



RADIOBIOLOGIA

As bases biológicas da radioterapia

Fundamentos essenciais



2021
Isabel Bravo

Este manual pretende ser um texto didático para o estudante para quem o conhecimento da radiobiologia dos tecidos normais e tumorais é um pré-requisito nuclear para a prática da Radioterapia. Tem como objetivo apresentar ao leitor os processos e mecanismos subjacentes à ação das radiações ionizantes para facilitar o entendimento da importância e potencial da Radioterapia. Foi escrito a pedido dos muitos alunos que frequentam as minhas aulas, a quem gostaria de agradecer, pois as suas mentes curiosas foram um incentivo constante à reflexão, estudo e preparação antes de os confrontar num auditório.

O meu agradecimento à Beatriz Peixoto, finalista de Medicina do ICBAS, pela revisão e edição do texto final. É também a autora das figuras 1-4, 6, 7, 9-12, 14, 19 e 21.

Porto, 1 de Junho de 2021

Esta monografia encontra-se disponível em
www.isabelguedesbravo.wixsite.com/radiobiologia

Radiobiologia: As bases biológicas da Radioterapia

A Radiobiologia é a área das ciências básicas e clínicas que estuda a ação das radiações ionizantes nos seres vivos. Esta exposição à radiação pode ser proveniente de fontes naturais (radiação “background”) e de fontes artificiais, resultantes das descobertas de Roentgen, Becquerel e Curie no final do século XIX. A utilização da radiação ionizante em medicina tem inúmeras aplicações que apresentam largos benefícios para a sociedade e para os indivíduos. A ampla e diversificada utilização com fins diagnósticos (radiologia) e terapêuticos (radioterapia externa e braquiterapia, medicina nuclear) são excelentes exemplos.

A Radioterapia é uma das armas terapêuticas mais eficazes no tratamento oncológico, sendo responsável atualmente pelo tratamento de > 50% de todos os doentes portadores de neoplasias malignas. A Radiobiologia, através da identificação dos mecanismos e processos subjacentes à resposta dos tecidos normais e tumorais à radiação permitiu o desenvolvimento científico da Radioterapia, como arma terapêutica, através da implementação de novas estratégias terapêuticas.

Durante os últimos anos a contribuição da radiobiologia para o conhecimento da resposta molecular à radiação e dos seus mecanismos subjacentes permitiu a sua implementação na estratégia dos tratamentos em radioterapia.

A Radioterapia é uma ciência/terapêutica em evolução, que tem sabido ao longo dos últimos 100 anos evoluir, otimizar-se e tornar-se mais eficaz.

INDICE

Introdução	3
Ação biomolecular da radiação ionizante	5
Efeito direto e indireto	6
Dose absorvida	9
O ADN como alvo das radiações ionizantes	10
Danos radio-induzidos.....	11
Efeitos estocásticos e determinísticos:	12
Efeitos estocásticos	13
Efeitos determinísticos.....	13
Efeitos somáticos <i>versus</i> efeitos genéticos	14
Proliferação e diferenciação	15
Ciclo celular	17
Controlo do ciclo celular	20
Alterações radio-induzidas: lesões ao ADN.....	23
Roturas na cadeia de ADN.....	23
Alterações cromossómicas.....	24
Efeito do Oxigénio, Transferência Linear de Energia e Eficácia Biológica Relativa	26
Efeito do Oxigénio	26
Transferência Linear de Energia e Eficácia Biológica Relativa	29
Os 5 R's da Radiobiologia	31
Reparação.....	32
Redistribuição.....	34
Repopulação.....	35
Reoxigenação	36
Radiossensibilidade	37
Modelo linear-quadrático	38
Fracionamento em Radioterapia:	40
Dose Biológica Efetiva (BED):	42
Tolerância dos tecidos normais à radiação	43
Otimização biológica da Radioterapia.....	45

Introdução

A Radioterapia é uma das armas terapêuticas mais eficazes no tratamento oncológico, sendo responsável atualmente pelo tratamento de 60% de todos os doentes oncológicos. As bases biológicas da radioterapia constituem uma ciência - a Radiobiologia - que teve o seu início logo após a descoberta dos raios X por Roentgen. A identificação dos mecanismos e processos subjacentes à resposta dos tecidos normais e tumorais à radiação permitiu o desenvolvimento científico da Radioterapia, como arma terapêutica, através da implementação de novas estratégias terapêuticas.

O tratamento dos tumores malignos é multidisciplinar, utilizando várias especialidades médicas como a cirurgia, a radioterapia e a medicina oncológica, de forma sequencial ou concomitante, com o intuito de otimizar o tratamento dos doentes oncológicos, tornando-os mais efetivos/eficazes e, tanto quanto possível, menos tóxicos.

Estes avanços no tratamento ocorreram a nível dos avanços tecnológicos e radiobiológicos. A radioterapia atual tem como objetivo a destruição do tumor e, simultaneamente, a maior poupança dos tecidos normais adjacentes, o que é conseguido com diferentes tipos de fracionamento (convencional, hiperfracionamento, hipofracionamento moderado, extremo, SBRT), diferentes magnitudes de dose por fração, diferentes tipos de energias e partículas ionizantes utilizadas (eletrões, fótons, prótons, neutrões...), assim como utilizando fármacos radiosensibilizadores ou radioprotetores para potenciar efeitos biológicos da radiação, bem como utilizando novas técnicas de radiosensibilização como hipertermia, oxigenoterapia hiperbárica, etc. A Radioterapia é uma ciência/terapêutica em evolução, que ao longo dos últimos 100 anos teve um desenvolvimento notável.

Efetivamente, a evolução dos conhecimentos de radiobiologia, matemática, física e da indústria médica tem permitido a construção de equipamentos sofisticados, que devido à sua versatilidade tem contribuído para a administração da radiação enquanto terapêutica, de forma mais precisa, segura e eficaz, permitindo assim obter ganho terapêutico efetivo, já que permite a destruição com precisão cirúrgica dos tecidos tumorais e dano mínimo dos tecidos normais adjacentes ao tumor.

A evolução dos conhecimentos médicos sobre a biologia dos tumores e dos tecidos normais, a experiência adquirida sobre o comportamento dos tecidos expostos à radiação, transformaram a Radioterapia numa das armas terapêuticas mais eficaz, efetiva e segura disponível no tratamento do doente oncológico.

Aliás tem-se assistido nos últimos anos a uma evolução significativa na implementação de critérios muito apertados de controlo de qualidade da radiação, do planeamento e dosimetria dos tratamentos, administração e reprodutibilidade diárias dos tratamentos, proteção contra a radiação, definição de tabelas de tolerância da dose dos tecidos à radiação, etc, que ajudaram a tornar a Radioterapia na terapêutica sofisticada do século XXI, que hoje representa.

Ação biomolecular da radiação ionizante

Na exposição dos tecidos vivos à radiação ionizante ocorre absorção da energia dos fótons pelas células. A radiação ao atravessar o material biológico, vai desencadear uma série de acontecimentos, interagir com átomos e moléculas do meio, com a consequente transferência de energia.

Todas as moléculas biológicas podem ser alteradas, em resposta à radiação, mas as consequências decorrentes variam segundo a importância dessas moléculas. Existem fortes evidências que o ADN constitui o alvo dos efeitos biológicos das radiações ionizantes, nomeadamente morte celular, perda de capacidade clonogénica, mutações genicas e aberrações cromossómicas, com os consequentes efeitos somáticos, hereditários, teratogénicos e carcinogénicos – figura 1.

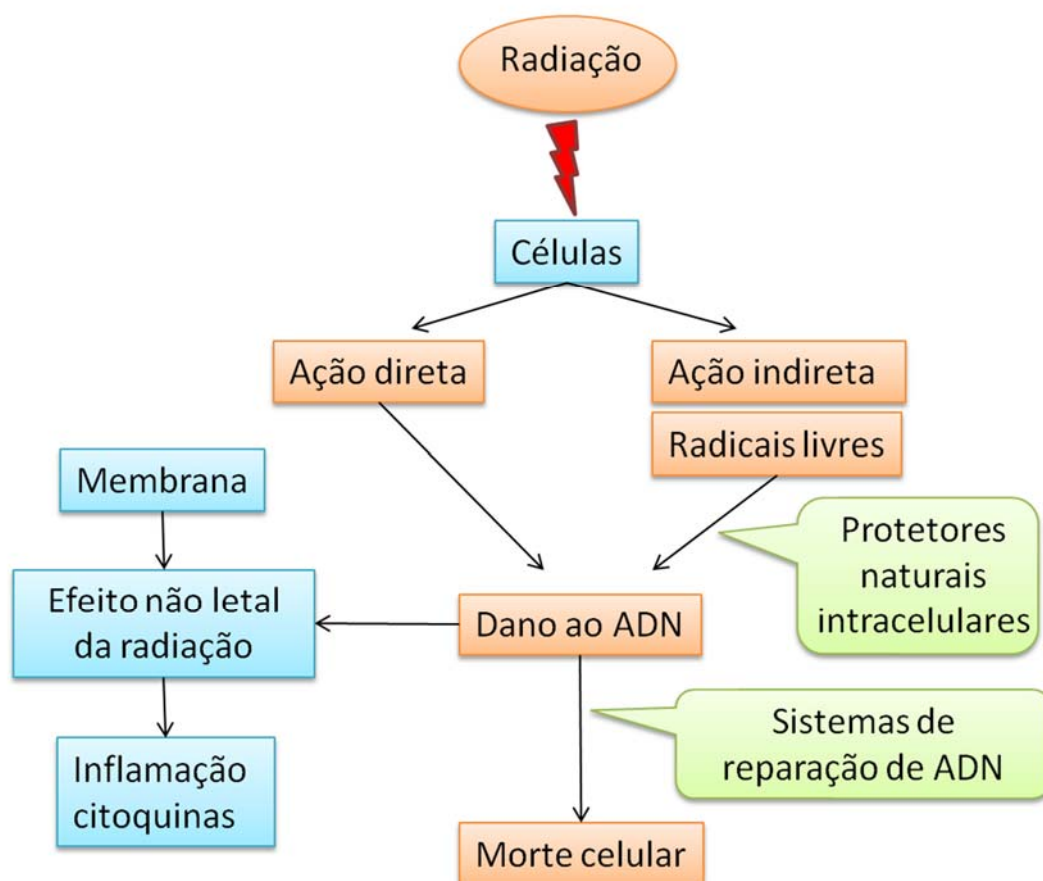


Fig. 1 – Ação biomolecular da radiação ionizante

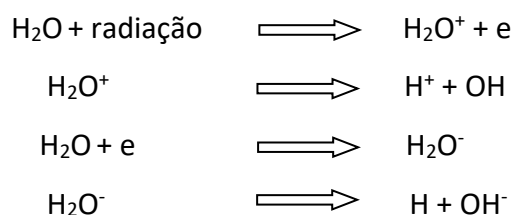
As radiações ionizantes causam danos às células ou tecidos através da deposição de energia, numa sequência de eventos. Diferentes tipos de radiação têm capacidades distintas de causarem danos biológicos. Os efeitos decorrentes do uso das radiações ionizantes sobre o organismo variam desde alguns segundos até dezenas de anos, dependendo dos processos envolvidos. As alterações biológicas provocadas pela radiação podem afetar uma célula de várias maneiras, resultando em morte prematura, atraso na divisão celular ou modificação genética que é transmitida para as gerações posteriores.

Todas estas lesões são causadas a nível celular ou molecular. Os efeitos biológicos posteriormente manifestados são devidos ao impacto dessas lesões a milhões de células num órgão ou tecido. Considerando que a natureza do dano é molecular ou celular torna-se por isso essencial compreender os mecanismos envolvidos.

Efeito direto e indireto

As radiações ionizantes, utilizadas em Radioterapia causam uma cascata de eventos, que se inicia imediatamente após a sua emissão. A ionização inicial (fase física) é seguida de lesão imediata de macromoléculas vitais a nível celular - efeito direto, ou indiretamente através da interação com moléculas de água, de que resultam radicais livres de oxigénio, altamente reativos a nível molecular (fase físico-química) - efeito indireto.

A energia depositada inicialmente pelas radiações ionizantes é utilizada na formação de radicais livres. Como as células são constituídas principalmente por água, a maior parte das lesões causadas pelos raios-X às moléculas biológicas - cerca de 2/3, é mediada através dos radicais livres, nomeadamente radicais hidroxilo:



Os radicais livres resultantes destas reações iniciam reações químicas complexas, que podem levar à destruição ou inativação de moléculas vitais na célula. Segue-se a fase química em que pode ocorrer a reparação dos danos subletais - figura 2.



Fig. 2 – Fases da ação da radiação ionizante

De seguida, durante a fase biológica, ocorre a manifestação das lesões não reparadas no ADN, sendo os fenómenos biológicos da radiação uma consequência dos fenómenos físicos e químicos.

Deste modo, enquanto a deposição inicial de energia e os eventos subsequentes ocorrem entre 10^{-18} - 10^{-13} s, a cadeia de efeitos biológicos que se inicia através da indução da morte celular (necrose ou apoptose) ou reparação dos danos subletais e potencialmente letais, conducente reparação e remodelação tecidulares pode demorar minutos, horas, dias, meses ou anos a expressar esses efeitos.

Existem ainda diversos fatores que afetam a resposta da célula à radiação:

- ✓ fatores físicos (dose, taxa de dose, fracionamento, LET (*linear energy transfer*) - transferência linear de energia e RBE (*relative biological effectiveness*) - eficácia biológica relativa);
- ✓ fatores químicos (radiossensibilizadores, radioprotectores, concentração de O_2)
- ✓ fatores biológicos (estado proliferativo, fase do ciclo celular, estado fisiológico ou metabólico, constituição genética da célula).

A constituição genética e bioquímica é um fator determinante na resposta molecular à radiação, e estão já identificadas várias moléculas através das quais as células detetam as lesões radio-induzidas. O reconhecimento destas lesões ativa as vias de transdução de sinais adequados, á resposta celular á lesão. Este processo é influenciado pelos processos de sinalização internos das células bem como de fatores externos como a hipóxia, citocinas, contacto intercelular e matriz extracelular. O resultado destas interações pode promover a sobrevivência ou morte celular, paragem ou bloqueio do ciclo celular e reparação do ADN ou instabilidade genética, dependendo do modo como as células respondem às lesões radio-induzidas – figura 3.

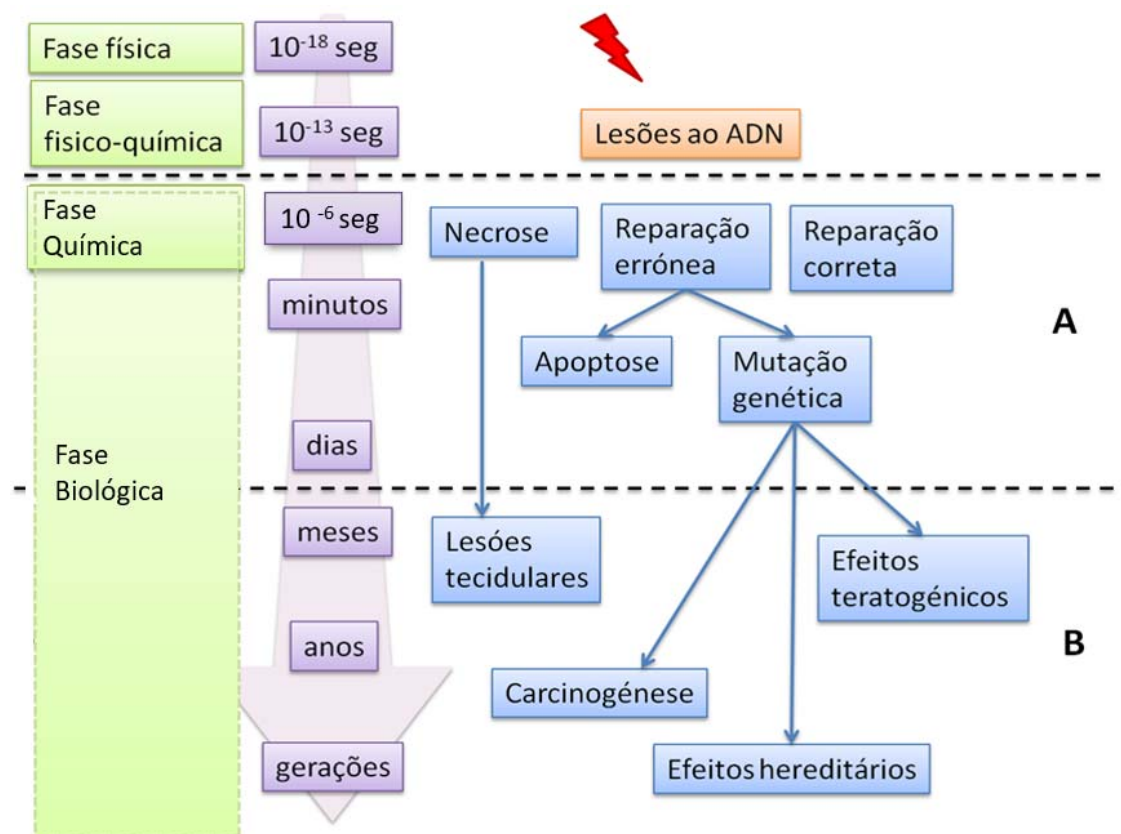


Fig. 3 -Escala temporal dos efeitos das radiações ionizantes: as alterações biológicas manifestam-se após um período de latência que pode ir de minutos a semanas até anos após exposição. A- efeitos precoces; B - efeitos tardios

Deste modo, quando uma célula absorve radiação podem ocorrer 4 possibilidades:

- ✓ a absorção da radiação pode não ter nenhum efeito adverso, ou se ocorrer lesão, pode ser reparada sem que ocorra qualquer vestígio da exposição; se não for reparada pode ser ativada a via da apoptose;

- ✓ a célula pode sofrer danos letais, irreparáveis e irreversíveis, que conduzem à morte celular;
- ✓ a célula pode perder a sua capacidade clonogénica;
- ✓ podem ocorrer mutações génicas, com consequências distintas de acordo com o tipo de célula onde ocorrem. Desta forma as consequências do efeito das radiações dependem do alvo. Se o alvo são as células somáticas, as consequências refletem-se no próprio indivíduo; se são as células germinativas, estas lesões não têm consequências no indivíduo, mas sim para a sua descendência, a menos que a dose seja suficientemente elevada para provocar a sua esterilidade.

Dose absorvida

A dose absorvida representa a relação entre a energia absorvida e a massa do volume de material atingido. No entanto, de forma a especificar melhor as variações espaciais e evitar a variação da quantidade de energia absorvida em diferentes pontos do volume do material, a dose absorvida é definida como uma função num ponto P de interesse, isto é:

$$D = \frac{d\bar{E}}{dm}$$

Onde $d\bar{E}$ é a energia média transferida pela radiação no ponto P de interesse, num meio de massa dm . O sistema internacional de unidades (SI) define para a dose de radiação absorvida pelo tecido (Gray) como a quantidade de energia depositada (em Joules) por kilograma:

$$1\text{Gray (Gy)} = 1\text{J} \times \text{kg}^{-1}$$

A deposição de energia será devida aos eletrões que são libertados no processo de interação dos fotões com a matéria.

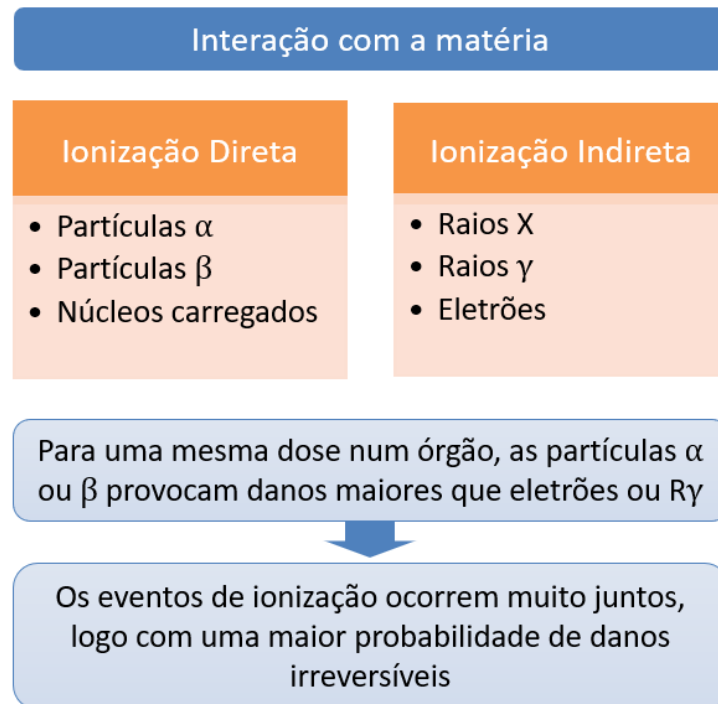


Fig. 4 – As diferentes interações da radiação ionizante

A causa mais frequente de morte celular induzida pelas radiações é devida à incapacidade de corrigir as lesões duplas na cadeia de DNA e manifesta-se quando a célula tenta a divisão celular subsequente. Deste modo, as células mais proliferativas manifestam os danos ou morrem muito mais precocemente do que as células com tempos de proliferação mais longos. Assim as alterações biológicas em células e tecidos, devidas às radiações ionizantes ocorrem apenas após um período de latência, que pode ir de minutos a semanas ou até anos (em função de dose, taxa de dose, cinética celular, controlo dos genes reguladores do ciclo celular, etc.).

O ADN como alvo das radiações ionizantes

Todas as moléculas biológicas podem ser alteradas pelas radiações ionizantes, mas as consequências decorrentes variam segundo a importância dessas moléculas. A ideia da existência de uma molécula crítica, sensível, que quando atingida acarreta maior probabilidade de morte para a célula, é a base da teoria do alvo. Segundo esta teoria, existiria nos seres vivos uma estrutura vulnerável cuja lesão provocaria a morte. A molécula de ADN, constitui, pois, a molécula alvo das radiações.

Existem evidências que indicam que a molécula de ADN é, de facto, o principal alvo das radiações ionizantes:

- ✓ As células morrem por incorporação da timidina radioativa no seu ADN. A dose de radiação resulta de partículas α e é muito localizada;
- ✓ Certos análogos da timidina são incorporados seletivamente no ADN aumentando drasticamente a radiosensibilidade das células, de mamíferos, a um grau que aumenta em função da quantidade incorporada.
- ✓ Estudos estabelecem uma relação entre o volume do ácido nucleico de um vírus e a sua radiosensibilidade.

Outros fatores que modificam a letalidade da célula, como a concentração de oxigénio, os vários tipos de radiação ou a taxa de dose, também afetam a produção de danos nos cromossomas de forma quantitativa e qualitativamente semelhante. Esta é a evidência que indica que as lesões aos cromossomas estão implicadas na morte celular.

Danos radio-induzidos

Os danos causados pelas radiações ionizantes podem ser classificados em:

- ✓ Danos letais
- ✓ Danos potencialmente letais
- ✓ Danos subletais

Os danos letais causam a morte da célula, sendo, portanto, irreversíveis. Se o número de células mortas for elevado pode levar à morte do tecido ou mesmo à falência do órgão em causa. De salientar que as roturas da cadeia dupla de ADN são as responsáveis por este tipo de danos.

Os danos potencialmente letais podem ser reparados se as condições ambientais pós irradiação forem modificadas, isto é, se forem sub-ótimas para o crescimento celular, o número de células sobreviventes aumenta, o que leva a considerar que o dano

potencialmente letal foi reparado. Isto significa que em condições normais estes danos não são reparáveis, sendo assim potencialmente letais para as células irradiadas.

Os danos subletais são um tipo de danos em que a reparação é possível em condições normais, desde que haja um fracionamento da dose – consiste em dividir uma dose, por exemplo, em duas frações iguais e deixar um intervalo de tempo entre estas duas frações. Assim, a mesma dose que seria administrada de uma só vez (dose única) é administrada em frações separadas por um intervalo de tempo levando assim à reparação destes danos subletais e ao consequente aumento da sobrevivência celular. Ou seja, quanto maior for o intervalo de tempo entre a administração das doses de radiação, maior será o número de células que sobrevive, isto porque as células dispõem de mais tempo para reparar os danos antes de acumular danos subsequentes (as células sobreviventes respondem à segunda fração como se nunca tivessem sido irradiadas).

Efeitos estocásticos e determinísticos

Os efeitos radioinduzidos podem ser denominados em função do valor da dose e forma de resposta, em função do tempo de manifestação e do nível orgânico atingido. Assim, em função da dose e forma de resposta, são classificados em determinísticos e estocásticos; em termos do tempo de manifestação, em imediatos e tardios; em função do nível de dano, em somáticos e genéticos (hereditários).

Nos efeitos estocásticos a gravidade dos efeitos é independente da dose, mas a probabilidade de ocorrência aumenta com esta, isto é, uma elevada dose de radiação não implica maior gravidade de efeitos, pois se um efeito ocorrer perante uma dose mais baixa a sua gravidade poderá ser a mesma.

Os efeitos determinísticos são diretamente dependentes da dose, aumentando à medida que a dose aumenta, ou seja, quanto maior a dose, maior a gravidade dos efeitos, até um limiar máximo de dose. A partir deste limiar máximo a gravidade dos efeitos é sempre a mesma. Os danos observáveis só começam a verificar-se a partir de um limiar.

Efeitos estocásticos

- ✓ Ocorrem com doses baixas de radiação
- ✓ Não apresentam limiar de dose para essa ocorrência
- ✓ A probabilidade de ocorrência aumenta com a dose
- ✓ A gravidade do efeito não depende da dose

Exemplo: carcinogénese, efeitos genéticos

Efeitos determinísticos

- ✓ Ocorrem com doses elevadas de radiação
- ✓ Apresentam um limiar de dose para sua ocorrência
- ✓ A gravidade do efeito aumenta com o aumento da dose

Exemplos: eritema, catarata

Os efeitos estocásticos causam uma alteração aleatória no ADN de uma única célula que no entanto, continua a reproduzir-se, levando à transformação celular. Assim, um só evento pode ser suficiente, sendo que por causa disso, os efeitos estocásticos das radiações ionizantes não apresentam limiar de dose, podendo o dano ser causado por uma dose baixa de radiação.

O aumento da dose somente aumenta a probabilidade de ocorrência e não a gravidade do dano. Os efeitos estocásticos dependem da dose e não têm limiar, levam à transformação celular, com alteração aleatória no DNA de células que continuam a reproduzir-se, a exemplo dos efeitos hereditários.

Já os efeitos determinísticos têm limiar de dose – figura 5; até esse valor os danos são reparados; a partir desse limiar, a gravidade do dano aumenta em função da dose.

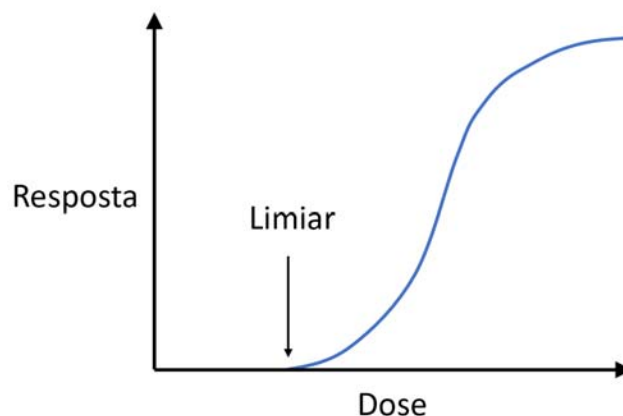


Fig. 5 - Efeitos determinísticos têm limiar de dose a partir do qual a gravidade do dano aumenta com a dose.

A reação de um indivíduo à exposição de radiação depende de diversos fatores como:

- ✓ Quantidade total de radiação recebida
- ✓ Quantidade de radiação recebida anteriormente pelo organismo
- ✓ Intervalo de tempo durante o qual a quantidade total de radiação foi recebida
- ✓ Características individuais da célula exposta à radiação.

Efeitos somáticos *versus* efeitos genéticos

Os efeitos da radiação nas populações humanas podem ser classificados como somáticos ou genéticos.

Os **efeitos somáticos** são os danos provocados nos indivíduos pelas diferentes exposições ao longo da sua vida. Isto é, resultam dos danos provocados nas células do seu corpo e apresentam-se apenas nas pessoas que sofreram a irradiação, não surgindo nas gerações posteriores.

Como já foi referido anteriormente, uma vez que, os tecidos reagem de diferentes formas à radiação, a gravidade destes efeitos dependerá não só da dose recebida como da região anatómica envolvida.

Estes efeitos podem se revelar tardios ou mesmo imediatos, dependendo do tempo que demoram a revelar-se. Assim, temos como exemplos de efeitos somáticos imediatos a

leucopenia, a anemia e a trombocitopenia no caso de irradiação do Sistema Hematopoiético; obstrução de vasos e fragilidade vascular no caso de irradiação do Sistema Vascular e alterações nas secreções e lesões na mucosa para a irradiação do Sistema Gastrointestinal entre outros.

Como efeitos somáticos tardios, podemos ter alterações no crescimento e desenvolvimento, sobretudo na embriogénese e diminuição do período de vida; mas o efeito tardio mais relevante é a possibilidade de carcinogénese. A informação epidemiológica disponível sobre os sobreviventes de Hiroxima e Nagasaki, exposições ocupacionais a níveis baixos de radiação, exposição a radiações com intuito terapêutico ou de diagnóstico suportam esta possibilidade de efeito somático tardio.

Os **efeitos hereditários ou genéticos** estão relacionados com as radiações que provocam mutações que vão surgir nos descendentes do indivíduo irradiado.

Este tipo de efeitos depende, para além de outros fatores, do tipo de feixe de radiação; do tipo de fracionamento, isto é, se o tempo entre as frações permite reparar os danos; e também da quantidade de dose, apresentando esta última uma relação linear com a gravidade do efeito provocado.

Proliferação e diferenciação

O conceito de proliferação celular e a sua influência na resposta ao tratamento é fundamental em RT. A proliferação celular nos tecidos normais, ao contrário do que ocorre nos tumores, encontra-se muito bem organizada através do controlo homeostático: existe um equilíbrio entre a produção celular e a perda das células mais diferenciadas. A radiação é um agente citotóxico singular porque as lesões causadas ao ADN podem permanecer latentes durante horas, dias, semanas ou meses. Isto ocorre porque na grande maioria dos tecidos normais e tumorais, a morte da celular só ocorre quando a célula tenta a divisão seguinte, o que depende das características proliferativas do tecido. Nas células da mucosa intestinal, em que o tempo de ciclo celular (T_c) é curto (12-24h), a morte celular ocorre após algumas horas; na pele ($T_c = 4$ dias), pode demorar uma semana; no rim (T_c indeterminado) pode demorar meses (Wilson, 2007).

Tal como a nível celular existem alvos preferenciais para a ação das radiações, também a nível tecidual existem células ou grupos de células mais sensíveis ou de cuja morte dependem as alterações observadas no organismo pós-irradiação. Os diferentes órgãos ou tecidos do organismo vivo são compostos por diversos tipos celulares e a resposta de um órgão ou tecido à radiação depende da sensibilidade intrínseca das diferentes populações celulares nesse órgão ou tecido e das características proliferativas de cada população.

A Lei de Rubin e Casarett diferencia a sensibilidade tecidual - sendo que esta é essencialmente uma função do tipo de célula que constitui o tecido - em cinco grupos distintos.

Tipo Celular	Propriedades	Diferenciação	Exemplos	Sensibilidade
I - Vegetativas intermitóticas	<ul style="list-style-type: none"> Divisões regulares Sem diferenciação 	Sem diferenciação	Eritroblastos, células da cripta intestinal e germinativas da epiderme	Muito Alta
II - Intermitóticas em diferenciação	<ul style="list-style-type: none"> Divisões regulares Alguna diferenciação entre divisões 		Mielócitos	
			Células do tecido conjuntivo	
III - Pós mitóticas reversíveis	<ul style="list-style-type: none"> Não se dividem regularmente Variavelmente diferenciadas 	Altamente diferenciadas	Hepatócitos	Muito Baixa
IV - Pós mitóticas fixas	<ul style="list-style-type: none"> Sem divisão Altamente diferenciadas 		Neurónios	

Fig. 6 - Classificação de Rubin e Casarett da radiosensibilidade celular de acordo com a proliferação e diferenciação.

Esta classificação está diretamente ligada com a capacidade reprodutiva das células e com o grau de diferenciação das populações celulares dos tecidos.

No primeiro grupo encontram-se as células mais sensíveis, pois são as que estão metabolicamente mais ativas, que se dividem mais rapidamente e mais indiferenciadas. No segundo grupo encontram-se as células intermitóticas em diferenciação, resultado da divisão celular das células do grupo anterior, que são ainda mitoticamente muito

ativas e relativamente indiferenciadas. No grupo intermédio, que inclui as células do tecido conjuntivo, encontramos as células do endotélio vascular e os fibroblastos. Nos grupos seguintes aumenta a diferenciação celular e diminui a proliferação até à última classificação, que inclui as células pós-mitóticas fixas, onde encontramos exemplos das células mais resistentes.

Ciclo celular

O conceito de ciclo celular é essencial para o conhecimento de todos os processos de radiobiologia celular. Trata-se de um processo necessário que envolve grande fiabilidade e de extrema importância para a propagação dos organismos.

O ciclo celular consiste numa sucessão de acontecimentos que conduzem à duplicação do material genético e de outros componentes celulares e eventualmente à divisão da célula - figura 7.

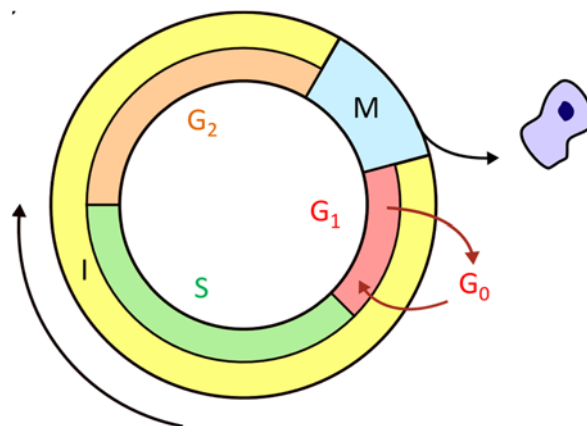


Fig. 7 - Esquema do ciclo celular.

O ciclo celular corresponde ao conjunto de alterações que decorrem numa célula desde o período da sua formação como entidade independente até à sua própria divisão. Estas alterações incluem sempre a duplicação do ADN.

As fases do ciclo celular são: a fase G₁ (*gap*) em que ocorre a síntese das enzimas envolvidas na replicação do ADN; a fase S de síntese do ADN em que a célula gera uma cópia integral do material genético, prosseguindo para uma segunda fase preparatória da divisão celular; a fase G₂, antes de entrar na mitose (M). Nesta fase, a réplica de ADN é condensada em cromossomas compactos, segregados para as células-filhas de modo

a que cada uma receba uma cópia completa do material genético. Qualquer célula em proliferação tem ainda a possibilidade de entrar em fase G_0 que é um período em que a célula quiescente mantém a sua atividade metabólica mas não cresce em tamanho, a não ser que receba sinais extracelulares.

Tem sido provado experimentalmente que baixas doses de radiação atrasam a mitose em células humanas (acumulam-se na fase G_2 do ciclo celular); este atraso deve-se à ocorrência de uma paragem, a qual é de extrema importância, na medida em que permite a reparação dos danos cromossômicos antes da célula entrar em mitose, ou mesmo a ativação da apoptose (morte celular programada) caso os genes envolvidos estejam ativos. A morte em interfase, que é a morte da célula antes de entrar em mitose, depende da célula que é irradiada. Células muito proliferativas morrem em interfase, com doses menores que as células menos proliferativas. A consequência para as células que não se dividem ativamente, ou que se dividem numerosas vezes originando células mortas é a falência reprodutiva celular.

A morte na fase M é a forma mais comum de morte radio-induzida visto que as células morrem na tentativa de se dividirem (isto devido às lesões cromossômicas). A morte celular pode ocorrer na primeira divisão pós irradiação ou em divisões subsequentes. Deste modo, as células mais proliferativas expressam os danos muito mais rapidamente do que as células com menor índice mitótico.

Sendo o ADN o principal alvo da radiação no que diz respeito à indução de danos celulares ou a morte celular, as variações da sua quantidade levam a crer que, ocorrem também variações na sensibilidade celular à medida que a célula progride nas diferentes fases do ciclo celular.

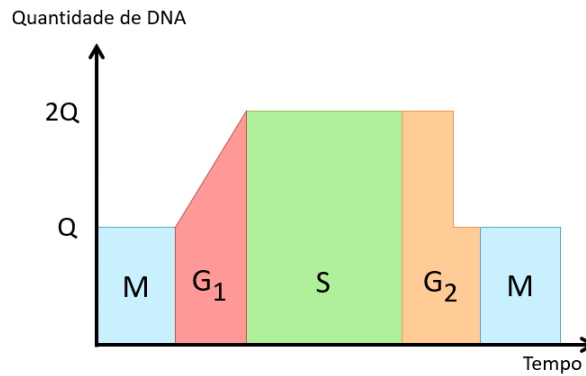


Fig. 8 - Variação da quantidade de ADN no ciclo celular

Durante a fase S a quantidade de ADN duplica, antes de entrar na mitose (M) onde os cromossomas estão condensados, ou seja, muito mais expostos. Estas duas situações coincidem respetivamente com os períodos de radiosensibilidade mínima e máxima

Como observado, a mitose corresponde ao período em que a célula se apresenta mais vulnerável; por outro lado durante a fase S a sua sensibilidade é menor.

A elevada sensibilidade durante a mitose explica-se pelo facto das células se encontrarem com baixa atividade metabólica o que impede que seja realizada uma rápida e eficaz reparação do ADN, conduzindo à acumulação sucessiva de danos.

A baixa sensibilidade durante a fase S é explicada por razões opostas, caracterizando-se por uma elevada taxa metabólica e essencialmente pela síntese de ADN, estando assim ativos os processos de reparação enzimática.

Um outro aspeto a ter em conta no que diz respeito à radiosensibilidade no decorrer do ciclo celular, é a variação da concentração de compostos sulfídricos em cada fase. Estes são potentes radioprotetores naturais e a sua concentração é maior na fase S e menor perto da mitose (M).

A radiosensibilidade celular varia não só devido à fase do ciclo celular em que a célula se encontra, mas também devido a outros fatores como o tipo de radiação, o pH do meio celular, a temperatura, a concentração do oxigénio, a presença de radioprotetores, bem como da possibilidade de reparação das lesões radio-induzidas.

É assim possível estabelecer algumas regras gerais acerca da radiosensibilidade no decorrer do ciclo celular:

- As células são muito sensíveis na fase M ou nas suas proximidades;
- O período de maior resistência é no final da fase S;
- Quando a fase G_1 é relativamente longa, ocorre um período de radio resistência no seu início, seguindo-se um período de maior sensibilidade até a célula entrar na fase S;
- A fase G_2 é caracterizada por uma elevada sensibilidade, por vezes comparada com a que é observada na fase M.

Controlo do ciclo celular

Para que a progressão através do ciclo celular ocorra é necessário um sistema de verificação do ADN que assegure a duplicação total do genoma dum modo ordenado e com elevada fiabilidade. As alterações no controlo do ciclo celular normal conduzem a instabilidade genética, um fator importante na carcinogénese. É por isso que a existência de pontos de verificação da integridade e do estado da replicação do material genético (checkpoints), que possibilitem a paragem da progressão do ciclo celular em caso de dano ou mutação do ADN, para que este seja avaliado e reparado, assegura a complexidade e irreversibilidade do ciclo celular, bem como dos processos de ativação, expressão e degradação das proteínas envolvidas.

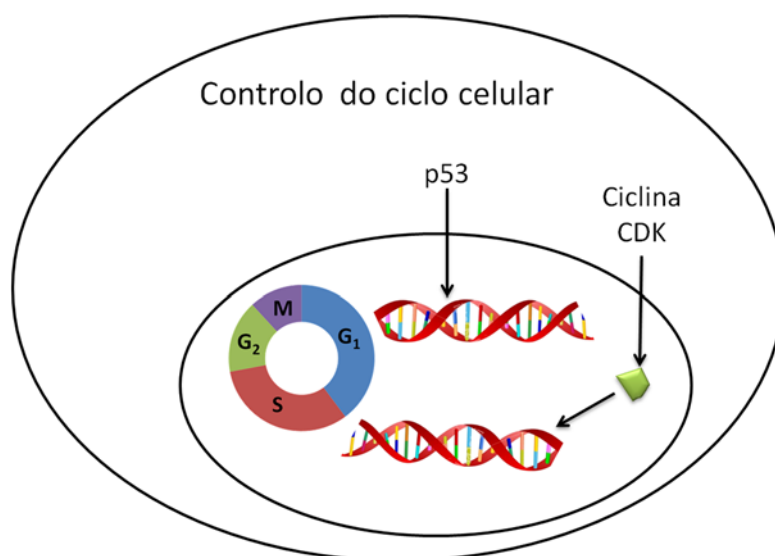


Fig. 9 - Ilustração esquemática do papel das ciclinas e cinases dependentes das ciclinas (CDKs) na regulação do ciclo celular: O ciclo celular divide-se nas fases G1, S (síntese do DNA), G2 e M (mitose). A transição entre as fases é controlada pelas ciclinas e CDKs.

Por outro lado, a morte celular fisiológica nos tecidos de autorregulação, como a pele, o intestino e a medula óssea, é necessária para dar lugar às células que são constantemente formadas: é a morte celular programada também denominada de apoptose. Neste processo, em que estão envolvidos vários genes reguladores e uma família de proteases, as caspases, as células são fragmentadas em corpúsculos envolvidos por membrana, com consequente fagocitose pelas células vizinhas, sem resposta inflamatória.

A falha na indução da apoptose contribui para a carcinogénese por permitir a ocorrência de instabilidade genética e a desregulação da atividade dos genes envolvidos no controlo do ciclo celular e dos respetivos pontos de verificação. Durante os processos de regulação, a célula ativa e inativa as proteínas através da adição pelas cinases ou remoção pelas fosfatases dos grupos fosfato, respetivamente. Para maior rapidez e eficácia, as cinases e as fosfatases podem unir-se fisicamente à proteína que modificam, com formação de complexos multiproteína.

O gene p53, conhecido como "guardião do genoma" é um gene supressor tumoral que codifica uma fosfoproteína nuclear que devido às suas funções fisiológicas assegura a integridade genética celular: regulação do ciclo celular, controlo da apoptose e reparação do ADN - figura 10.

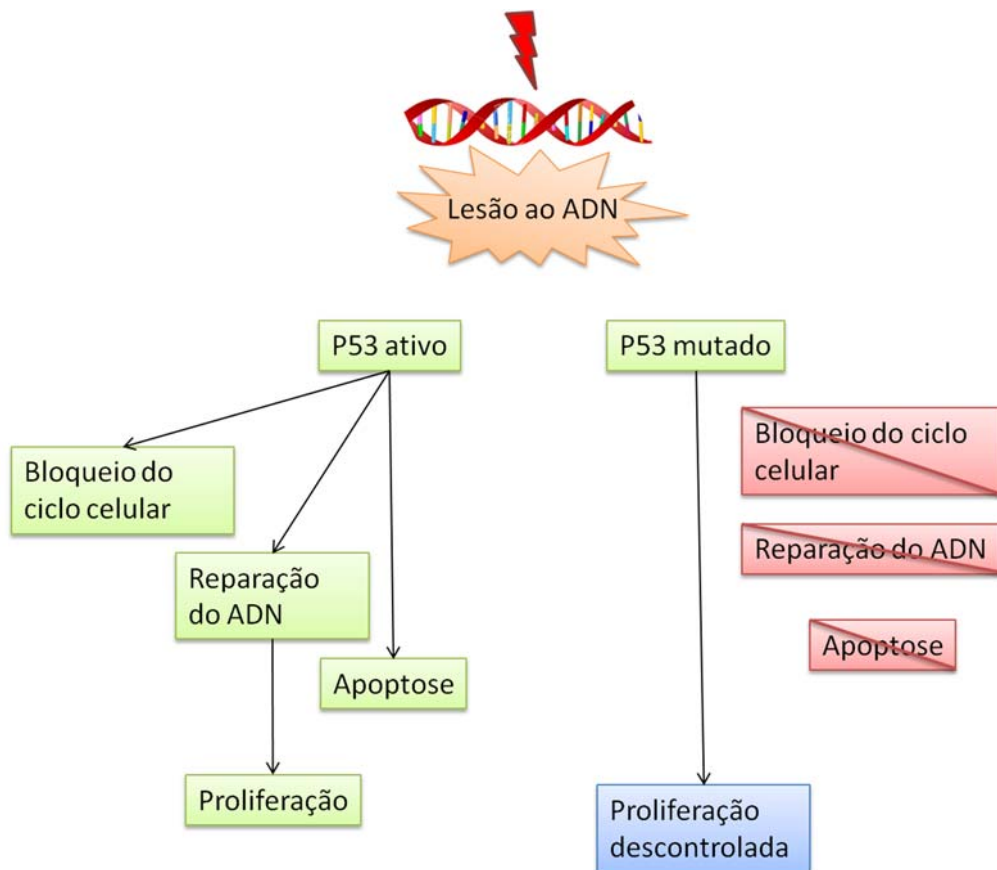


Fig. 10 - Diagrama simplificado do processo de reconhecimento da lesão pelo p53: em condições normais a proteína expressa pelo gene p53 é responsável pela paragem temporária do ciclo celular em G₁ para que ocorra a reparação do ADN, ou se não for possível, a morte celular programada (apoptose). Se o gene estiver mutado, as funções da p53 não são ativadas e o resultado será a proliferação celular descontrolada.

Quando ocorrem danos ao ADN, a proteína p53 é responsável pela paragem temporária do ciclo celular em G₁ para que se proceda à reparação ou, quando isso não é possível, inicia-se o processo de apoptose celular. Deste modo, se ocorrer mutação do gene p53, as funções da proteína podem não ser ativadas e a consequência será a proliferação celular descontrolada. As mutações deste gene estão descritas em mais de 50% dos tumores humanos, conferindo vantagem proliferativa às células portadoras da mutação. A apoptose é um dos processos mais bem estudados na morte celular por ação das radiações ionizantes e depende do p53. Células com mutações neste gene não sofrem apoptose após tratamento com radiações ionizantes, ao contrário do que ocorre em células onde o gene p53 está ativo.

Alterações radio-induzidas: lesões ao ADN

Sendo o ADN o principal alvo da radiação no que diz respeito à indução de danos celulares é importante analisar os mecanismos de alterações que conduzem a alterações génicas ou cromossómicas.

Roturas na cadeia de ADN

No caso de uma rotura de cadeia simples (numa única cadeia) os danos biológicos são facilmente reparados uma vez que é usada a cadeia de ADN oposta como modelo - figura 11 A.

No caso de roturas de cadeia dupla a situação é mais complexa.

Se as duas roturas estiverem bem separadas a reparação ocorre como se se tratassem de duas roturas de cadeia simples, em que o processo de reparação é idêntico ao anterior - figura 11 B.

No caso das duas roturas estarem em locais opostos (figura 11 C) ou apenas separadas por um pequeno número de bases (figura 11 D) a reparação não é possível na medida em que a cromatina se quebra em dois fragmentos. Desta forma as roturas de cadeia dupla são consideradas as lesões do ADN responsáveis pelos efeitos biológicos subsequentes.

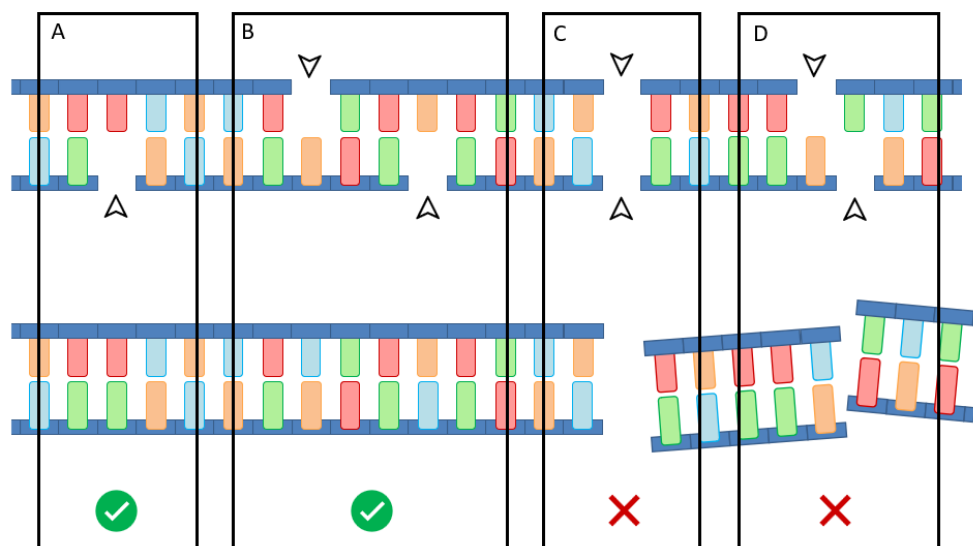


Fig. 11 - Lesões radio-induzidas ao ADN e sua reparação; A - lesão numa única cadeia de ADN; B - lesões separadas nas duas cadeias; C - lesões opostas em ambas as cadeias de ADN; D - lesões nas duas cadeias, próximas entre si

As alterações nos cromossomas, designadas por aberrações cromossómicas, são desvios estruturais ou numéricos dos cromossomas. Existe uma grande diversidade de alterações cromossómicas, e a título exemplificativo apresentam-se dois exemplos na figura 12: uma translocação equilibrada que pode permitir a viabilidade celular (A) e um cromossoma dicêntrico que é letal para a célula (B).

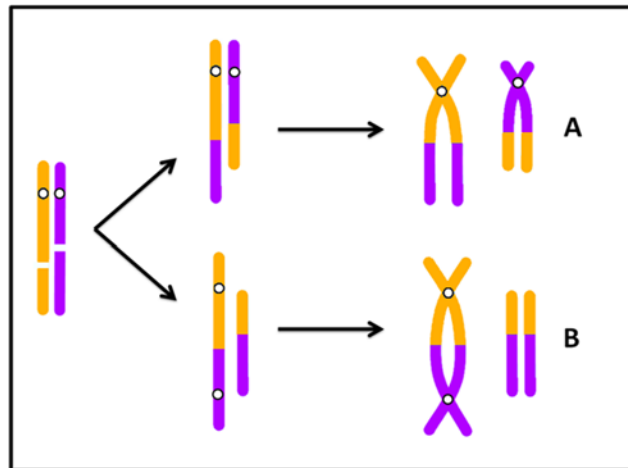


Fig. 12 - Uma translocação equilibrada que pode permitir a viabilidade celular (A) e um cromossoma dicêntrico que é letal para a célula (B).

Na formação de uma translocação equilibrada a radiação induz quebras em dois cromossomas distintos que se vão unir novamente de acordo com a configuração descrita na figura. Esta alteração pode, no entanto, conduzir a ativação de um oncogene, um processo muito frequente nas neoplasias.

Na formação de um cromossoma dicêntrico ocorre uma troca entre dois cromossomas em que as duas partes que contêm os centrômeros se unem originando um cromossoma dicêntrico; os fragmentos remanescentes dos dois cromossomas podem também ligar-se dando origem a um fragmento acêntrico. O resultado traduz-se na morte da célula no processo mitótico subsequente.

Alterações cromossómicas

As alterações cromossómicas nos linfócitos periféricos têm vindo a ser amplamente utilizadas como marcadores da exposição à radiação, através da técnica de dosimetria biológica. Esta técnica permite a estimativa da dose de exposição a radiação ionizante, na ausência de meios que possibilitem o cálculo de dose através da dosimetria física. Foi

utilizada por exemplo para calcular a dose a que os sobreviventes do acidente nuclear de Chernobyl estiveram expostos, em 1986. É utilizada uma técnica citogenética, que quantifica a frequência de aberrações cromossômicas encontradas em linfócitos de amostras do sangue periférico de indivíduos irradiados. A relação entre o número dessas aberrações cromossômicas e a dose absorvida é obtida utilizando-se curvas de dose/efeito, sendo estes dois tipos de aberrações cromossômicas considerados biomarcadores de exposição à radiação ionizante, em que a frequência destes biomarcadores reflete a dose recebida.

A figura 13 apresenta uma curva dose/efeito: como já foi explicado, estas aberrações cromossômicas resultam da interação de duas roturas cromossômicas – componente quadrática da curva. A componente linear resulta da ação de uma partícula única; se as duas ruturas resultarem de partículas diferentes, então a probabilidade de interação é uma função quadrática da dose.

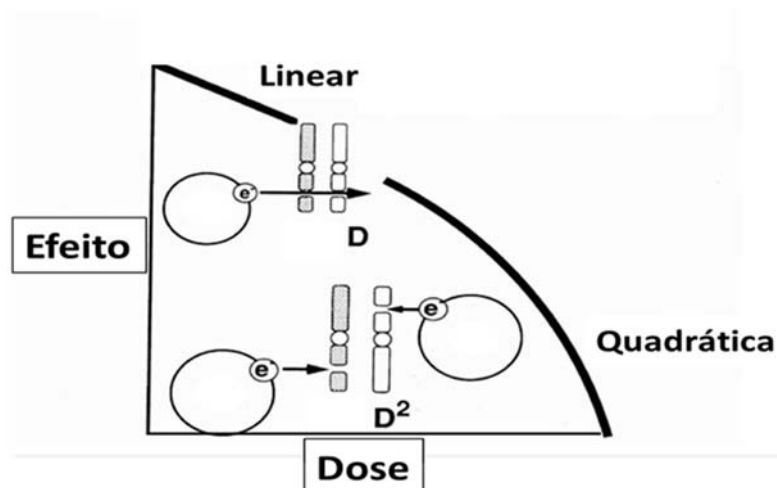


Fig. 13 - As aberrações cromossômicas resultam da interação de duas roturas cromossômicas – componente quadrática da curva. A componente linear resulta da ação de uma partícula única; se as duas ruturas resultarem de partículas diferentes, então a probabilidade de interação é uma função quadrática da dose.

Efeito do Oxigénio, Transferência Linear de Energia e Eficácia Biológica Relativa

Efeito do Oxigénio

Das várias moléculas (agentes químicos e farmacológicos) que modificam os efeitos biológicos da radiação ionizante, nenhuma tem um efeito tão acentuado como o oxigénio.

O oxigénio é um radio sensibilizador universal, uma vez que potencia o efeito biológico da radiação nas células irradiadas: é a influência desta molécula na resposta celular à radiação que define o conceito de “efeito do oxigénio”.

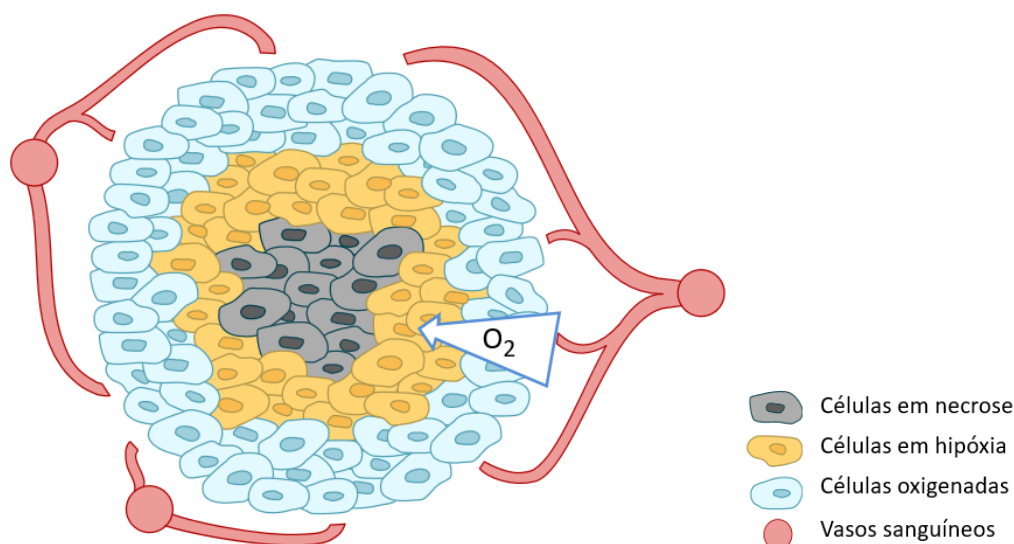


Fig. 14 - Secção transversal de um tumor sólido, mostrando a diminuição da concentração de oxigénio em relação à distância dos vasos capilares. Entre as camadas de células necróticas e células oxigenadas existe uma outra, na qual as células têm uma quantidade de oxigénio suficientemente para manter a viabilidade, embora hipóxicas e mais resistentes à radiação.

Nos tumores, a hipóxia corresponde a uma redução lenta na reoxigenação dos tecidos e encontra-se diretamente relacionada com o crescimento tumoral e com a manutenção da quantidade de células hipóxicas no tumor.

O efeito do oxigénio é descrito numericamente pelo OER (*Oxygen Enhancement Ratio* – Fator de intensificação do Oxigénio), que se define pelo quociente entre a dose de radiação necessária para a célula produzir uma resposta biológica em condições de

hipóxia e a dose que produz a mesma resposta biológica em condições normais de oxigenação:

$$OER = \frac{\text{Dose para produzir um determinado efeito na presença de oxigénio}}{\text{Dose para produzir o mesmo efeito em hipóxia}}$$

Esta razão é de 3 para os raios-X e os eletrões, o que significa que para um mesmo efeito, em condições de hipóxia é necessária uma dose de radiação 3 vezes superior à que seria necessária em condições de oxigenação normais.

O OER é máximo para radiações pouco ionizantes, como por exemplo raios-X, devido ao predomínio do efeito indireto sobre o efeito direto. À medida que a densidade de ionização aumenta, o efeito direto começa a ter cada mais importância, pois o efeito do oxigénio apenas ocorre quando a radiação provoca a formação de radicais livres, ou seja, quando ocorre efeito indireto. Para este efeito ocorrer, e considerando o tempo de formação dos radicais livres, o oxigénio tem de estar presente na altura da irradiação.

Na presença do oxigénio, este vai reagir com os radicais livres, dando origem a um peróxido orgânico, que por sua vez, irá alterar a composição química do DNA, impedindo a reparação das lesões. Considera-se, portanto, que o oxigénio torna as lesões permanentes.

Como podemos observar na figura seguinte, o efeito do oxigénio para as radiações de partículas α e neutrões não é tão acentuado como para as radiações de raios-x ou eletrões.

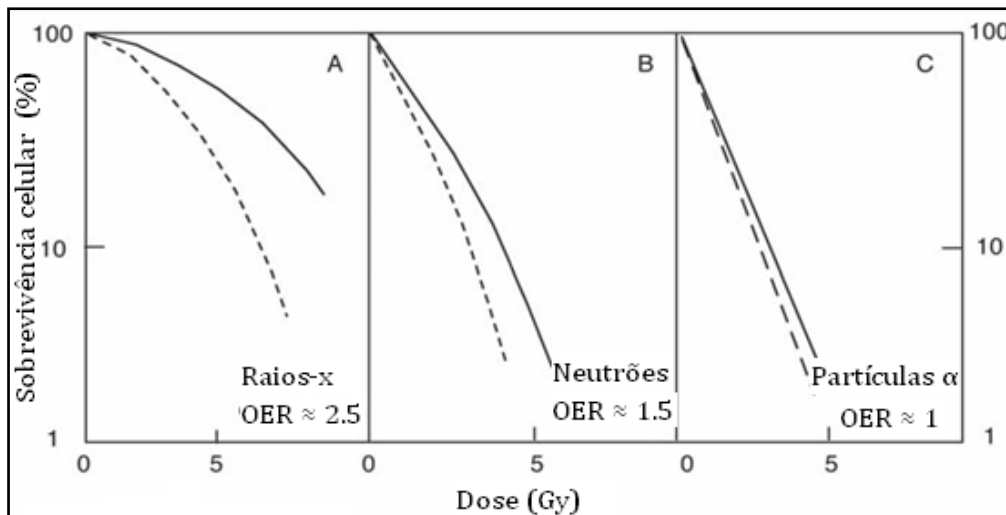


Fig. 15 - Representação de frações de sobrevida celular para diferentes tipos de radiação. As curvas a tracejado correspondem a células bem oxigenadas e as curvas sólidas às células em hipóxia.

As células que apresentam erros nos mecanismos apoptóticos, quer devido à inativação do gene p53 (gene indutor da apoptose), quer devido à expressão exacerbada dos genes inibidores da apoptose, como o bcl-2, apresentam uma maior taxa de sobrevivência em ambientes com baixa concentração de oxigênio, o que aumenta a sua probabilidade de desenvolver instabilidade genética após serem sujeitas à hipóxia e reoxigenação.

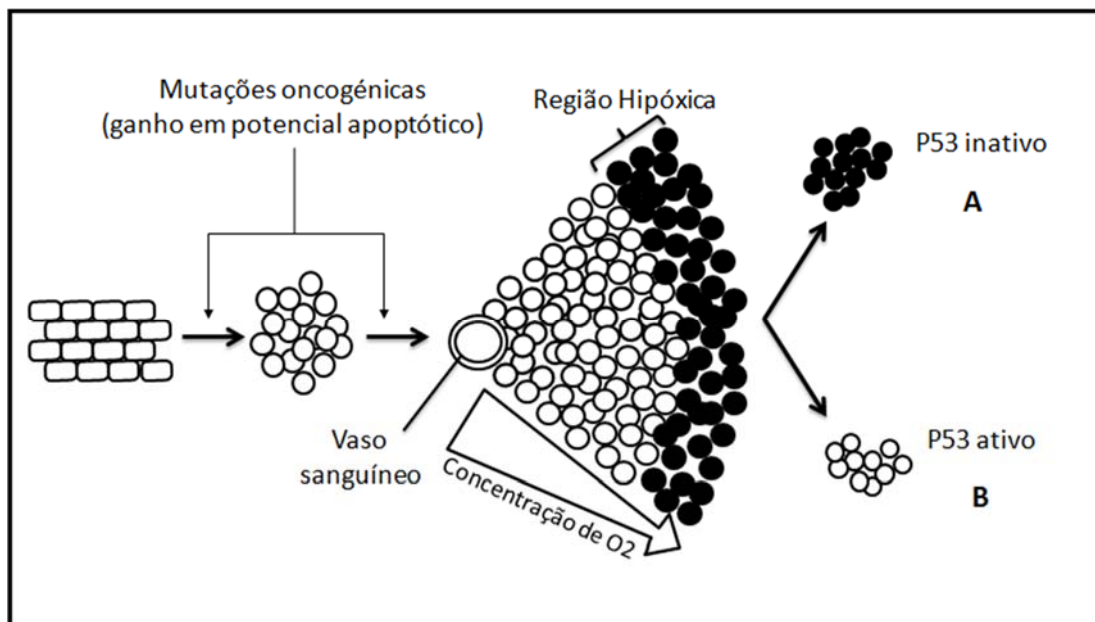


Fig. 16 - Modo como a hipóxia afeta a progressão maligna das células de tumores sólidos, promovendo a instabilidade genética, redução da sensibilidade apoptótica e aumento do potencial metastático (adaptado de Hall e Giaccia, 2018).

Transferência Linear de Energia e Eficácia Biológica Relativa

A transferência linear de energia – *linear energy transfer*- LET é a quantidade de energia que é depositada por partícula carregada que atravessa a matéria. Varia em função da massa e da carga das partículas que constituem a radiação e é expressa em $\text{KeV}/\mu\text{m}$.

A diferentes tipos de radiação correspondem diferentes valores de LET e quanto maior é a transferência linear de energia de uma radiação maior é a sua capacidade de ionização logo, maior a sua capacidade de induzir lesões celulares.

Na figura seguinte é possível demonstrar que o fator OER diminui à medida que o LET aumenta e que nos aproximamos de um $\text{OER}=1$ para um $\text{LET}=150\text{KeV}/\mu\text{m}$.

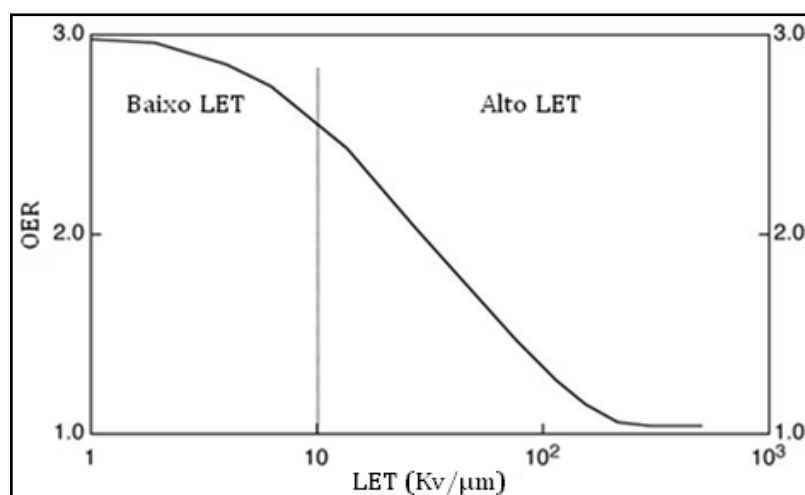


Fig. 17 - Representação da variação do OER com o LET. A linha vertical a tracejado separa a região para um baixo LET (abaixo de $10\text{KeV}/\mu\text{m}$) da região para um alto LET.

A probabilidade de danos biológicos induzidos pela radiação também aumenta com a transferência linear de energia- LET. A eficácia biológica relativa - *Relative Biological Effectiveness* (RBE) compara a dose proveniente de uma irradiação padrão com a dose de uma irradiação teste para o mesmo efeito biológico, os raios X de 250KeV:

$$RBE = \frac{\text{Dose de uma radiação padrão para produzir um efeito biológico}}{\text{Dose de uma radiação teste para produzir o mesmo efeito biológico}}$$

A RBE varia não só com o tipo de radiação, mas também com o tipo de célula ou tecido, dose, taxa de dose e fracionamento da dose. A figura seguinte demonstra a relação da RBE com a LET.

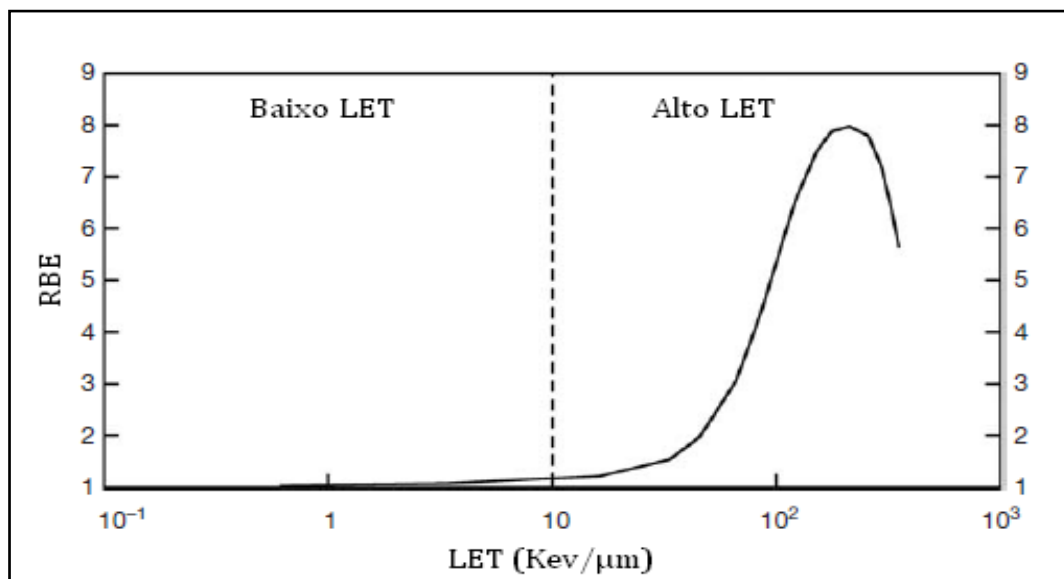


Fig. 18 - Variação do RBE em função do LET. A linha vertical a tracejado separa a região de baixo LET, onde se verifica um $RBE \approx 1$, da região de alto LET, onde se atinge um $RBE = 8$ para um $LET \approx 200 \text{ KeV}/\mu\text{m}$.

Como podemos analisar na figura anterior, a RBE aumenta com o LET, atingindo um máximo de 3-8 (dependendo da taxa de morte celular) para um $LET \approx 200 \text{ KeV}/\mu\text{m}$, diminuído após esse valor devido ao excesso de energia transferida.

Fatores que influenciam a RBE incluem: tipo de radiação, tipo de célula, taxa de dose e condição fisiológica. A RBE depende do LET, sendo maior para radiação de alto LET, já que neste acontece uma grande deposição de energia por unidade de comprimento, havendo assim mais ionizações por unidade de comprimento e maior probabilidade de

roturas nas cadeias de ADN, nomeadamente quebras duplas (maior eficácia biológica relativa).

A RBE varia de forma inversa com o OER, para baixa LET o OER é máximo e a RBE é mínimo e vice-versa. É nos 100keV/ μm onde a RBE é maior já que o espaço médio entre 2 ionizações corresponde ao diâmetro da molécula de ADN.

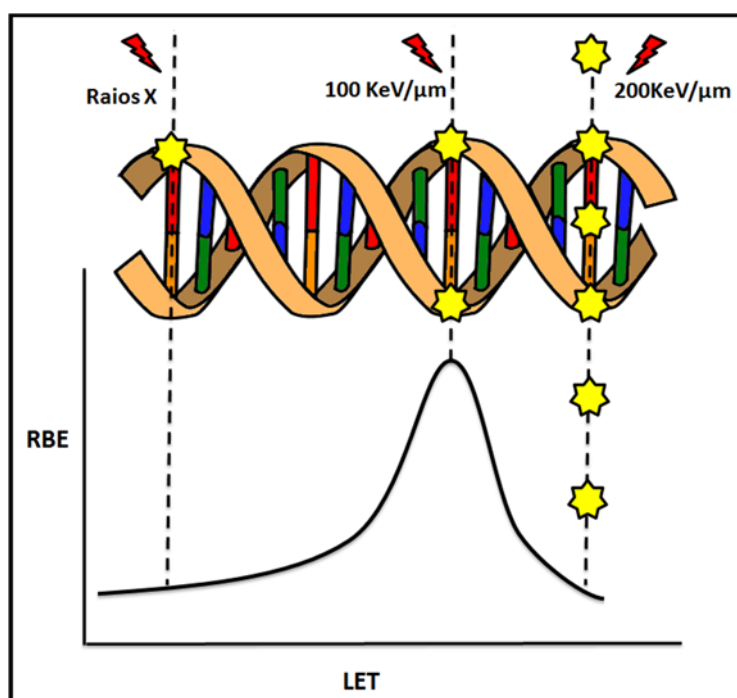


Fig. 19 - A radiação com uma LET de a 100 KeV/ μm , tem a maior eficácia biológica relativa pois a separação média entre as ionizações coincide com o diâmetro da hélice dupla do ADN.

As radiações com uma transferência linear de energia- LET muito elevada, que depositam mais energia do que a necessária para produzir o mesmo efeito, apresentam uma diminuição da eficácia biológica relativa-RBE, pois existe energia desperdiçada. Por outras palavras, quando o LET é superior a 100 KeV/ μm , apesar de uma maior densidade de ionização, ocorre um desperdício de energia que leva à diminuição da RBE (efeito de *overkill*).

Os 5 R's da Radiobiologia

Para além dos fatores moleculares e celulares que determinam a radiosensibilidade celular intrínseca, a complexidade da resposta aumenta com as características dos

tecidos normais envolventes: enquanto as células e os tecidos podem responder de modo distinto à mesma dose de radiação, a resposta de um tecido específico está bem determinada: as respostas tecidulares são essencialmente determinadas pela taxa de proliferação celular e capacidade de repopulação dos tecidos. As respostas tumorais apresentam maior variabilidade do que os tecidos normais e estas diferenças biológicas são exploradas no fracionamento da dose em radioterapia, em que os protocolos derivam empiricamente explorando as diferenças na resposta biológica entre tecidos normais e tumorais à mesma dose de radiação. Os fatores biológicos que influenciam a resposta dos tecidos normais e tumorais à Radioterapia (RT) foram resumidos por Withers (1975), como sendo os "4 R's da Radiobiologia":

Reparação

Reparação do dano subletal causado ao ADN: as células normais são mais eficazes neste processo como é demonstrado pela recuperação celular durante as horas após exposição. A molécula de ADN constitui o alvo das radiações ionizantes devido à sua importância biológica para a célula. A maioria das lesões pode ser reparada através de distintos processos enzimáticos. Caso isso não se verifique os principais efeitos incluem morte celular, mutação e carcinogénese.

Quando as lesões ao ADN ocorrem apenas numa das cadeias são rapidamente reparadas usando a cadeia oposta como molde. Se as duas cadeias forem lesadas mas em locais distantes o resultado é idêntico. Estes danos subletais podem ser reparados desde que não ocorra uma nova irradiação durante o processo. Pelo contrário, se as lesões ocorrem em cadeias opostas ou muito juntas, pode ocorrer uma lesão na cadeia dupla; o resultado é a quebra da molécula. Estas são as lesões cromossómicas mais importantes quando a célula é exposta a radiações ionizantes porque podem originar anomalias cromossómicas que levam à morte da célula na divisão celular subsequente.

A frequência das aberrações cromossómicas é uma função linear-quadrática da dose já que as alterações são consequência da interação de duas roturas separadas. Com doses baixas, as duas roturas podem ser causadas pelo mesmo eletrão; a probabilidade de

ocorrência da alteração é proporcional à dose - D. Com doses mais elevadas as duas roturas podem ser causadas por eletrões distintos, e por isso a probabilidade de ocorrência de uma aberração cromossómica é proporcional ao quadrado da dose - D^2 . Deste modo, a ocorrência da maior parte das alterações cromossómicas radio-induzidas é uma função linear-quadrática da dose.

De todos os mecanismos de resposta à radiação, a reparação é o mais rápido, iniciando-se 15 a 30 minutos após a irradiação e terminando 6 a 8 horas após. Diferentes tipos de células apresentam diferentes capacidades de corrigir um dano induzido pela radiação, tendo-se verificado que algumas células são mais rápidas do que outras a reparar os danos subletais.

Nos tratamentos de Radioterapia, quando se usa o fracionamento convencional, em que são usados intervalos de cerca de 24 horas entre os tratamentos, os danos subletais já se encontram completamente reparados na altura em que as células são submetidas a nova irradiação. Neste ponto é importante diferenciar dois processos que por vezes podem ser erroneamente aceites como sendo o mesmo: reparação e recuperação. Enquanto o primeiro se refere ao processo no qual uma célula corrige um erro induzido pela radiação, por exemplo, corrige quebras do ADN, a recuperação é entendida como a capacidade de um tecido (e não de uma célula) em aumentar a sobrevivência celular ou diminuir o dano causado se for dado tempo suficiente para esse processo ocorrer, como por exemplo, a recuperação de um eritema.

Por um lado, a reparação ocorre devido à correção de danos subletais e pode ser medida por exemplo por uma sequência de irradiações separadas por um intervalo de tempo variável - Figura. 20; por outro lado, a recuperação pode implicar o recrutamento de células que se encontrem numa fase de não-divisão (G_0) para entrarem no ciclo celular e assim compensar a morte celular. Este último processo estará mais relacionado com a repopulação do que propriamente com a reparação.

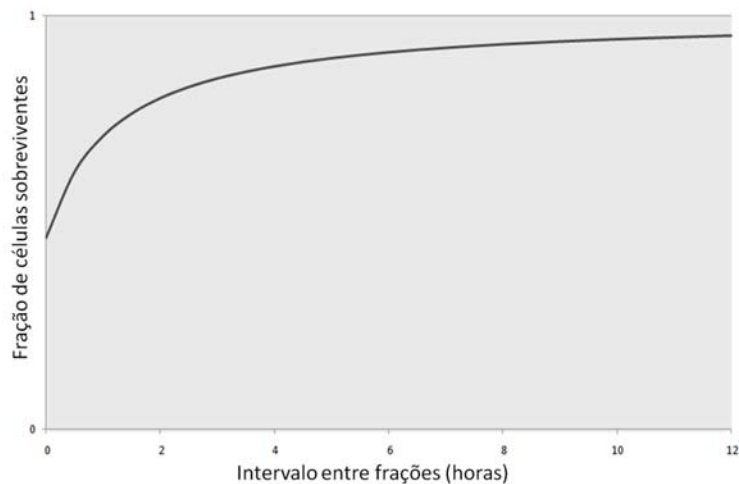


Fig 20. – Relação entre a fracção de células sobreviventes e o tempo de intervalo entre duas fracções.

Redistribuição

A variação da radiosensibilidade durante o ciclo celular e a redistribuição resultante pode ser resumida em 4 premissas:

- As células são mais sensíveis na fase M;
- Se a fase G_1 tiver uma duração suficiente ocorre um período de resistência que diminui à medida que a célula se aproxima da fase S;
- A resistência aumenta durante a fase S, sendo máxima na parte final desta fase;
- Na maioria das células a sensibilidade na fase G_2 é idêntica à da fase M.

A redistribuição de células tumorais clonogénicas para fases mais sensíveis do ciclo celular ocorre como resultado da progressão no ciclo celular: as células sobreviventes a uma primeira exposição (fracção) são as que se encontram numa fase mais resistente do ciclo celular; após algumas horas podem progredir para uma fase mais sensível; as variações na sensibilidade durante o ciclo celular são importantes em RT porque originam uma radio sensibilização que é o resultado desta redistribuição que ocorre durante o tratamento fracionado.

Repopulação

Representa a proliferação celular que ocorre para compensar a população destruída: A repopulação acontece quando, após uma irradiação, as células sobreviventes se dividem para compensar a morte celular causada pela exposição anterior.

Os tecidos normais respondem à morte celular aumentando a sua taxa de proliferação celular. Esta resposta homeostática à perda celular não se verifica apenas após irradiação. No entanto, como nestas condições a morte celular ocorre quando as células tentam a divisão mitótica subsequente, o início deste processo varia para diferentes tecidos e está relacionado com o tempo de ciclo celular das células que formam o tecido. As células da camada basal do epitélio demoram 4 dias a completar o ciclo celular; 8 dias após a irradiação já ocorreu perda celular suficiente para ativar a proliferação acelerada. Nesta altura, o tempo de ciclo celular diminui de 4 dias para 1 dia. Sabe-se também que diferentes tecidos apresentam diferentes respostas à radiação no que toca ao *timing* da repopulação. Os tecidos de resposta tardia não apresentam repopulação em tratamentos com duração até 6-7 semanas, enquanto nos tecidos de resposta rápida uma aceleração da divisão celular ocorre após as primeiras 3-4 semanas.

Nos sistemas de autorrenovação, o período de latência antes da manifestação do dano funcional é independente da dose e está relacionado com o número de células estaminais sobreviventes. Nos tecidos de renovação lenta o período de latência é independente da dose, mas em ambos os tecidos, as respetivas células constituintes podem apresentar o índice proliferativo elevado em resposta a uma depleção celular radio-induzida.

Este fator é extremamente importante quando o tratamento é interrompido, na medida em que, quando se inicia a irradiação, é estimulada a multiplicação acelerada das células quer nos tecidos normais quer no tumor, logo, a interrupção do tratamento leva a um aumento do número de células tumorais que não é compensado. Para se compensar esta pausa e obter o mesmo controlo da doença pode ser necessário implementar medidas de compensação de dose.

Reoxigenação

O microambiente das células tumorais é caracterizado por regiões em que ocorrem pH extracelular diminuído, falta de nutrientes e hipóxia. A concentração de oxigénio (pO_2) varia entre 10 e 80 mm Hg nos tecidos normais enquanto que existem frequentemente regiões tumorais em que o valor de pO_2 é inferior a 5 mm Hg. Isto ocorre devido ao desenvolvimento da vasculatura anormal durante a angiogénese tumoral. Uma percentagem significativa de células tumorais está em regiões hipóxicas onde estão expostas a estas tensões de oxigénio muito baixas. A hipóxia tumoral é muito heterogénea entre tumores, mesmo os que apresentam as mesmas características histológicas e não se correlaciona com os fatores *standard* de prognóstico - dimensão, estágio, grau histológico, etc.

A hipóxia pode desempenhar um papel importante na resposta ao tratamento e pode também afetar a capacidade metastática das células tumorais, como consequência de alterações génicas, como por exemplo os genes que modificam a capacidade de transporte de oxigénio no sangue ou que modificam a vascularização.

A exposição prolongada a hipóxia pode induzir a morte tumoral por apoptose, pois as células com mutações no gene p53 adquirem uma resistência genética à apoptose mediada pela hipóxia, o que sugere que a hipóxia pode favorecer a progressão tumoral selecionando as células com mutações no p53 (Hall e Amato, 2005). Outros estudos sugerem que as células em hipóxia podem desenvolver instabilidade genómica ou que a estas células podem reduzir a funcionalidade de proteínas envolvidas na reparação do ADN.

Após irradiação, células que se encontravam em hipoxia podem tornar-se células oxigenadas por um processo designado de reoxigenação; este processo está relacionado com a morte e remoção das células radiosensíveis oxigenadas do tumor, expondo as células hipóxicas. A reoxigenação dos tecidos é o processo pelo qual as células hipóxicas sobreviventes a uma determinada dose de radiação podem ter acesso ao oxigénio. Reduz a importância da componente hipóxica do tumor, levando a um aumento progressivo da sensibilidade tumoral, no decurso de uma irradiação fracionada. A maior exposição ao oxigénio por parte das células tumorais é a consequência de uma maior

proximidade aos capilares sanguíneos, após a morte de outras células tumorais, que ocorre posteriormente a uma irradiação e repopulação das células sobreviventes. Assim, a difusão do oxigênio para o interior do tumor torna as células mais radiosensíveis. Deste modo, quando a segunda dose de radiação for administrada, as células anteriormente hipóxicas passam a estar em contacto com os vasos sanguíneos, tornando-se oxigenadas e são então destruídas pela fração de dose seguinte – figura 21.

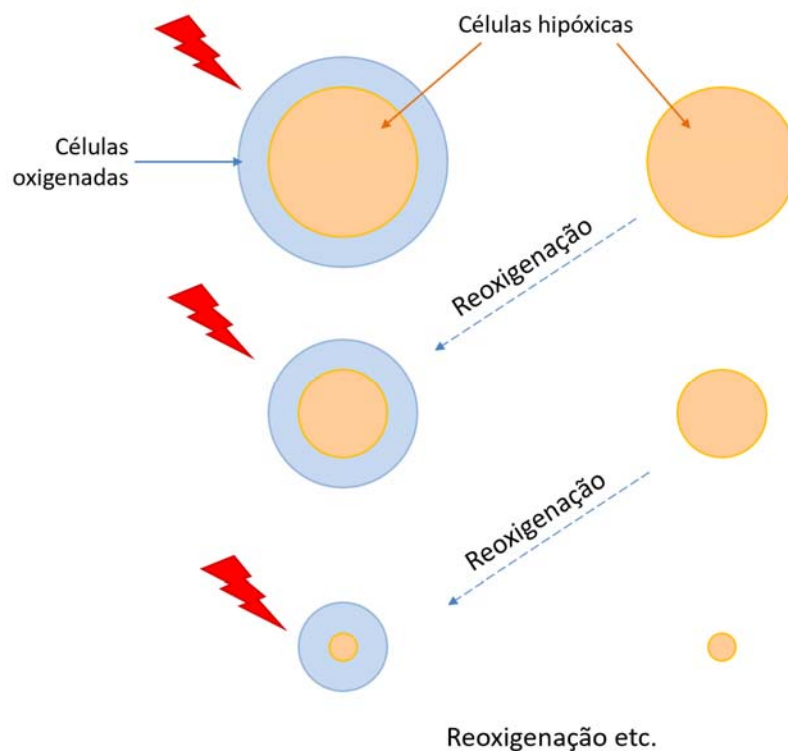


Fig. 21 - Após uma primeira dose no tratamento de RT são eliminadas as células oxigenadas, mais sensíveis; as células tumorais sobreviventes estão em hipóxia mas posteriormente, durante o tratamento, o seu suprimento de O_2 pode melhorar, aumentando a sensibilidade à radiação.

Radiossensibilidade

A divisão da dose em várias frações poupa o tecido normal devido à ocorrência de reparação dos danos subletais e à repopulação celular que ocorre entre as frações. Simultaneamente, o fracionamento permite maiores danos ao tumor causados pela reoxigenação das células hipóxicas e à redistribuição das células para fases mais radiosensíveis do ciclo celular.

Os mecanismos de reparação e repopulação tendem a tornar o tecido mais resistente a uma segunda dose de radiação; os outros, redistribuição e reoxigenação têm o efeito oposto, aumentam a sensibilidade. São estes fatores que modificam a resposta de um tecido às frações de um tratamento de radioterapia - a radiosensibilidade global de um tumor específico depende de um 5º R: Radiossensibilidade (Joiner e van der Kogel, 2009), que traduz o resultado de todos os outros e representa a sensibilidade individual à radioterapia.

Estes cinco fatores fundamentais representam as bases biológicas do fracionamento em RT.

Modelo linear-quadrático

A destruição da integridade reprodutiva das células clonogénicas através da Radioterapia depende de inúmeros fatores, como a dose total, dose por fração, volume de tecido irradiado, a taxa de dose ou a duração total do tratamento.

O modelo linear-quadrático (MLQ) é o modelo mais usado para quantificar o efeito radiobiológico da radioterapia. Este modelo explica a morte celular radio-induzida assumindo a existência de 2 componentes fundamentais: uma componente linear (α), proporcional à dose utilizada, que descreve a parte do gráfico que resulta da morte celular no domínio das interações únicas; e a componente quadrática (β), proporcional ao quadrado desta dose e que descreve o “ombro” da curva associada às várias interações necessárias para induzir morte celular. O conhecimento destes dois fatores e a inclusão dos mesmos em equações relacionadas à curva de sobrevida celular, levou à conclusão que as contribuições linear e quadrática para a morte celular são iguais a uma dose caracterizada pelo índice α/β . Nesta dose, os danos causados por ambos os componentes são idênticos. Este índice α/β é assim utilizado para quantificar a sensibilidade dos tecidos ao fracionamento.

A análise das curvas de sobrevida mostra que, para tecidos de resposta precoce e para tumores em geral, o índice α/β é alto (10 Gy) e caracterizado por uma curva ampla, e que para tecidos de resposta tardia, este índice é baixo (entre 2 e 4 Gy) e caracterizado

por uma curva reduzida (figuras 22 e 23). Esta redução da curva é originada pela componente quadrática (β).

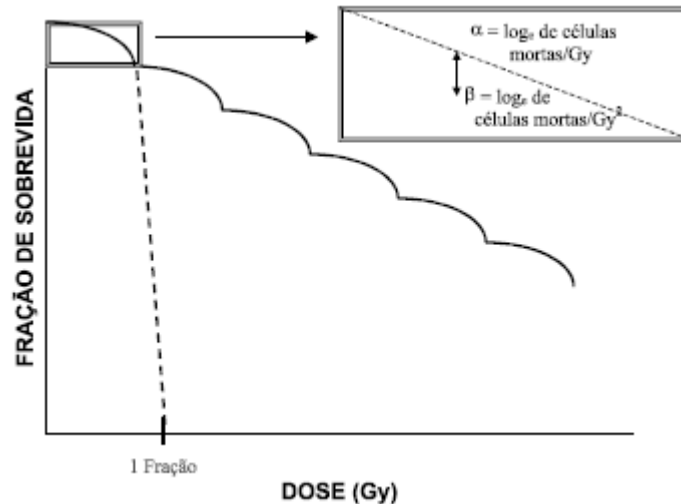


Fig. 22 - Curva de sobrevida clássica para um regime multi-fracionado, no qual a dose total de irradiação é administrada em frações idênticas, separadas por um período de suficientemente longo para permitir a reparação dos danos subletais entre as frações. A curva de sobrevida neste caso é uma função exponencial da dose. O gráfico demonstra a natureza linear-quadrática da curva de sobrevida celular, representado pela equação $S = e^{-(\alpha D - \beta D^2)}$, onde S é a fração de células sobreviventes à dose D, α é o logaritmo de células mortas por Gy da porção linear da curva e β é o logaritmo de células mortas por (Gy)² da componente linear e quadrática da morte celular são iguais, isto é, $\alpha D = \beta D^2$ (adaptado de Hal e Giaccial, 2018).

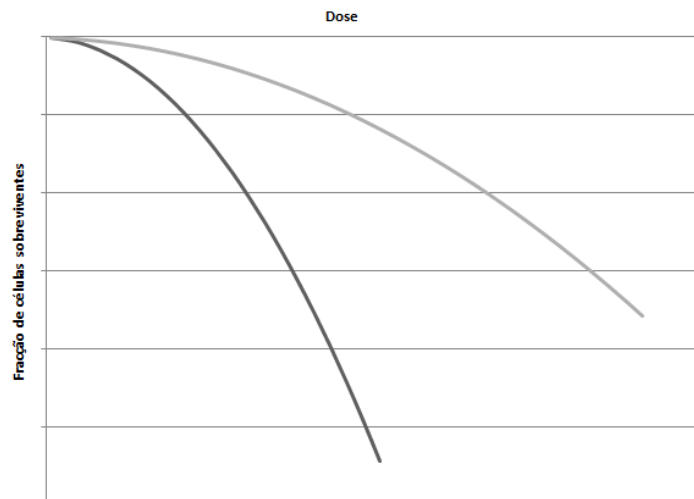


Fig. 23 - Relação Dose-Resposta clássica para tumores e tecidos normais de resposta precoce (preto) e tecidos normais de resposta tardia (cinza). De maneira geral, os tumores encontram-se agrupados juntamente com os tecidos de resposta precoce devido ao seu elevado índice α/β . Para os efeitos precoces, o índice é elevado, devido à dominância de α a doses baixas.

A razão α/β , intrínseca de cada tecido, representa um dos principais fatores do MLQ e revela a sensibilidade que as células apresentam quando ocorre uma variação da dose por fração a que as células são expostas. Diferentes tecidos apresentam diferentes respostas a alterações na dose por fração, tendo sido notada uma grande discrepância entre tecidos de resposta rápida e os de resposta tardia

O parâmetro α representa o declive inicial da curva de sobrevivência celular à radiação e a unidade que é usada é o Gy^{-1} , enquanto β mede-se em Gy^{-2} e reflete a curvatura que a curva apresenta. A razão α/β é a dose de radiação em que a quantidade de morte celular que é diretamente proporcional à dose é igual à morte celular proporcional ao quadrado da dose. Quanto maior a curvatura da curva, menor a razão α/β e maior o efeito do fracionamento nos danos tecidulares. A componente α representa assim a radiosensibilidade intrínseca das células alvo e a componente β representa os danos que podem ser reparados.

A razão α/β é medida em unidades de Gy e apresenta valores mais elevados para tecidos de resposta rápida, como tumores, que apresentam razões α/β de 10Gy, do que para os tecidos normais de reposta tardia (2 a 4 Gy).

Fracionamento em Radioterapia

Os regimes de fracionamento em Radioterapia baseiam-se nos 5 R's da Radiobiologia: a divisão da dose total em várias frações poupa os tecidos normais devido à reparação dos danos subletais entre as frações, permitindo também a repopulação dos tecidos normais. Simultaneamente, esta divisão da dose em frações aumenta os danos tumorais devido à reoxigenação e redistribuição das células nas fases radiosensíveis do ciclo entre as frações do tratamento.

A dose total, a dose por fração, e o tempo total de tratamento representam os parâmetros cruciais do tratamento de Radioterapia. A diferença no formato da curva de sobrevida após exposição à radiação entre tecidos de resposta precoce e tardia mostra que as relações entre a dose total, dose por fração e o número de frações para tecidos normais de resposta tardia (divisão celular lenta), tecidos normais de resposta precoce

(divisão celular rápida) e tumores (idem), fornecem as informações básicas necessárias para a otimização do fracionamento em radioterapia. Considerando estas diferenças entre os tecidos normais, a magnitude da dose por fração é o fator dominante na determinação dos efeitos biológicos tardios. Por outro lado, o número de frações, o intervalo entre as frações e o tempo total de tratamento determinam a resposta aguda dos tecidos à exposição à radiação.

O fracionamento convencional (1,8 a 2 Gy/fração) promove um diferencial terapêutico entre o controle tumoral e as sequelas tardias, ou seja, para as doses convencionais, o fracionamento poupa os tecidos normais de resposta tardia (baixo índice α/β) mais que os tumores, que se comportam como tecidos de resposta precoce (elevado índice α/β). Obtendo-se assim ganho terapêutico. Ou seja grande destruição tumoral com pequeno ganho quer precoce quer tardio dos tecidos normais.

As reacções tardias são muito mais dependentes do tamanho da fracção (dose por fracção) para uma dada dose total, quando compara com as reacções agudas. Tal facto pode ser interpretado em termos radiobiológicos como uma reflexão de um índice α/β menor para as células cuja depleção resulta em reacções tardias. Deste modo, tecidos de proliferação lenta, com elevada quantidade de células na fase G0 do ciclo celular, apresentarão um menor índice α/β e a sensibilidade a grandes doses por fração será maior, em comparação com os tecidos proliferativos que possuam uma significativa quantidade de células em G2/M.

Todos os regimes de fracionamento utilizados em Radioterapia representam um compromisso entre:

- Administrar o maior número de frações que permitam potenciar a diferença na resposta ao tratamento entre as células do tecido normal e tumoral;
- Evitar o aumento do tempo total de tratamento parece assim minimizar as oportunidades de repopulação tumoral durante a radioterapia.

Finalmente, as conclusões de 100 anos de radioterapia clínica ensinaram-nos que:

- ✓ Não existe um regime de fracionamento que seja adequado a todos os tumores ou a todos os doentes;
- ✓ A utilização dos modelos radiobiológicos deve ser sempre acompanhada pela observação clínica;
- ✓ O fracionamento em radioterapia apresenta uma complexa interdependência entre a dose total, a dose por fração, o tempo total de tratamento, o tipo e qualidade de radiação, o volume irradiado e os procedimentos de controlo de qualidade.

Dose Biológica Efetiva (BED)

A dose biológica efetiva (BED) é um modelo que relaciona a resposta biológica do tecido com a dose por fração e a dose total, usado para comparar esquemas de fracionamento (Couto e col, 2011). A BED, medida em unidades de Gy, está relacionada com o logaritmo da fração de células sobreviventes após a irradiação e é calculada pela multiplicação da dose física total pela eficácia relativa, RE (*Relative Effectiveness*), que depende de vários fatores, nomeadamente do fracionamento e do tipo de tecido.

$$BED = D \times RE$$

Dois tecidos diferentes, mas contíguos, que recebem a mesma dose física com o mesmo tipo de radiação, o mesmo fracionamento, etc., apresentam diferentes BED pois esses dois tecidos têm diferentes características radiobiológicas, nomeadamente, razões α/β diferentes.

A diferença entre a dose física e a BED reflete a capacidade potencial de um tecido ser afetado pela radiação.

Para calcular qual a dose total equivalente para compensar uma alteração na dose por fração utiliza-se a equação seguinte:

$$BED = D \left(1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right)$$

Em que D é a dose total e d representa a dose por fração. É importante relembrar que esta fórmula permite calcular a dose equivalente impondo um intervalo mínimo de 8 horas entre as frações, que é o mínimo necessário para que seja considerada que a reparação dos danos subletais seja completa.

Tolerância dos tecidos normais à radiação

Os processos patológicos das lesões radio-induzidas iniciam-se imediatamente após a exposição à radiação ionizante mas as alterações histológicas e clínicas podem não ser aparentes durante semanas, meses ou até anos após o tratamento.

As lesões radio-induzidas são classificadas como efeitos agudos, consecucionais ou tardios de acordo com o período que medeia entre a exposição à radiação e o aparecimento dos sintomas.

- Os efeitos agudos ou precoces são os que são observados durante o tratamento ou até algumas semanas após o seu termo;
- Os efeitos consecucionais surgem mais tarde e são causados por lesões agudas persistentes;
- Os efeitos tardios aparecem meses ou anos após a exposição à radiação.

Os efeitos agudos são mais acentuados em tecidos muito proliferativos e os sintomas são visíveis quando as células funcionais desaparecem responsáveis pela renovação normal do tecido se não são substituídas devido às lesões ao compartimento das células estaminais. Em tecidos como a mucosa intestinal ocorre uma proliferação compensatória nas células estaminais seguida pela substituição das células lesadas/destruídas por células funcionais. Os sintomas tendem a desaparecer ainda durante o tratamento de radioterapia.

As lesões ao ADN frequentemente originam a morte celular na primeira divisão pós-irradiação. Esta morte mitótica é assim causada pelas lesões cromossómicas não reparadas ou erroneamente reparadas. A morte apoptótica é outro dos mecanismos que ocorre durante a interfase após irradiação. Este processo ocorre por exemplo nos linfócitos, células serosas das glândulas salivares e células proliferativas das criptas

intestinais. As células podem também abandonar o ciclo celular por diferenciação: este mecanismo de senescência pode ser importante na resposta dos fibroblastos à radiação, resultando num excesso de deposição de colagénio e fibrose.

Outro tipo de respostas agudas como o eritema cutâneo e o aumento da pressão intracraniana no SNC estão relacionados com a ativação (radio-induzida) de várias vias de sinalização celulares que ativam citocinas pro-inflamatórias, lesões vasculares o que por sua vez pode levar ao desenvolvimento de edema e respostas inflamatórias.

Os efeitos tardios ocorrem em tecidos com uma renovação celular lenta, como por exemplo tecido muscular, hepático e renal. Os tecidos apresentam lesões diversas como fibrose, necrose, atrofia e lesões vasculares.

A organização celular em compartimentos proliferativos e funcionais também tem consequências importantes para a resposta dos tecidos à radiação. Deste modo, os tecidos podem ser divididos em 2 categorias: na primeira categoria - organização celular hierárquica - incluem-se os tecidos que apresentam uma separação clara entre o compartimento proliferativo (que inclui a população de células estaminais, capazes de autorrenovação ilimitada; o compartimento de amplificação - as células que proliferam rapidamente mas apenas durante um número limitado de divisões celulares), e o compartimento das células diferenciadas, responsáveis pelas funções do órgão/tecido. Como exemplos de tecidos mais proliferativos temos os que constituem o sistema hematopoiético, as células da camada basal da epiderme e do revestimento do sistema gastrointestinal.

O início das reações agudas destes tecidos à radiação está correlacionado com o tempo de vida das células funcionais diferenciadas, e a intensidade dessas reações reflete o rácio entre a taxa de destruição das células estaminais e a taxa de regeneração das células clonogénicas sobreviventes.

Na segunda categoria - organização celular flexível - incluem-se os tecidos em que não existe uma separação nítida entre os dois compartimentos, mas em que algumas células diferenciadas também apresentam capacidade de autorrenovação. Neste tipo de órgãos/ tecidos com um baixo índice de proliferação (rim, pulmão), a relação entre a

morte celular e a resposta tecidual é menos evidente porque a lesão do órgão pode ocorrer devido a alterações do tecido vascular, conjuntivo ou do parênquima.

Os efeitos tardios não estão apenas restritos a estes tecidos de renovação celular lenta. Por exemplo, no tecido epitelial, para além das reações precoces podem ocorrer também lesões tardias - fibrose, atrofia e telangiectasia. Deste modo, diferentes tipos de lesões podem ocorrer sequencialmente num órgão ou tecido, resultantes de distintos mecanismos e interações celulares.

A diferença entre efeitos agudos e tardios pode ser explicada pela sua progressão: enquanto os efeitos agudos são rapidamente reparados pela elevada proliferação das células estaminais e podem ser completamente reversíveis, os efeitos tardios podem ser atenuados, mas nunca são reparados na totalidade pois resultam da associação de lesões vasculares com perda de células do parênquima.

Esta distinção tem consequências biológicas relevantes: como as reações agudas ocorrem durante o tratamento convencional de Radioterapia, é possível efetuar as alterações necessárias para permitir a sobrevivência das células estaminais que irão repopular e assegurar a proliferação celular. Os efeitos tardios, que ocorrem meses ou anos após a RT são muito mais sensíveis a alterações no fracionamento do que os efeitos precoces.

A tolerância dos tecidos normais pode ainda ser influenciada por variáveis relacionadas com o tratamento (dose total e dose por fração, taxa de dose, tempo total de tratamento, energia e volume irradiado, utilização de quimioterapia concomitante), com o doente (idade, comorbilidade associada - diabetes, doença vascular, deficiências de reparação do ADN), ou com o órgão em questão (desenvolvimento de toxicidade à radiação, variação na radiosensibilidade intrínseca do órgão).

Otimização biológica da Radioterapia

Existe uma grande variação na resposta individual dos doentes à radioterapia, tendo já sido confirmada experimentalmente a correlação entre o controlo tumoral e a sensibilidade das respetivas linhas celulares à radiação. É por isso necessário avaliar o

papel da radiosensibilidade tumoral na determinação da eficácia do tratamento. A demonstração de que alguns tumores são mais radiosensíveis que outros permitirá identificar subgrupos de doentes. O reconhecimento destes subgrupos com bom ou mau prognóstico é deste modo importante no planeamento e interpretação de ensaios clínicos com o objetivo de otimizar e individualizar o tratamento.

Vários fatores são preditivos da radio curabilidade em RT e são já utilizados na prática clínica. Para além da extensão da doença e do tamanho do tumor primário na altura do diagnóstico, outros fatores têm sido individualmente considerados (idade, presença de anemia, grau e tipo histológico), mas em muitos casos não é possível prever com exatidão a evolução da doença. É por isso necessário identificar parâmetros biológicos que permitam desenvolver estratégias individualizadas de tratamento capazes de aumentar a probabilidade de controlo tumoral, mantendo a toxicidade a um nível aceitável

Durante os últimos anos a contribuição da radiobiologia para o conhecimento da resposta molecular à radiação e dos seus mecanismos subjacentes permitiu a sua implementação na estratégia dos tratamentos em radioterapia.

O melhor conhecimento do prognóstico tumoral e da resposta à terapia através do estudo dos genes responsáveis pelo controlo do ciclo celular, proliferação e apoptose/reparação do ADN permitiu identificar novos genes envolvidos na resposta ao tratamento que apresentam uma expressão distinta nos tecidos normais e tumorais Por outro lado, a avaliação da taxa de proliferação e da hipóxia tumoral com recurso à PET/CT permite modificar os volumes alvo e avaliar as variações do volume tumoral durante o tratamento permitindo uma distribuição adaptativa da dose de radiação.

Deste modo, o progresso na radiobiologia molecular possibilita novas vias na prescrição de uma radioterapia otimizada para o doente individual, decidindo como e quando a radioterapia é administrada, com uma precisão e eficácia nunca antes possíveis.

Para saber mais:

Hall E, Giaccia AJ. (2018) Radiobiology for the Radiologist (8ª ed). EUA: Lippincott. ICRP.