duas técnicas distintas pois a coloração

por *May-Grünwald-Giemsa* permite observar a morfologia das células enquanto a citometria, com recurso a anexina V e iodeto de propídeo, permite distinguir células viáveis, células em apoptose inicial, células em apoptose tardia/necrose e células em necrose tendo como princípio a ligação da anexina V à fosfatidilserina membranar e o iodeto de propídeo ao DNA (8,9). Pela técnica de *May-Grünwald-Giemsa* pode não ter sido possível detetar características referentes à apoptose inicial por ser uma técnica que se baseia apenas na observação microscópica. Jin X e colaboradores recorreram à citometria de fluxo para analisar a morte celular com recurso a anexina V e iodeto de propídeo após tratar as células HeLa com 0,5 Gy e com 3 Gy. Observaram que com o aumento da dose, ocorria o aumento apoptose (202). Na tentativa de perceber o efeito da radiação-X (0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy, 10 Gy, 12.5 Gy, 15 Gy e 20 Gy) nas células HeLa, Zhao *et al.*, observaram, com recurso à citometria de fluxo (anexina V-FITC e iodeto de propídeo), aumento de células em apoptose com o aumento da dose em diferentes tempos (48 e 72 horas) (203). Os nossos estudos revelaram a mesma tendência, isto é, aumento da percentagem de células em apoptose com o aumento da dose depositada. Porém, os estudos realizados por Jin X *et al.* e por Zhao *et al.* não discriminam a percentagem de células em necrose, assim como também não foi possível encontrar bibliografia que fizesse esta separação.

Os nossos resultados permitem concluir que quanto maior for a dose depositada menos viável se torna a célula e maior é a tendência para ocorrer a morte por necrose. Também seria interessante avaliar a P53, proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas como a BCL-2 e a BAX, caspase-8 e caspase-9 por *western blot* antes e após a exposição à radioterapia de modo a perceber de melhor forma a apoptose.

Relativamente à produção de espécies reativas de oxigénio observou-se um aumento crescente da produção intracelular de radicais superóxidos (Figura 3.19) e um aumento tendencial de peróxidos (Figura 3.20) com o aumento da dose, como expectável. Zhao *et al.* também observaram, com recurso a DHE, aumento de espécies reativas de oxigénio com o aumento da dose (0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy, 10 Gy, 12.5 Gy, 15 Gy e 20 Gy) (204). Este resultado também vai de encontro ao encontrado no nosso estudo, isto é, aumento da produção intracelular de superóxidos com o aumento dose, uma vez que uma das principais formas de atuação da radioterapia é através da formação de espécies reativas que poderão induzir morte celular.

Também era expectável verificar o aumento da expressão da GSH, na tentativa de combater os peróxidos. Porém, o que verificámos no nosso estudo, foi a diminuição significativa da expressão de GSH com a dose de 3 Gy e aumento na condição de 10 Gy (Figura

3.21). A GSH desempenha um papel protetor na radioterapia, uma vez que o aumento da sua expressão está relacionado com a radioresistência, o que poderá ser justificado pela ligação da GSH à P53, impedindo assim, a sua correta função (197). No entanto, existe pelo menos um estudo que descreve a diminuição da expressão da GSH após a radioterapia (205). Krishna e colaboradores observaram em doentes com cancro do colo do útero nos estádios IIB e IIIB expostas à radioterapia, com dose de 35 Gy distribuída em 16 frações durante 4 semanas, houve diminuição da GSH ,após uma única fração de 2Gy de radiação-X, tanto nas amostras sanguíneas como nas amostras tumorais (205). Surpreendentemente, os nossos dados revelam que ocorre a diminuição da expressão com a dose de 3 Gy e o aumento da GSH com a dose de 10 Gy. Este aumento poderá ser justificado como uma tentativa das células HeLa contornarem o efeito da radioterapia. É possível observar ainda em todas as condições a existência de stresse oxidativo, uma vez que é necessário o consumo de duas moléculas de GSH para reduzir uma molécula de peróxido (98). Desta forma, a análise da GPx também seria interessante já que a GSH é oxidada em GSSG pela ação da GSH peroxidase utilizando como substrato o peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio nesta reação é convertido em água por intermédio da GPx (197). A análise da GPx, permitiria compreender de melhor forma este processo oxidativo.

Uma vez que o stresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a formação das espécies reativas de oxigénio e a sua remoção, analisando apenas os superóxidos não se pode concluir se houve ou não stresse oxidativo porque não se avaliou a SOD, enzima importante na transformação do peróxido de hidrogénio em água. Desta forma, seria também importante a análise da SOD neste estudo.

Já existem publicações que relacionam a expressão da CD133 com a resistência à radioterapia e a capacidade de formação de colónias (134). No nosso estudo além de avaliar a expressão da CD133, também analisamos outras proteínas como a β -catenina, a Wnt, a LRP6, a pLRP6, a Naked1 e a Axin1, 48 horas após a exposição à radioterapia (2 Gy, 3 Gy e 10 Gy), na tentativa de perceber como varia a sua expressão após a radioterapia. A expressão da CD133 e de β -catenina foi avaliada simultaneamente por *western blot* e por imunocitoquímica. A expressão da LRP6, da pLRP6, da Naked1 e da Axin1 foi analisada por *western blot* e a expressão da proteína Wnt foi avaliada por imunocitoquímica.

Na Figura 3.22 (A e B) observa-se diminuição da expressão da CD133 na condição de 2 Gy, aumento da expressão na condição de 3 Gy e diminuição na condição de 10 Gy. Estes resultados são também corroborados pela imunocitoquímica (Figura 3.22 C). Era expectável que a expressão da CD133 se mantivesse constante por conferir resistência ao tratamento ou

que aumentasse com o aumento da dose, na tentativa de combater a ação da radioterapia. No estudo realizado por Kurth *et al.* após terem submetido células de duas linhas celulares de cancro de cabeça e pescoço (FaDu e Cal33) a várias frações de 4 Gy verificaram que após 24 horas, a expressão de CD133 aumentou a partir da terceira fração. Em sete dias após a exposição à radioterapia observaram o aumento crescente da expressão de CD133 com a acumulação da dose em todas as linhas. A análise da expressão da CD133 foi feita com recurso à citometria de fluxo (206). No estudo realizado por Cojoc *et al.* submeteram células de linhas do cancro da próstata à radioterapia fracionada (até 7 frações de 2 Gy) e observaram que nas linhas que expressavam ALDH havia um aumento da expressão da CD133 (análise feita com recurso a citometria de fluxo) com o aumento da dose (até à 5 fração). Este estudo foi realizado sete dias após a exposição à radioterapia (207). Estes resultados não vão de encontro dos resultados obtidos com o nosso trabalho uma vez que não se verificou o aumento da expressão da CD133 com o aumento da dose. Porém, é de realçar que os estudos anteriormente mencionados avaliaram a expressão desta proteína com o fracionamento da radioterapia e sete dias após a radioterapia fracionada, o que poderá explicar esta diferença de resultados. Seria então interessante, no nosso estudo, avaliar a expressão da CD133 com a acumulação da dose e mais dias após a exposição (sete dias) assim como avaliar a expressão génica por PCR de forma a perceber o efeito da radiação na expressão deste gene. É de realçar que a expressão mais baixa desta proteína se verifica na condição de 10 Gy. Nota-se ainda que a maior percentagem de morte celular por apoptose também foi na condição de 10 Gy (Figura 3.17). Esta diminuição de expressão da CD133 poderá estar relacionada com a morte celular nesta condição, uma vez que a diminuição da sua expressão pode induzir a apoptose (204).

Relativamente à Wnt observou-se um aumento da sua expressão com o aumento da dose de radiação, quando comparada com a condição controlo, apesar de não se ter verificado diferenças entre as condições (Figura 3.23). Quanto à expressão da β -catenina observou-se uma tendência para o aumento na condição de 2 Gy, diminuição na condição de 3 Gy e aumento na condição de 10 Gy (Figura 3.24 A e B). O aumento da expressão da β -catenina na condição de 2 Gy poderá ser justificado como uma tentativa da célula contrariar os efeitos da radioterapia, uma vez que só se observou a diminuição da sobrevivência na linha celular HeLa após exposição a 2 Gy. A diminuição da expressão da β -catenina na condição de 3 Gy (DL₅₀) poderá indicar que esta dose consegue diminuir a expressão desta proteína. O aumento na condição de 10 Gy poderá indicar uma tentativa das células sobreviventes de reverterem o efeito da radioterapia. Estes resultados são corroborados pela imunomarcação onde se observa o mesmo

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

padrão de expressão da β -catenina (Figura 3.24C). Salienta-se que na condição de 2 Gy se observou uma menor morte celular (Figura 3.17), o que poderá ser justificado pelo aumento da expressão da β -catenina, podendo conferir resistência à terapêutica. Não foi encontrada bibliografia que permitisse discutir os nossos resultados, porém estes resultados sugerem que a exposição a radiação X aumenta a expressão da Wnt e que maiores níveis de β -catenina estão associados a uma menor morte celular associada a apoptose.

Na Figura 3.25 observa-se que há uma tendência para a diminuição da expressão da LRP6 com o aumento da dose de radiação. Na figura 3.26 observa-se também a tendência para a diminuição da expressão da pLRP6 com o aumento da dose de radiação. A diminuição da pLRP6 poderá ser justificada pela diminuição da proteína total. Com a diminuição da pLRP6, era esperado que houvesse diminuição da acumulação nuclear da β -catenina uma vez que a fosforilação da LRP6 (Ser1490) indica a ligação da Wnt ao seu receptor LRP6, o que posteriormente irá induzir a acumulação nuclear da β -catenina (208). Porém, esta avaliação não foi efetuada. Como referido anteriormente, a β -catenina ao entrar no núcleo consegue-se ligar ao domínio do fator da célula T/fator potenciador linfoide (TCF/LEF, do inglês *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) e promover a transcrição de genes alvo. A realização de uma imunoprecipitação permitiria avaliar a interação entre o domínio TCF/LEF e a β -catenina e inferir melhor sobre a localização nuclear da β -catenina.

Os resultados preliminares da Naked1 (Figura 3.27) mostraram uma tendência para diminuição da expressão desta proteína na condição de 3 Gy e aumento na condição de 10 Gy. Na Figura 3.28 observa-se uma tendência para a diminuição da expressão da Axin1 na condição de 2 Gy, aumento na condição de 3 Gy e diminuição na condição de 10 Gy (resultados preliminares). Esta diminuição na expressão dos inibidores da via Wnt/ β -catenina (Naked1 e Axin1) na condição de 2 Gy poderá justificar o aumento da expressão da β -catenina nesta condição. Além disso, a Axin1 induz a fosforilação da P53 promovendo a apoptose o que poderá justificar o menor nível de apoptose observada nesta condição. Na condição de 3 Gy a diminuição da expressão da β -catenina poderá ser justificada com o aumento da expressão da Axin1. Já na condição de 10 Gy observou-se o aumento da expressão da Naked1 mantendo a β -catenina níveis semelhantes à condição controlo. Estes resultados poderão indicar que a expressão da Naked1 e da Axin1 depende da dose de radiação depositada a nível celular, contudo seria necessário um maior número de amostras independentes para melhor avaliar estas proteínas.

No estudo realizado por Han Y *et al.* numa linha de cancro do pulmão (A549), observaram o aumento da expressão da Axin1 e apoptose após a exposição à radiação-X (1 Gy) (209). No entanto, os nossos dados não indicam a existência de um maior nível de apoptose quando se observa maior expressão da Axin1 (3 Gy). Isto poderá ser justificado como referido anteriormente pelo aumento da Naked1 nesta condição. Porém, não foi possível encontrar artigos que avaliassem a expressão da Naked1 após a exposição à radioterapia e que avaliassem também a expressão da Axin1 na mesma linha celular após diferentes doses.

Além da CD133, a avaliação da expressão génica da Wnt, da β -catenina, da LRP6, da pLRP6, da Naked1 e da Axin1 por PCR seria também importante uma vez que permitiria uma melhor compreensão da expressão proteica observada, facilitando perceber o comportamento destas proteínas em resposta à radioterapia e em que medida poderiam ser usadas como alvo no tratamento.

5-Conclusão

O cancro do colo do útero é o quarto cancro mais comum a nível mundial (3). Em 2012 estimaram-se cerca de 528 000 novos casos e cerca de 266 000 mortes em todo o mundo, sendo que cerca de 87% destes valores ocorreriam nas regiões menos desenvolvidas (10). Os tratamentos existentes para esta neoplasia em estádios avançados são a quimioterapia e a radioterapia. Porém, estes tratamentos estão associados a toxicidade e a resistência (19,37,49,106).

A presença de células estaminais do cancro está associada muitas vezes à resistência às terapêuticas (115). O CD133 é um marcador de células estaminais que está associado a resistência à quimioterapia e à radioterapia, à invasão e à baixa sobrevivência (122,134,181). A via Wnt/ β -catenina está envolvida em diversos processos de desenvolvimento embrionário e de homeostasia das células adultas. Em contexto tumorigénico, está relacionada com a manutenção e com a evolução das células estaminais (141).

Devido ao envolvimento da CD133 e da via Wnt/na resistência às terapêuticas e no desenvolvimento tumoral pretendeu-se avaliar a expressão destas proteínas e da LRP6, da pLRP6, da Axin1 e da Naked1 em células do cancro do colo do útero.

Os resultados obtidos nas células da linha HeLa após o tratamento com cisplatina sugerem que o efeito da cisplatina nesta linha dependeu do tempo e da concentração exposta, a morte celular variou de acordo com a concentração da cisplatina e que este fármaco foi capaz de induzir stresse oxidativo. A distribuição das células pelo ciclo celular dependeu da

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

concentração do fármaco, assim como a indução da expressão da CD133. Não se observou correlação entre a expressão da CD133 e a localização nuclear da β -catenina.

Os resultados obtidos na linha celular HeLa após a exposição à radioterapia, revelaram que quanto maior for a dose depositada maior a morte celular. A radioterapia induziu stresse oxidativo nesta linha celular, no entanto, quando se aplicaram doses mais elevadas (10 Gy) ocorreu o aumento da expressão intracelular da GSH na tentativa de compensar a produção intracelular das espécies reativas de oxigénio. Não se observou correlação entre a expressão da CD133 e localização nuclear da β -catenina. Observou-se que o aumento da expressão da β -catenina e a diminuição da expressão da Axin1 poderão levar à apoptose e que os níveis de expressão de inibidores da via Wnt/ β -catenina como a Naked1 e a Axin1 poderão depender da dose aplicada.

Tendo em conta os objetivos propostos neste estudo foi possível verificar que tanto a radioterapia como a quimioterapia induziram alteração da expressão da CD133, da Wnt, da β -catenina, da LRP6, da pLRP6, da Naked1 e da Axin1. Após o tratamento com a cisplatina observou-se aumento da expressão da pLRP6 e diminuição da expressão da Naked1 e da Axin1 com o aumento da concentração do fármaco, o que poderá levar a localização nuclear da β -catenina e induzir a transcrição de genes responsáveis pela sobrevivência e pela proliferação das células tumorais. Estes resultados poderão estar associados à resistência ao tratamento com a cisplatina nos doentes com cancro do colo do útero. Na radioterapia foi possível observar que o aumento da expressão da β -catenina está associada a uma menor morte celular e que a menor expressão da CD133 está associada a maior morte celular.

Desta forma, foi possível alcançar os objetivos propostos, porém não se conseguiu estabelecer uma completa correlação entre as proteínas analisadas. Continua assim a ser necessário o desenvolvimento de mais estudos que permitam perceber esta interação de forma a minimizar o crescimento tumoral, a toxicidade e a resistência.

6- Perspetivas futuras

Com a realização deste trabalho surgiram novas propostas para estudos futuros que poderão permitir esclarecer alguns dos resultados obtidos:

- 1) Isolamento de células que expressam o marcador CD133 nas células da linha HeLa e comparar com células cuja a expressão foi inibida na tentativa de perceber o papel deste marcador face à resposta à quimioterapia e à radioterapia.
- 2) Analisar a expressão nuclear da β -catenina
- 3) Inibir a expressão da Axin1 e da Naked1 na tentativa de perceber como estes marcadores influenciam na proliferação e a sobrevivência das células da linha HeLa.

7-Referências bibliográficas

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in Globocan 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):359–86.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer Statistics*, 2017. *CA a cancer J Clin*. 2017;67(1):7–30.
3. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J. *Global Cancer Statistics*, 2012. *CA a cancer J Clin*. 2015;65(2):87–108.
4. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Znaor A, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: Globocan sources and methods. *Int J Cancer*. 2018;
5. WHO. Portugal. 2014. p. 2.
6. Kahn JA. HPV Vaccination for the Prevention of Cervical Intraepithelial Neoplasia. 2009;271–8.
7. WHO. Human papillomavirus and cervical cancer. Vol. 8, *Reproductive Health Matters*. 2000. p. 190.
8. Joura EA, Leodolter S, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Koutsky LA, et al. Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. *Lancet*. 2007;369(9574):1693–702.
9. Waggoner SE. Cervical cancer. *Lancet*. 2003;361:2217–25.
10. International Agency for Research on Cancer. *Cervical Cancer: Estimated incidence, mortality, and prevalence worldwide in 2012*. 2012. Available from:
11. Bochner, B.H., Hansel, D.E., Efstathiou, J.A., Konety, B., Lee, C.T., Mckiernan, J.M., Plimack, E.R., Reuter, V.E., Sridhar, S., Vikram, R., Stadler WM. *AJCC Cáncer Staging Manual*. eighth. Springer, editor. *AJCC Cancer Staging Manual*. 2017. 758, 759, 760, 763,764 p.
12. Dunne EF, Unger ER, Mcquillan G, Swan DC, Patel SS, Markowitz LE. Prevalence of HPV Infection Among Females in the United States. *Am Med Assoc*. 2015;297(8):813–9.
13. Marth C, Landoni F, Mahner S, McCormack M, Gonzalez-Martin A, Colombo N. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann of Oncology*. 2017;72–83.
14. Zhang S, McNamara M, Batur P. Cervical Cancer Screening: What’s New? Updates for the Busy Clinician. *Am J Med*. 2018;131(6):702.e1-702.e5.
15. Programa Nacional para as Doenças Oncológicas. *Direção Geral da Saúde*. 2017;24.
16. *Doenças Oncológicas em Números*. *Direção Geral da Saúde* 2015;
17. Longworth MS, Laimins L a. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating

- Epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68(2):362–72.
18. Nakano T, Ohno T, Ishikawa H. Current advancement in radiation therapy for uterine cervical cancer. *J Radiat Res.* 2010;51:1–8.
 19. Small W, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, et al. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer.* 2017;123(13):2404–12.
 20. Zheng Z-M, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006;11:2286–302.
 21. Bansal A, Singh M, Rai B. Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. *Int J Appl Basic Med Res.* 2016;6(2):84.
 22. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci.* 2006;110(5):525–41.
 23. Shanmugasundaram S, You J. Targeting persistent human papillomavirus infection. *Viruses.* 2017;9(8).
 24. Avnstorp MB, Jensen RG, Garnæs E, Therkildsen MH, Norrild B, Specht L, et al. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer in Greenland in 1994-2010. *Int J Circumpolar Health.* 2013;72:22386.
 25. Swiecicki PL, Malloy KM, Worden FP. Advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma: Pathogenesis, treatment, and novel therapeutic approaches. *World J Clin Oncol.* 2016;7(1):15–26.
 26. Yim E, Ph D, Park J, Ph D. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res Treat.* 2005;37(6):319–24.
 27. Qian G, Wang D, Magliocca KR, Hu Z, Nannapaneni S, Kim S, et al. ScienceDirect Human papillomavirus oncoprotein E6 upregulates c-Met through p53 downregulation. *Eur J Cancer.* 2016;65:21–32.
 28. Miranda N, Portugal C, Dinis A, Loureiro F, Tavares F, Correia FH, et al. Programa Nacional para as Doenças Oncológicas - Relatório 2014. Direção Geral de Saúde. 2015;1–6.
 29. Basu P, Mittal S, Bhadra Vale D, Chami Kharaji Y. Secondary prevention of cervical cancer. *Clin Obstet Gynaecol.* 2018;47:73–85.
 30. Arbyn M, Castellsagué X, de sanjosé S, Bruni L, Saraiya M, Bray F, et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol.* 2011;22(12):2675–86.
 31. WHO. WHO guidelines for screening and treatment of precancerous lesions for cervical cancer prevention. 2013;
 32. Giuliano AR, Escherich G, Heyman M, Ph D, Silverman LB, Riehm H, et al. Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV infection and disease in males. *N Engl J Med.* 2012;366(15):1371–81.
 33. Joura E., Giuliano AR, Iversen O-E, Moreira ED, Jr. YN, Petersen LK, et al. A 9-Valent HPV Vaccine against Infection and Intraepithelial Neoplasia in Women. *N Engl J Med.* 2015;711–23.
 34. Hu Y, Cai Z-Q, Su X-Y. Concurrent Weekly Cisplatin Versus Triweekly Cisplatin with

- Radiotherapy in the Treatment of Cervical Cancer: A Meta-analysis Result. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2012;13(9):4301–4.
35. Hashemi FA, Akbari EH, Kalaghchi B, Esmati E. Concurrent Chemoradiation with Weekly Gemcitabine and Cisplatin for Locally Advanced Cervical Cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2013;14(9):5385–9.
 36. Koh W-J, Greer BE, Abu-Rustum NR, Apte SM, Campos SM, Cho KR, et al. Cervical Cancer, Version 2.2015. *J Natl Compr Canc Netw.* 2015;13(4):395–404;.
 37. Amable L. Cisplatin Resistance and Opportunities for Precision Medicine. *Pharmacol Res.* 2016;
 38. Shaloam Dasari and Paul Bernard Tchounwou. Cisplatin in cancer therapy : molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2015;5(0):364–78.
 39. Bergamini A, Pisano C, Di Napoli M, Arenare L, Della Pepa C, Tambaro R, et al. Cisplatin can be safely administered to ovarian cancer patients with hypersensitivity to carboplatin. *Gynecol Oncol.* 2017;144(1):72–6.
 40. Sarin N, Engel F, Kalayda G V., Mannewitz M, Cinatl J, Rothweiler F, et al. Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is associated with an abrogation of cisplatin-induced G2/M cell cycle arrest. *PLoS One.* 2017;12(7):1–26.
 41. Inhestern J, Schmalenberg H, Dietz A, Rotter N, Maschmeyer G, Jungehülsing M, et al. A two-arm multicenter phase II trial of one cycle chemoselection split-dose docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil (TPF) induction chemotherapy before two cycles of split TPF followed by curative surgery combined with postoperative radiotherapy in patien. *Oxford Univ Press.* 2017;
 42. Macciò A, Madeddu C. Cisplatin: an old drug with a newfound efficacy – from mechanisms of action to cytotoxicity. *Expert Opin Pharmacother.* 2013;14(13):1839–57.
 43. Rocha CRR, Silva MM, Quinet A, Cabral-neto JB, Menck FMC. DNA repair pathways and cisplatin resistance : an intimate relationship. *Clinics.* 2018;73:e478s.
 44. Peres LAB, Cunha Júnior AD da. Acute nephrotoxicity of cisplatin: Molecular mechanisms. *J Bras Nefrol.* 2013;35(4):332–40.
 45. Brozovic A, Fritz G, Christmann M, Zisowsky J, Jaehde U, Osmak M, et al. Long-term activation of SAPK/JNK, P38 kinase and FAS-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance. *Oncogene.* 2004;112:974–985.
 46. Eastman A. The Mechanism of Action of Cisplatin: From Adducts to Apoptosis, in *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug.* *Chim Acta.* 1999;111–34.
 47. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene.* 2012;31(15):1869–83.
 48. Cancer NCL. *O ncologist.* 2002;1839:16–24.
 49. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: A review. *Am J Med Sci.* 2007;334(2):115–24.
 50. Santos NAG dos, Rodrigues MAC, Santos NMM, Santos AC dos. Cisplatin cytotoxicity

- of auditory cells requires secretions of proinflammatory cytokines via activation of ERK and NF- κ B. *JARO - J Assoc Res Otolaryngol.* 2007;8(3):338–55.
51. Dos Santos NAG, Rodrigues MAC, Martins NM, Dos Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: An update. *Arch Toxicol.* 2012;86(8):1233–50.
 52. Somani SM, Husain K, Whitworth C, Trammell GL, Malafa M, Rybak LP. Dose-dependent protection by lipoic Acid against cisplatin- induced nephrotoxicity in rats : antioxidant defense system. *Pharmacol Toxicol.* 2000;86(5):234–41.
 53. Santos NAG, Bezerra CSC, Martins NM, Santos CC, Bianchi MLP. Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress , redox state unbalance , impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;61:145–55.
 54. Wainford RD, Weaver RJ, Stewart KN, Brown P, Hawksworth GM. Cisplatin nephrotoxicity is mediated by gamma glutamyltranspeptidase, not via a C-S lyase governed biotransformation pathway. *Toxicology.* 2008;249(2–3):184–93.
 55. Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol.* 2003;23(5):460–4.
 56. Morgan KP, Buie LW, Savage SW. The Role of Mannitol as a Nephroprotectant in Patients Receiving Cisplatin Therapy. 2014;46.
 57. Mathias JR, Dodd ME, Walters KB, Yoo SK, Erik A, Huttenlocher A. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. 2010;33(11):1212–7.
 58. Paken J, Govender CD, Pillay M, Sewram V. Cisplatin-Associated Ototoxicity: A Review for the Health Professional. *J Toxicol.* 2016;2016.
 59. Callejo A, Sedó-Cabezón L, Juan Doménech I, Llorens J. Cisplatin-Induced Ototoxicity: Effects, Mechanisms and Protection Strategies. *Toxics.* 2015;3:268–93.
 60. Costa TC, Lopes M, Dos Anjos ACY, Zago MMF. Chemotherapy-induced peripheral neuropathies: An integrative review of the literature. *Rev da Esc Enferm.* 2015;49(2):335–45.
 61. Carozzi VA, Marmiroli P, Cavaletti G. The role of oxidative stress and anti-oxidant treatment in platinum-induced peripheral neurotoxicity. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010;10(7):670–82.
 62. Melli G, Taiana M, Camozzi F, Triolo D, Podini P, Quattrini A, et al. Alpha-lipoic acid prevents mitochondrial damage and neurotoxicity in experimental chemotherapy neuropathy. *Exp Neurol.* 2008;214(2):276–84.
 63. Podratz JL, Knight AM, Ta LE, Staff NP, Gass JM, Genelin K, et al. Cisplatin induced Mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. *Neurobiol Dis.* 2011;41(3):661–8.
 64. Fischer SJ, McDonald ES, Gross L, Windebank AJ. Alterations in cell cycle regulation underlie cisplatin induced apoptosis of dorsal root ganglion neurons in vivo. *Neurobiol Dis.* 2001;8:1027–35.
 65. Zhu H, Luo H, Shen Z, Hu X, Zhu X. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:1885–95.

66. Sancho-Martínez SM, Piedrafita FJ, Cannata-Andía JB, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. Necrotic concentrations of cisplatin activate the apoptotic machinery but inhibit effector caspases and interfere with the execution of apoptosis. *Toxicol Sci.* 2011;122(1):73–85.
67. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;59(4):928–42.
68. Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumor Biol.* 2010;31(4):363–72.
69. Qian X, Wagner S, Ma C, Coordes A, Gekeler J, Klussmann JP, et al. Prognostic significance of ALDH1A1-positive cancer stem cells in patients with locally advanced, metastasized head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014;140(7):1151–8.
70. Casares C, Ramirez-Camacho R, Trinidad A, Roldan A, Jorge E, Garcia-Berrocal JR. Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: Review of physiopathological mechanisms in animal models. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology.* 2012;269(12):2455–9.
71. Marullo R, Werner E, Degtyareva N, Moore B, Altavilla G, Ramalingam SS, et al. Cisplatin induces a mitochondrial-ros response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One.* 2013;8(11):1–15.
72. Tonigold M, Rossmann A, Meinold M, Bette M, Märken M, Henkenius K, et al. A cisplatin-resistant head and neck cancer cell line with cytoplasmic p53(mut) exhibits ATP-binding cassette transporter upregulation and high glutathione levels. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014;140(10):1689–704.
73. Konkimalla VB, Kaina B, Efferth T. Role of Transporter Genes in Cisplatin Resistance. *In Vivo.* 2008;284:279–83.
74. Chao CCK. Enhanced excision repair of DNA damage due to cis-diamminedichloroplatinum(II) in resistant cervix carcinoma HeLa cells. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol.* 1994;268(3):347–55.
75. Brozovic A, Fritz G, Christmann M, Zisowsky J, Jaehde U, Osmak M, et al. Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance. *Int J Cancer.* 2004;112(6):974–85.
76. Isa N. Evidence based radiation oncology with existing technology. *Reports Pract Oncol Radiother.* 2014;19(4):259–66.
77. Charles A. Kelsey, Philip H. Heintz, Daniel J. Sandoval, Gregory D. Chambers, Natalie L. Adolphi KSP. *Radiation Biology of Medical Imaging.* 2013. 86-94 p.
78. Bernier J, Hall EJ, Giaccia A. Radiation oncology: A century of achievements. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(9):737–47.
79. Jaffray DA GM. *Cancer: disease control priorities.* Third Edit. Gelband H, Jha P, Sankaranarayanan R et al, editor. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank; 2015. 247-269 p.
80. Baskar R, Dai J, Wenlong N, Yeo R, Yeoh K-W. Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Front Mol Biosci.* 2014;1:1–9.

81. Longo D. Recent developments in perioperative radiotherapy. *N Engl J Med.* 2017;20(1):377.
82. National Cancer Institute. Disponível em: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos>. Consultado em: 19-06-2018
83. National Cancer Institute. Disponível em :<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/edad>. Consultado em: 19-06-2018
84. American cancer society. Radiation therapy basics. Disponível em: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/radiation/basics.html>. Consultado em: 23-1-2019
85. American cancer society. Systemic Radiation Therapy. Disponível em : <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/radiation/systemic-radiation-therapy.html>. Consultado em: 23-1-2019
86. Belani CP, Wang W, Johnson DH, Wagner H, Schiller J, Veeder M, et al. Phase III study of the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG 2597): Induction chemotherapy followed by either standard thoracic radiotherapy or hyperfractionated accelerated radiotherapy for patients with unresectable stage IIIA and B non-small-cell lu. *J Clin Oncol.* 2005;23(16):3760–7.
87. Brown JM, Carlson DJ, Brenner DJ. The tumor radiobiology of SRS and SBRT: Are more than the 5 Rs involved? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014;88(2):254–62.
88. Elgazzar AH, Kazem N. Biological Effects of Ionizing Radiation. 2010;212–28.
89. Smith L, Qutob O, Watson MB, Beavis AW, Potts D, Welham KJ, et al. Proteomic Identification of Putative Biomarkers of Radiotherapy Resistance: A Possible Role for the 26S Proteasome? *Neoplasia.* 2009;11(11):1194–207.
90. Nix P, Cawkwell L, Patmore H, Greenman J, Stafford N. Bcl-2 expression predicts radiotherapy failure in laryngeal cancer. *Br J Cancer.* 2005;92(12):2185–9.
91. Smith L, Qutob O, Watson MB, Beavis AW, Potts D, Welham KJ, et al. Proteomic Identification of Putative Biomarkers of Radiotherapy Resistance: A Possible Role for the 26S Proteasome? *Neoplasia.* 2009;11(11):1194–207.
92. Marín A, Martín M, Liñán O, Alvarenga F, López M, Fernández L, et al. Bystander effects and radiotherapy. *Reports Pract Oncol Radiother.* 2015;20(1):12–21.
93. Zhang J, Shen L, Sun LQ. The regulation of radiosensitivity by p53 and its acetylation. *Cancer Lett.* 2015;363(2):108–18.
94. Chang-Claude J, Ambrosone CB, Lilla C, Kropp S, Helmbold I, Von Fournier D, et al. Genetic polymorphisms in DNA repair and damage response genes and late normal tissue complications of radiotherapy for breast cancer. *Br J Cancer.* 2009;100(10):1680–6.
95. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K. Cancer and Radiation Therapy : Current Advances and Future Directions. *Int J Med Sci.* 2012;9:193–9.
96. Joiner MC, van der Kogel A. Basic clinical radiobiology. fourth edi. 2009. 30-35 p.

97. Teppo HR, Soini Y, Karihtala P. Reactive Oxygen Species-Mediated Mechanisms of Action of Targeted Cancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.
98. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Oxidative stress relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quim Nova*. 2006;29(1):113–23.
99. Wang J, Yi J. Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is a question. *Cancer Biol Ther*. 2008;7(12):1875–84.
100. Vordermark D. Radiotherapy of Cervical Cancer. *Oncol Res Treat*. 2016;39(9):516–20.
101. Tanderup K, Eifel PJ, Yashar CM, Pötter R, Grigsby PW. Curative radiation therapy for locally advanced cervical cancer: brachytherapy is not optional. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014;88(3):537–9.
102. Han K, Milosevic M, Fyles A, Pintilie M, Viswanathan AN. Trends in the utilization of brachytherapy in cervical cancer in the United States. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013;87(1):111–9.
103. Dusenbery KE, Gerbi BJ. Radiation Therapy for Cervical Cancer. *Technical Basis of Radiation Therapy*. 2011. p. 829–53.
104. Vallard A, Carrillo S, Gamboa O, Molano M, Acosta J, Mayorga D. Biomarkers of resistance to radiation therapy : a prospective study in cervical carcinoma. 2017;1–9.
105. Wieringa HW, Zee AGJ Van Der, Vries EGE De, Vugt MATM Van. Breaking the DNA damage response to improve cervical cancer treatment. *Cancer Treat Rev*. 2016;42:30–40.
106. Huang X, Chen X, Xie X, Zhou Q, Li K, Li S, et al. Co-expression of CD147 and GLUT-1 indicates radiation resistance and poor prognosis in cervical squamous cell carcinoma. 2014;7(4):1651–66.
107. Bachtary B, Schindl M, Dreier B, Knocke TH, Hainfellner JA, Horvat R, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α indicates diminished response to radiotherapy and unfavorable prognosis in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9(June):2234–40.
108. Yu M, Yongzhi H, Chen S, Luo X, Lin Y, Zhou Y. The prognostic value of GLUT1 in cancers : a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(26):43356–67.
109. Dellas K, Bache M, Pigorsch SU, Taubert H, Kappler M, Holzapfel D, et al. Prognostic impact of HIF- 1 α expression in patients with definitive radiotherapy for cervical cancer. 2008;(3):169–74.
110. Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Yamamoto T, Okamoto Y, Sawada K, et al. Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1 under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *J Endocrinol*. 2004;183:145–54.
111. Aponte PM, Caicedo A. Stemness in Cancer: Stem Cells, Cancer Stem Cells, and Their Microenvironment. *Stem Cells Int*. 2017;2017.
112. Martins F, Botelho M, Cabrita A, Freire-de-oliveira C. Uma nova abordagem de cancro baseada na teoria das células estaminais. *Acta Obs Ginecol Port*. 2009;3(1):45–53.
113. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar

- 4;144(5):646–74.
114. Krishnamurthy S, Nör JE. Head and neck cancer stem cells. *J Dent Res*. 2012;91(4):334–40.
 115. Ranji P, Salmani Kesejini T, Saedikhoo S, Alizadeh AM. Targeting cancer stem cell-specific markers and/or associated signaling pathways for overcoming cancer drug resistance. *Tumour Biol*. 2016;37(10):13059–75.
 116. Zhou Y, Kipps TJ, Zhang S. Wnt5a signaling in normal and cancer stem cells. *Stem Cells Int*. 2017;2017.
 117. Motegi A, Fujii S, Zenda S, Arahira S, Tahara M, Hayashi R, et al. Impact of Expression of CD44, a Cancer Stem Cell Marker, on the Treatment Outcomes of Intensity Modulated Radiation Therapy in Patients with Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2016;94(3):461–8.
 118. Aponte PM, Caicedo A. Stemness in cancer: Stem cells, cancer stem cells, and their microenvironment. *Stem Cells Int*. 2017;2017.
 119. Heiler S, Wang Z, Zöller M. Pancreatic cancer stem cell markers and exosomes - The incentive push. *World J Gastroenterol*. 2016;22(26):5971–6007.
 120. Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*. 2016;16(3):225–38.
 121. Wong TL, Che N, Ma S. Reprogramming of Central Carbon Metabolism in Cancer Stem Cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2017;
 122. Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ. A subpopulation of CD133+ cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett*. 2010;289(2):151–60.
 123. Krishnamurthy S, Nör JE. Head and Neck Cancer Stem Cells. *J Dent Res [Internet]*. 2012;91(4):334–40.
 124. Vitale I, Manic G, De Maria R, Kroemer G, Galluzzi L. DNA damage in stem cells. *Mol Cell*. 2017;66(3):306–19.
 125. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756–60.
 126. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(4):275–84.
 127. Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM. WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(2):618–23.
 128. Rappa G, Mercapide J, Anzanello F, Le TT, Johlfs MG, Fiscus RR, et al. Wnt interaction and extracellular release of prominin-1/CD133 in human malignant melanoma cells. *Exp Cell Res*. 2013;319(6):810–9.
 129. Baillie R, Tan ST, Itinteang T. Cancer Stem Cells in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Front Oncol*. 2017;7:112.

130. Zhou L, Wei X, Cheng L, Tian J, Jiang JJ. CD133, One of the Markers of Cancer Stem Cells in Hep-2 Cell Line. *Laryngoscope*. 2007;117(3):455–60.
131. Li Z. CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp Hematol Oncol*. 2013;2(1):17.
132. Chiou S-H, Yu C-C, Huang C-Y, Lin S-C, Liu C-J, Tsai T-H, et al. Positive Correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008 Jul 1;14(13):4085–95.
133. Liu BL, Liu SJ, Baskys A, Cheng H, Han Y, Xie C, et al. Platinum sensitivity and CD133 expression as risk and prognostic predictors of central nervous system metastases in patients with epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2014;14(1):1–12.
134. Wang K, Zeng J, Luo L, Yang J, Chen JIE, Li BIN, et al. Identification of a cancer stem cell - like side population in the HeLa human cervical carcinoma cell line. *Oncoly Lett*. 2013;(12):1673–80.
135. Javed S, Sharma BK, Sood S, Sharma S, Bagga R, Bhattacharyya S, et al. Significance of CD133 positive cells in four novel HPV-16 positive cervical cancer- derived cell lines and biopsies of invasive cervical cancer. *BMC Cancer*. 2018;18:1–12.
136. Mak AB, Nixon AML, Kittanakom S, Stewart JM, Chen GI, Curak J, et al. Regulation of CD133 by HDAC6 Promotes β -Catenin Signaling to Suppress Cancer Cell Differentiation. *Cell Rep*. 2012;2(4):951–63.
137. Rappa G, Fodstad O, Lorico A. The Stem Cell-Associated Antigen CD133 (Prominin-1) Is a Molecular Therapeutic Target for Metastatic Melanoma. *Stem Cells*. 2008;26(12):3008–17.
138. Tai D, Wells K, Arcaroli J, Vanderbilt C, Aisner DL, Messersmith WA, et al. Targeting the WNT Signaling Pathway in Cancer Therapeutics. *Oncologist*. 2015;20(10):1189–98.
139. Cadigan KM, Waterman ML. TCF / LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2012;4(11):1–22.
140. Weinberg RA. *The Biology of Cancer_2nd edition*. Vol. 53, *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2013. 1689-1699 p.
141. Duchartre Y, Kim YM, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;99:141–9.
142. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organog* 42,. 2008;4(2):68–75.
143. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*. 2017;36(11):1461–73.
144. Verheyen EM, Gottardi CJ. Regulation of Wnt / β -Catenin signaling by protein kinases. *Dev Dyn*. 2011;239(1):34–44.
145. Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, et al. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*. 2005;438(7069):873–7.
146. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *J Clin Psychiatry*. 2003;64:36–40.
147. van Raay TJ, Fortino NJ, Miller BW, Ma H, Lau G, Li C, et al. Naked1 antagonizes wnt signaling by preventing nuclear accumulation of β -catenin. *PLoS One*. 2011;6(4).

148. Zhang S, Wang Y, Dai SD, Wang EH. Down-regulation of NKD1 increases the invasive potential of non-small-cell lung cancer and correlates with a poor prognosis. *BMC Cancer*. 2011;11:1–10.
149. Lv ZD, Zhang L, Liu XP, Jin LY, Dong Q, Li FN, et al. NKD1 down-regulation is associated with poor prognosis in breast invasive ductal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(4):4015–21.
150. Kikuchi A. Roles of axin in the Wnt signalling pathway. *Cell Signal*. 1999;11(11):777–88.
151. Dao DY, Yang X, Chen D, Zuscik M, O’Keefe RJ. Axin1 and Axin2 are regulated by TGF- β and mediate cross-talk between TGF- β and Wnt signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1116:82–99.
152. Longo-Sorbello GSA, Saydam G, Banerjee D, Bertino JR. Cytotoxicity and cell growth assays. *Cell Biol Four-Volume Set*. 2006;1:315–24.
153. Voigt W. Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity. *Chemosensitivity*. 110:039–48.
154. Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*. 2007;42(4):377–87.
155. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1112–6.
156. Orellana E, Kasinski A. Sulforhodamine B (SRB) assay in cell culture to investigate cell proliferation. *Bio-Protocol*. 2016;6(21).
157. Mendes FJFA d’Abreu. Caracterização Celular e Molecular dos Efeitos da Radiação em Neoplasias Estudo experimental em linfoma e carcinoma do pulmão de pequenas células. 2016;1–506.
158. Rafahi H, Orlowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC. Clonogenic Assay: Adherent Cells. *J Vis Exp*. 2011;(49):1–4. A
159. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2315–9.
160. Pietkiewicz S, Schmidt JH, Lavrik IN. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *J Immunol Methods*. 2015;423:99–103.
161. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1458–61.
162. Babes RM, Tofolean IT, Sandu RG, Baran OE, Cosoreanu V, Ilie MT, et al. Simple discrimination of sub-cycling cells by propidium iodide flow cytometric assay in Jurkat cell samples with extensive DNA fragmentation. *Cell Cycle*. 2018;4101:01-47.
163. Carter WO, Narayanan PK, Robinson JP. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol*. 1994;55(2):253–8.

164. Rastogi RP, Singh SP, Häder DP, Sinha RP. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;397(3):603–7.
165. Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokoloski EA, Levine RL, Vasquez-Vivar J, et al. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(16):5727–32.
166. Peshavariya HM, Dusting GJ, Selemidis S. Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase. *Free Radic Res.* 2007;41(6):699–712.
167. Stevenson D, Wokosin D, Girkin J, Grant MH. Measurement of the intracellular distribution of reduced glutathione in cultured rat hepatocytes using monochlorobimane and confocal laser scanning microscopy. *Toxicol Vitro.* 2002;16:609–619.
168. Hedley DW, Chow S. Evaluation of Methods for Measuring Cellular Gluthione Content Using Flow Cytometry. *Cytometry.* 1994;15:349–58.
169. Du Plessis L, Laubscher P, Jooste J, Du Plessis J, Franken A, Van Aarde N, et al. Flow cytometric analysis of the oxidative status in human peripheral blood mononuclear cells of workers exposed to welding fumes. *J Occup Environ Hyg.* 2010;7(6):367–74.
170. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1–40.
171. Ding X, Xu Q, Liu F, Zhou P, Gu Y, Zeng J, et al. Hematoporphyrin monomethyl ether photodynamic damage on HeLa cells by means of reactive oxygen species production and cytosolic free calcium concentration elevation. *Cancer Lett.* 2004;216(1):43–54.
172. Lipinski B. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2011;2011.
173. Du J, Cieslak JA, Welsh JL, Sibenaller ZA, Allen BG, Wagner BA, et al. Pharmacological ascorbate radiosensitizes pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2015;75(16):3314–26.
174. Papaccio G, Desiderio V. *Cancer Stem Cells.* Vol. 1692. 2018.
175. Torlakovic EE, Riddell R, Banerjee D, El-Zimaity H, Pilavdzic D, Dawe P, et al. Canadian Association of Pathologists-Association canadienne des pathologistes National Standards Committee/Immunohistochemistry: Best practice recommendations for standardization of immunohistochemistry tests. *Am J Clin Pathol.* 2010;133(3):354–65.
176. Mahmood T, Yang PC. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012;4(9):429–34.
177. Sherris J, Herdman C, Christopher E. Beyond Our Borders Cervical cancer in the developing world. *Aust N Z J Surg.* 1976;46(4):381–2.
178. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. *Biochem Cell Biol.* 2013;44(12):2144–51.

179. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007;1(5):555–67.
180. Ayob AZ, Ramasamy TS. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci*. 2018;1–18.
181. Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(13):4085–95.
182. Valkenburg KC, Graveel CR, Zylstra-diegel CR, Zhong Z, Williams BO. Wnt/ β -catenin Signaling in Normal and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*. 2011;3:2050–79.
183. Dagogo-jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*.
184. Sun X, Yu Q. Intra-tumor heterogeneity of cancer cells and its implications for cancer treatment. *Nat Publ Gr*. 2015;36(10):1219–27.
185. Buch K, Peters T, Nawroth T, Sanger M, Schmidberger H, Langguth P. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT assay - A comparative study. *Radiat Oncol*. 2012;1–6.
186. Yano T, Itoh Y, Matsuo M, Kawashiri T, Egashira N. Involvement of both tumor necrosis factor- α -induced necrosis and p53-mediated caspase-dependent apoptosis in nephrotoxicity of cisplatin. 2007;1901–9.
187. Shino Y, Itoh Y, Kubota T, Yano T, Sendo T, Oishi R. Role of poly(ADP-ribose) polymerase in cisplatin-induced injury in LLC-PK1 cells. 2003;35(8):966–77.
188. Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells : apoptosis vs . necrosis. *Am Physiol Soc*. 2018;700–8.
189. Shapiro GI, Harper JW. Anticancer drug targets : cell cycle and checkpoint control. *J Clin Investig |*. 1999;104(12):1645–53.
190. Willis N, Rhind N. Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell Div*. 2009;10:1–10.
191. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol Biotechnol*. 2004;26.
192. Olive PL, Banath JP. The comet assay : a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc*. 2006;1(1):23–9.
193. Schloffer D, Horky M, Kotala V, Jozefa W. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human cervix carcinoma cells during therapy by cisplatin. *Cancer Detect Prev* 27. 2003;27:481–93.
194. Velma V, Dasari SR, Tchounwou PB. Low doses of cisplatin induce gene alterations , cell cycle arrest , and apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Biomark Insights*. 2016;113–21.
195. Dikalov S, Griending KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. 2007;49(4):717–27.
196. Liu Y, Yang C, Huang M, Yeh C, Wu ATH, Lee Y, et al. Cisplatin selects for multidrug-

- resistant CD133 cells in lung adenocarcinoma by activating Notch signaling. *Tumor stem cell Biol.* 2012;1–12.
197. Chen HHW, Kuo MT. Role of glutathione in the regulation of cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Met Based Drugs.* 2010;2010.
 198. Kasherman Y, Sturup S, Gibson D. Is glutathione the major cellular target of cisplatin? A study of the interactions of cisplatin with cancer cell extracts. *J.M.Chem.* 2009;4319–28.
 199. Hirrlinger J, Drigen R. Multidrug Resistance Protein 1 - Mediated Export of Glutathione and Glutathione Disulfide from Brain Astrocytes. *M. Enzy* 2005;400(05).
 200. Wang R, Moyung KC, Zhao YJ, Poon K. A Mechanism for the Temporal Potentiation of Genipin to the Cytotoxicity of Cisplatin in Colon Cancer Cells. *Int J Med Sci.* 2016;13(7):507–16.
 201. Qu K, Lin T, Wang Z, Liu S, Chang H, Xu X, et al. Reactive oxygen species generation is essential for cisplatin- induced accelerated senescence in hepatocellular carcinoma. *FontMed.* 2014;8(2):227–35.
 202. Jin X, Li F, Liu B, Zheng X. Biochemical and Biophysical Research Communications Different mitochondrial fragmentation after irradiation with X-rays and carbon ions in HeLa cells and its influence on cellular apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;500(4):958–65.
 203. Zhao H, Zhuang Y, Li R, Liu Y, Mei Z. Effects of different doses of X - ray irradiation on cell apoptosis , cell cycle , DNA damage repair and glycolysis in HeLa cells. 2019;17:42–54.
 204. Takahashi A. Different inducibility of radiation- or heat-induced p53 -dependent apoptosis after acute or chronic irradiation in human cultured squamous cell carcinoma cells. *Int J Radiat Biol.* 2001;77(2).
 205. Krisna G, Jadav R, Bhanumathi P, Devi PU, Seetharamaiah T, Vidyasagar MS, et al. Possible role of glutathione in predicting radiotherapy response of cervix cancer. *Clin Investig (Lond).* 1998;41(1):3–5.
 206. Kurth I, Hein L, Mäbert K, Peitzsch C, Koi L, Cojoc M, et al. Cancer stem cell related markers of radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2015;6(33).
 207. Cojoc M, Peitzsch C, Kurth I, Trautmann F, Kunz-schughart LA, Telegeev GD, et al. Aldehyde Dehydrogenase Is Regulated by β -Catenin / TCF and Promotes Radioresistance in Prostate Cancer Progenitor Cells. *Tumor Stem Cell Biol.* 2015;(8):1–14.
 208. Pan W, Choi S, Wang H, Qin Y, Volpicelli-daley L, Swan L, et al. Wnt3a-mediated formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates LRP6 phosphorylation. *Science.* 2008;321: 2–6.
 209. Rui Y, Xu Z, Lin S, Li Q, Rui H, Luo W, et al. Axin stimulates p53 functions by activation of HIPK2 kinase through multimeric complex formation. *EMBO J.* 2004; 23:4583–94.

8- Anexos

Anexo I

Estadiamento do cancro do colo do útero de acordo com as normas da FIGO.

Estádio I - Carcinoma limitado ao colo	IA1 -Invasão do estroma ≤ 3 mm em profundidade e ≤ 7 mm em extensão
	IA2 -Invasão do estroma > 3 mm e ≤ 5 mm em profundidade e ≤ 7 mm em extensão
	IB -Carcinoma clinicamente visível com ≤ 4 cm
	IB2 -Carcinoma clinicamente visível com > 4 cm
Estádio II - Carcinoma estende-se para além do colo, mas não atinge a parede pélvica, nem o 1/3 inferior da vagina	IIA -Tumor envolve até os 2/3 superiores da vagina, sem infiltração óbvia do paramétrio
	IIA1 -Carcinoma clinicamente visível com ≤ 4 cm, sem envolvimento do paramétrio

Efeito de diferentes terapêuticas citotóxicas na expressão do CD133, Wnt/ β -catenina no cancro do colo do útero.

	<p>IIA2-Carcinoma clinicamente visível com >4cm, sem envolvimento do paramétrio</p>
<p>Estádio III - Carcinoma estende-se à parede pélvica e/ou invade o 1/3 inferior da vagina, e/ou hidronefrose ou rim não funcionante (a não ser que se conheça outra causa)</p>	<p>IIB-Carcinoma infiltra o paramétrio, sem atingir a parede pélvica</p>
<p>Estádio IV - Carcinoma estende-se para além da pelve, e/ ou invade a mucosa da bexiga e/ou do reto</p>	<p>IIIA-Invasão do 1/3 inferior da vagina, sem atingir a parede pélvica</p>
	<p>IIB-Extensão à parede pélvica, e/ou hidronefrose, e/ou rim não funcionante</p>
	<p>IVA - O tumor invade a mucosa da bexiga e/ou do reto</p>
	<p>IVB - Metástases à distância</p>