Juliana Castro Dourado Pinezi

**Efeitos colaterais tardios na bexiga após radioterapia por câncer de
colo de útero: avaliação da associação com polimorfismos de *TP53*,
ATM e *MDM2***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Programa de: Radiologia
Orientadora: Prof.^a Dra. Heloisa de Andrade Carvalho

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de novembro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2014

Juliana Castro Dourado Pinezi

**Efeitos colaterais tardios na bexiga após radioterapia por câncer de
colo de útero: avaliação da associação com polimorfismos de *TP53*,
ATM e *MDM2***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Programa de: Radiologia
Orientadora: Prof.^a Dra. Heloisa de Andrade Carvalho

São Paulo

2014

Pinezi, Juliana Castro Dourado

Efeitos colaterais tardios na bexiga após radioterapia por câncer de colo útero: avaliação da associação com polimorfismo de *TP53*, *ATM* e *MDM2* / Juliana Castro Dourado Pinezi. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Radiologia.

Orientadora: Heloísa de Andrade Carvalho.

Descritores: 1.Genes p53 2.Proteínas mutadas de ataxia telangiectada
3.Ubiquitina-proteína ligases 4.Radiação ionizante 5.Neoplasias do colo do útero
6.Radioterapia 7.Cistite 8.Braquiterapia

USP/FM/DBD-303/14

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus três filhos, Giancarlo, Giovanni e Giuliano, que são minha razão e força para nunca desistir e continuar sempre seguindo em frente. Vocês são os maiores orgulhos da minha vida. Amo vocês !!!

Dedico uma homenagem muito especial a Giuliano Machado Pinezi por todo o apoio nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

À Deus por me dar os meios e os caminhos para concluir mais este projeto.

À Dra. Heloisa de Andrade Carvalho, minha orientadora, que me deu mais que sua grande experiência e sabedoria, sua amizade e compreensão.

Aos meus pais, Francisco e Criseide, e minha irmã Luciana, por me darem condições de chegar a este ponto e ao meu pai também por participar da pesquisa colaborando como ginecologista oncológico com sua experiência e enorme disposição.

À minha grande amiga Dra. Renata de Bastos Ascenço Soares, que esteve ao meu lado como pesquisadora, colaboradora, incentivadora e, mais que tudo, amiga.

Aos amigos e parceiros que colaboraram de diversas formas para que este trabalho pudesse se realizar: Dr. Théo Rodrigues da Costa, Enfa. Graziella Dias Pinheiro Machado, Dra. Patrícia Simon, Dra. Mariana Torminn e Sra. Vera Lúcia.

À FAPESP pelo auxílio financeiro para este projeto.

À FINEP pelo convênio Genoprot que viabilizou a estrutura do laboratório utilizado.

Epígrafes

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo.”

Winston Churchill

**“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer
um pode começar agora e fazer um novo fim.”**

Chico Xavier

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Símbolos dos genes de acordo com a *Human Genome Organisation - HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)* Disponível em: <http://www.genenames.org/>. E das proteínas de acordo com a Universal Protein Resource (UniProt) disponível em: <http://www.uniprot.org/>.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa conforme Decreto nº 6.583, de 29 de setembro de 2008.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	xii
Resumo	xix
1. INTRODUÇÃO.....	xix
1.1-Epidemiologia do câncer de colo de útero	1
1.2-Importância da radioterapia no tratamento do câncer de colo uterino .	3
1.3 - Efeitos colaterais agudos e tardios da radioterapia.....	8
1.4- Dose Biológica Efetiva (BED).....	15
1.5- Efeito biológico da radiação ionizante e mecanismos de reparo do DNA.....	16
1.5.1-Reparo por excisão de base (BER)	20
1.5.2-Reparo por excisão de nucleotídeo (NER)	23
1.5.3-Reparo de pareamento errôneo (MMR).....	25
1.5.4-Reparo por junção de extremidades não-homólogas (NHEJ)	27
1.5.5- Recombinação homóloga (HR)	29
1.6- Radiossensibilidade: Dano ao DNA, apoptose e reparo	33
1.7- O Gene <i>TP53</i>	35
1.8- Gene <i>MDM2</i>	42
1.9-Gene ATM.....	47
2. OBJETIVOS.....	54
3. METODOLOGIA	55
3.1 - Aspectos éticos	55
3.2-Seleção de pacientes.....	55
3.2.1 - Critérios de inclusão	56
3.2.2 - Critérios de exclusão	56
3.3 - Tratamento realizado	58
3.3.1 - Técnica da Teleterapia	58
3.3.2 - Técnica da Braquiterapia.....	58
3.4 - Classificação da toxicidade	60
3.5 - Estimativa de dose na bexiga	61
3.6 - Obtenção das amostras de sangue e extração de DNA genômico..	62
3.7 - Amplificação das regiões gênicas de <i>TP53</i> , <i>ATM</i> e <i>MDM2</i>	63
3.8- Reação de Sequenciamento por Extensão de Base Única.....	68
3.9 - Análise estatística	70
4. RESULTADOS.....	72
5. DISCUSSÃO.....	86
6. CONCLUSÕES.....	97
7. ANEXOS	98
8. REFERÊNCIAS	103

Lista de Figuras

Figura 1 - Mudanças histológicas na pele e no músculo durante a evolução na escala da inflamação, fibrose, alterações vasculares e celulares após a radiação.	12
Figura 2 - Demonstração gráfica da evolução na escala da inflamação, fibrose, alterações vasculares e celulares após a radiação na pele e no músculo (controle 0Gy e irradiados 30Gy).	13
Figura 3 - Epitélio da bexiga em aumento de 100 e 400x.	13
Figura 4 - Genes envolvidos na via de Reparo por excisão de base (BER). ..	22
Figura 5 - Genes envolvidos na via de Reparo por Excisão de Nucleotídeo (NER).	24
Figura 6 - Genes envolvidos na via de Reparo de Pareamento Errôneo (MMR).	26
Figura 7 - Genes envolvidos na via de reparo do DNA por junção de extremidades não-homólogas (NHEJ).	28
Figura 8 - Genes envolvidos na via de reparo do DNA por Recombinação Homóloga (HR).	31
Figura 9 - Proteínas da Recombinação homóloga e suas interações na via do <i>ATM</i>	32
Figura 10 - Localização Genômica do gene <i>TP53</i>	37
Figura 11 - Genes envolvidos na via do <i>TP53</i>	38
Figura 12 - Genes envolvidos na via da apoptose do <i>TP53</i>	40
Figura 13- Localização Genômica do gene <i>MDM2</i>	43
Figura 14 - Região promotora do gene <i>MDM2</i> e localização do SNP309....	44
Figura 15 - Localização Genômica do gene <i>ATM</i>	47
Figura 16 - Rede de interações da proteína <i>ATM</i> após sinalização de dano ao DNA.	52
Figura 17 - Sistema de aplicadores usados na braquiterapia intracavitária de alta taxa de dose.	60
Figura 18 - A extração de DNA a partir do sangue periférico realizada com equipamento <i>iPrep™</i>	64

Figura 19 - Imagens de cistoscopias de três pacientes do estudo, portadoras de carcinoma de colo uterino, após terem sido submetidas à teleterapia (45 Gy) e braquiterapia de alta taxa de dose (28 Gy/ 7 Gy por inserção)..... 77

Figura 20 - Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% da integridade e quantificação do DNA genômico extraído das primeiras 36 pacientes. 82

Figura 21 - Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% dos produtos da PCR da região em estudo do gene *ATM* das 50 pacientes 82

Lista de Tabelas

Tabela 1. Descrição das sequências dos oligonucleotídeos iniciadores.....	67
Tabela 2. Caracterização da amostra pelos dados clinicodemográficos, hábitos de vida e tipo de tratamento realizado	74
Tabela 3. Avaliação do tabagismo e de outras variáveis relacionadas a outros tratamentos realizados e sua relação com os efeitos urinários tardios considerando as quatro variáveis analisadas separadamente (n = 50)	75
Tabela 4. Efeitos tardios na bexiga (LENT-SOMA) segundo dados colhidos pelas respostas ao prontuário, questionário e maior grau relatado e segundo o resultado da cistoscopia (n = 50).....	76
Tabela 5. Dose biológica efetiva na bexiga por tratamento realizado considerando dois valores distintos do α/β de acordo com o resultado da cistoscopia (n = 50).....	78
Tabela 6. Dose biológica efetiva na bexiga por tratamento realizado considerando dois valores distintos do α/β de acordo com a graduação na escala LENT-SOMA em relação aos dados registrados no prontuário (n = 50).....	79
Tabela 7. Dose biológica efetiva na bexiga por tratamento realizado considerando dois valores distintos do α/β de acordo com a graduação na escala LENT-SOMA em relação aos relatados no questionário (n = 50).....	79
Tabela 8. Dose biológica efetiva na bexiga por tratamento realizado considerando dois valores distintos do α/β de acordo com a graduação na escala LENT-SOMA em relação ao de maior grau relatado (n = 50).....	80
Tabela 9. Genotipagem dos três polimorfismos genéticos das pacientes portadoras de câncer de colo de útero pela técnica de SNaPshot® (n=50). 81	
Tabela 10. Avaliação dos três polimorfismos genéticos pela técnica de SNaPshot® e sua relação com os efeitos urinários tardios considerando as quatro variáveis analisadas separadamente (n=50)	83
Tabela 11. Avaliação do <i>MDM2</i> (SNP309T→G) e sua relação com a intensidade da cistite diagnosticada pela cistoscopia classificada conforme a escala do LENT-SOMA (n=50).	84
Tabela 12. Avaliação do <i>MDM2</i> (SNP309T→G) e sua relação com o genótipo <i>TP53</i> (P72R) (n=50).....	85

Tabela 13. Porcentagem da cistite diagnosticada pela cistoscopia em relação ao genótipo do SNP309 do gene <i>MDM2</i> agrupando as pacientes pelo genótipo do códon 72 do gene <i>TP53</i> (n=50).....	85
--	----

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

3D-CRT: do inglês, *3D Conformal radiotherapy* (Radioterapia conformacional tridimensional)

ACCG: Associação de Combate ao Câncer em Goiás

Arg: Aminoácido Arginina

Asn: Aminoácido Asparagina

Asp: Aminoácido Ácido aspártico

AT: Ataxia-telangiectasia

ATM: *Ataxia telangiectasia mutated* (Ataxia telangiectasia mutado)

ATR: *Ataxia telangiectasia and Rad3 related* (Ataxia telangiectasia e Rad3 relacionado)

BED: *Biological effective dose* (Dose biológica efetiva)

BER: *Base Excision Repair* (Reparo por excisão de bases)

BR: *Basic region* (Região Básica)

BLM: Bloom syndrome, RecQ helicase-like (Síndrome de Bloom, semelhante a RecQ helicase)

53BP1: *tumor protein p53 binding protein 1* (proteína de ligação à proteína p53)

BRCA1: *Breast cancer 1 gene* (Gene 1 do câncer de mama)

BRCA2: *Breast cancer 2 gene* (Gene 2 do câncer de mama)

CACON: Centro de atendimento de alta complexidade em oncologia

CEP-ACCG: Comitê de ética em pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás

CHEK1: *Checkpoint Kinase 1* - antigo *CHK1* (ponto de checagem da quinase 1)

CHEK2: *Checkpoint Kinase 2* - antigo *CHK2* (ponto de checagem da quinase 2)

CTV: *clinical target volume* (volume alvo clínico)

CYP2D6: Citocromo P450, família 2, subfamília D, polipeptídeo 6

DBD: *DNA binding domain* (Domínio de ligação do DNA)

DNA: *Desoxiribonucleic acid* (ácido desoxiribonucleico)

dNTP: Desoxiribonucleotide *triphosphate* (desoxiribonucleotídeo trifosfato)

DSB: Double Strand Break (quebras de fita dupla no DNA)

EPDR1: *Ependymin related protein 1* (proteína 1 relacionada à ependimina)

ERCC2: *Excision repair cross-complementing 2* (Reparo por excisão complementar cruzada 2)

ESTRO: *European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* (Sociedade Europeia para Radioterapia e Oncologia)

GEC: *Groupe Européen de Curiethérapie* (Grupo Europeu de Curieterapia)

GEC-ESTRO: *Groupe Européen de Curiethérapie (GEC)* e o *European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* (Grupo Europeu de Curieterapia - Sociedade Europeia para Radioterapia e Oncologia)

GWA: *Genome wide association* (associação genômica ampla)

Gy: Gray (unidade do Sistema Internacional para dose absorvida, sendo $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$)

HAJ: Hospital Araújo Jorge

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

HPV: *Human papiloma virus* (papilomavírus humano)

HR: Homologous recombination (Recombinação homóloga)

HT: Hormonioterapia

HUS1: *HUS1 checkpoint homolog (S. pombe) [Homo sapiens]* - homólogo do ponto de checagem *HUS1* da *S. pombe*

ID3: *Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein* (inibidor de ligação de DNA 3, proteína hélice-alça-hélice negativa dominante)

IGRT: *Image guided radiotherapy* (Radioterapia Guiada por imagem)

IMRT: *Intensity modulated radiotherapy* (Radioterapia de intensidade modulada)

INCA: Instituto Nacional de Câncer

LIG4: Ligase IV, DNA, ATP-dependente

MAPK: *Mitogen activated protein kinase* (proteinoquinase ativada por mitógeno)

MDC1: *mediator of DNA-damage checkpoint 1 (mediador do ponto de checagem de dano no DNA 1)*

MDM2: *MDM2 Oncogene, E3 ubiquitin protein ligase (MDM2 Oncogene, ubiquitina-proteína ligase E3)*. Significado da sigla *Murine double minute 2* (Minuto Duplo Murino 2).

Mre11A: *Double-strand break repair protein MRE11A* (proteína de reparo de quebra de dupla fita MRE11A)

miRISC: *microRNA associated with RNA-Induced Silencing Complex*
(*miRNAs associado a Complexo de silenciamento de RNA*)

miRNA: microRNA (microácido ribonucleico)

MMR: *Mismatch Repair* (reparo do emparelhamento errôneo de DNA)

mRNA: *Messenger ribonucleic acid* (ácido ribonucleico mensageiro)

NER: *Nucleotide Excision Repair* (Reparo por excisão de nucleotídeos)

NHEJ: *Non-homologous end joining* (Reparo por junção de extremidades não-homólogas)

NBN: *Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin)* (Síndrome de Quebra de Nijmegen) – *NBS1* é um outro nome usado

Nbs1: *Nijmegen breakage syndrome 1 protein* (proteína da Síndrome de Quebra de Nijmegen)

NLS: *Nuclear localization signal* (sinal de localização nuclear)

NMD: *Nonsense-mediated decay* (decaimento mediado por códons sem sentido)

OD: *Oligomerization domain* (Domínio de oligomerização)

p13: Proteína p13 - proteína de massa molecular de 13 kDa (quilodalton)

P13: sinônimo do *EXOSC1 (exosome component 1)* – componente do exossomo 1

p14: Proteína p14 - proteína de massa molecular de 14 kDa (quilodalton)

P14: *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (símbolo oficial: *CDKN2A*) - Inibidor de quinase ciclina-dependente 2A. Outros sinônimos: *ARF*, p16 e p19.

p21: Proteína p21 - proteína de massa molecular de 21 kDa (quilodalton)

P21: sinônimo do *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A* (símbolo oficial: *CDKN1A*) - Inibidor de quinase ciclina-dependente 1A. Outros sinônimos: *WAF1* e *CIP1*

p38: Proteína p38 - proteína de massa molecular de 38 kDa (quilodalton)

P38: sinônimo da *mitogen-activated protein kinase 14* - *MAPK14* (proteína quinase ativada por mitógeno 14).

p53: Proteína p53 - proteína de massa molecular de 53 kDa (quilodalton) ou Proteína supressora de tumor p53

PAH: *phenylalanine hydroxylase* (fenilalanina hidroxilase)

PCR: *Polimerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PET-CT: *Positron emission tomography - computed tomography* (Tomografia por Emissão de Pósitrons – tomografia computadorizada)

PIN3: *polymorphism in intron 3 of the TP53* (Polimorfismo no íntron 3 do *TP53*)

Pro: Aminoácido Prolina

PSA: *Prostate specific antigen* (Antígeno prostático específico)

PUMA: *p53 up-regulated modulator of apoptosis gene*. Sinônimo de *BBC3* (símbolo oficial) derivado do inglês *BCL2 binding component 3* (componente de ligação do *BCL2*)

RAD1: *RAD1 homolog (S. pombe)* (RAD1 homóloga a *S. pombe*)

RAD9: símbolo anterior de *RAD9A* - *RAD9 homolog A (S. pombe)* (RAD9 A homóloga a *S. pombe*)

RAD17: *RAD17 homolog (S. pombe)* (RAD17 homóloga a *S. pombe*)

RAD50: *RAD50 homolog (S. cerevisiae)* (RAD50 homóloga a *Saccharomyces cerevisiae*)

RAD51: *RAD51 homolog (S. cerevisiae)* (RAD51 homóloga a *Saccharomyces cerevisiae*)

RNA: *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

RNM: Ressonância nuclear magnética

RTOG: *Radiation Therapy Oncology Group*

SART1: *Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 1* (Antígeno de carcinoma escamoso reconhecido por células T tipo 1)

Ser: Aminoácido Serina

Sítio AP: Sítios apurínico/apirimidínico

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de base única)

SOD2: *superoxide dismutase 2* (gene da enzima desmutase superóxida 2, mitocondrial)

SSB: *single strand break* (quebra de fita simples)

SUS: Sistema Único de Saúde

TAD: *Transactivation domain* (domínio de transativação)

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGFB1: *transforming growth factor beta 1* (fator de transformação do crescimento beta 1)

TGI: Trato gastrointestinal

TP53: *tumor protein p53* (proteína tumoral p53)

TU: Trato Urinário

UV: Ultravioleta

XRCC1: *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1* (Reparo de raio-X complementando defeito de reparo em células 1 de hamster Chinês)

XRCC3: *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3* (Reparo de raio-X complementando defeito de reparo em células 3 de hamster Chinês)

Resumo

Pinezi JCD. **Efeitos colaterais tardios na bexiga após radioterapia por câncer de colo de útero: avaliação da associação com polimorfismos de *TP53*, *ATM* e *MDM2*.** [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: Na prática clínica se observa que há diferenças na incidência de efeitos colaterais entre pacientes submetidos ao mesmo esquema terapêutico de radioterapia. Tais diferenças podem ser entendidas como uma radiosensibilidade individual determinada geneticamente. Objetivos: Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos tardios na bexiga em pacientes com câncer do colo uterino tratadas com radioterapia, com ou sem cirurgia, e o valor prognóstico de três polimorfismos genéticos de base única com relação ao desenvolvimento de cistite actínica. Material e métodos: Foi realizada uma análise retrospectiva de 50 pacientes com carcinoma cervical tratadas entre 1999 e 2004, com um mínimo de 6,5 anos de seguimento. A dose de radioterapia na bexiga foi considerada como a soma da dose da radioterapia externa com a dose de braquiterapia no ponto de bexiga definido pelo ICRU 38 (Relato número 38 da Comissão Internacional de Unidades e Medidas em Radiação). Para as correlações entre dose e efeito, foi calculada a dose biológica efetiva (BED) para cada caso. Para a avaliação dos efeitos tardios em bexiga, além dos dados descritos em prontuário, foi feito um questionário específico dirigido aos sintomas urinários, foi realizada cistoscopia em todas as pacientes e a escala LENT-SOMA (efeitos tardios no tecido normal/ subjetivo-objetivo tratamento e

exames) foi aplicada, utilizando o pior grau do efeito encontrado nos diferentes métodos de avaliação. Variantes genéticas do códon 72 da p53 (Arginina / Prolina), *MDM2* SNP309 T/G e *ATM*ex39 5557 G>A foram identificadas usando o método de genotipagem de SNP ABI SNaPshot e os resultados foram correlacionados com a incidência e grau de cistite actínica. Resultados: Complicações clínicas tardias da bexiga foram registradas em 17 (34%) pacientes usando dados coletados dos prontuários e em 41 (82%) pacientes pelo questionário de existência e gravidade dos efeitos tardios da irradiação. Essas complicações foram diretamente correlacionadas com a BED. Vinte e oito pacientes (56%) desenvolveram cistite diagnosticada por cistoscopia (16% Grau 2-4). *MDM2* SNP309 TT associado a *TP53* (P72R) GG foram relacionados com o aumento da incidência de cistite. Conclusões: Cistite actínica, em grau 2 ou maior, foi elevada nessa população e apresentou uma maior incidência quando realizado um questionário específico para tal. Houve associação com maior dose de radioterapia (BED Gy₃ > 100 Gy) e com *MDM2* SNP309 TT associado a *TP53* (P72R) GG.

Abstract

Pinezi JCD. **Late urinary bladder side effects after radiotherapy for cervical cancer: evaluation of the association with *TP53*, *ATM* and *MDM2* polymorphisms.** [Thesis] São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Introduction: In clinical practice it is observed that there are differences in the incidence of side effects among patients undergoing the same regimen of radiotherapy. Such differences can be understood as a genetically determined individual radiosensitivity. Purposes: This study aimed to evaluate urinary bladder late effects in patients with uterine cervix cancer treated with radiotherapy with or without surgery and the prognostic value of three single nucleotide polymorphisms (SNPs) related to radiation cystitis. Material and methods: retrospective analysis of 50 patients with cervical carcinoma treated between 1999 and 2004 with a minimum of 6.5 years of follow-up was performed. The radiation dose in the bladder was considered as the dose delivered by external beam irradiation plus the brachytherapy dose in the ICRU Report 38 (International Commission of Radiation Units and Measurements report number 38) bladder point. For dose-effect correlations the biological effective dose (BED) was calculated for each case. For evaluation of bladder late effects, besides the data collected from the charts review, a specific query directed to urinary symptoms was applied to the patients and also a cystoscopy was performed in all of them. The LENT-SOMA (late effects of normal tissues/subjective-objective management

analytic) scale for bladder late effects was applied. Genetic variants of p53 codon72 (arginine/proline) polymorphism, MDM2 SNP309 T/G and ATMex39 5557G>A were identified by using ABI SNaPshot SNP genotyping method. And the results were correlated with the incidence and grade of radiation cystitis. Results: Clinical late bladder complications were recorded in 17 (34%) patients using data collected from the charts and in 41 (82%) patients by the questionnaire for the existence and severity of late irradiation effects. These complications were directly related with the BED. Twenty eight patients (56%) developed cystitis diagnosed by cystoscopy (16% Grade 2-4). *MDM2* SNP309 TT associated with *TP53* (P72R) GG was related with increased incidence of cystitis. Conclusions: Late radiation cystitis grade 2 or greater were high in this population and presented a higher incidence when a specific questionnaire was used. Higher radiation dose (BED Gy₃ > 100 Gy) and *MDM2* SNP309 TT associated with *TP53* (P72R) GG were correlated with bladder late effects.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Epidemiologia do câncer de colo de útero

O câncer de colo uterino é o terceiro tumor mais incidente nas mulheres brasileiras, excluindo pele não melanoma, pela Estimativa 2014 do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Ministério da Saúde, 2014), correspondendo a 5,7% das neoplasias em mulheres no Brasil. Foram estimados para 2014, uma incidência de 15.590 casos novos, com risco estimado de 15,33 casos para cada 100 mil mulheres, variando de 23,57 casos/100 mil na região Norte a 10,15 casos/100mil na região Sudeste (Ministério da Saúde, 2014).

O câncer do colo do útero é também um importante problema de saúde pública mundial. A última estimativa global levantada em 2008 relatou 530 mil casos novos desse câncer em mulheres naquele ano em todo o mundo, configurando-se o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo responsável pelo óbito de 275 mil mulheres em 2008. Mais de 85% desses óbitos ocorrem em países menos desenvolvidos. Somente a Índia, que é o segundo país mais populoso do mundo, contribui com cerca de 25,3% dos óbitos por esse câncer (IARC, 2010; Jemal et al., 2011).

O câncer de colo uterino pode ser caracterizado como uma doença sexualmente transmissível, apresentando, portanto, os seguintes fatores de risco: idade precoce da primeira relação sexual, história de

múltiplos parceiros sexuais e um grande número de gravidezes (Louie et al., 2009; Christopherson e Parker, 1965; Keighley, 1968). Evidências científicas acumuladas de estudos moleculares, clínicos, epidemiológicos e de virologia, demonstram inequivocamente que câncer de colo de útero é a sequela de uma infecção não resolvida de longo período de alguns genótipos do papilomavírus humano (HPV - *human papilloma virus*) (Bosch et al., 2002), em especial dos HPV 16, 18, 31 e 45, considerados de alto risco oncogênico (Castellsagué, 2008). A infecção pelo HPV é a infecção sexualmente transmissível mais comum em todo mundo, com uma estimativa de prevalência de 9 a 13% e aproximadamente seis milhões de pessoas sendo infectadas por ano (WHO, 2011).

Em junho de 2006, a agência que autoriza novas drogas nos Estados Unidos, a *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), aprovou a vacina quadrivalente recombinante para o HPV naquele país e a Resolução nº 2.777, de 24 de agosto de 2006, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a aprovou no Brasil e, em 2014, o Ministério da Saúde disponibilizou a vacina contra HPV para meninas de 10 e 11 anos. Os programas de vacinação em larga escala desta vacina serão considerados um marco na prevenção primária desta doença.

O tabagismo foi considerado um fator de risco moderado para o câncer de colo uterino em um levantamento populacional, com um risco relativo de 1,82 (1,51-2,20) (Blakely et al., 2013) e em um estudo multicêntrico do IARC, com uma taxa de risco (*odds ratio*) de 2,17 (95%CI 1,46-3,22) (Plummer e cols, 2003).

1.2 - Importância da radioterapia no tratamento do câncer de colo uterino

Aproximadamente dois terços de todos os pacientes portadores de câncer são submetidos à radioterapia em algum momento do seu tratamento oncológico (Hogle, 2006). O estadiamento do câncer de colo de útero pelo Sistema TNM da *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC, 2014) (T = tumor, N = linfonodos, M = metástase) para câncer de colo de útero, de modo sucinto, é o seguinte:

- Estádio 0 (Tis, N0, M0) – O tumor ainda é um carcinoma in situ;
- Estádio I (T1, N0, M0) – Neste estágio, o câncer invadiu o colo do útero, mas está restrito ao mesmo;
- Estádio II (T2, N0, M0) – O câncer invasor não está restrito ao colo do útero, mas não invadiu até a parede pélvica ou o terço inferior da vagina. No estágio IIa houve a invasão de até 2/3 da vagina, e no estágio IIb há a infiltração do paramétrio sem que a parede pélvica seja alcançada;
- Estádio III (T3, N0, M0) - O câncer se disseminou para a parte inferior da vagina (IIIa) e/ou paredes da pelve (IIIb), contudo não apresenta metástases à distância;
- Estádio IV - Este é o estágio mais avançado de câncer de colo de útero. O câncer se disseminou para órgãos vizinhos ou apresenta metástases à distância.

Estádio IVA (T4, N0, M0) - O câncer se disseminou para a bexiga ou reto, que são órgãos adjacentes ao colo do útero (T4), mas não para os linfonodos (N0) ou locais distantes (M0).

Estádio IVB (qualquer T, qualquer N, M1) - O câncer se disseminou para órgãos distantes além da região pélvica, como pulmões ou fígado.

A partir do estadiamento IIb, o tumor é considerado localmente avançado.

Para o câncer de colo uterino, a radioterapia (RT) é um método bem estabelecido de tratamento. Dados históricos demonstraram que tumores de colo de útero avançados tratados exclusivamente com teleterapia¹ em altas doses (> 60 Gy) tinham uma alta incidência de efeitos colaterais urinários tardios e resposta ruim, reforçando a combinação de teleterapia e braquiterapia como melhor opção terapêutica (Logsdon e Eifel, 1999). A RT também tem sido usada em combinação com cirurgia, seja como adjuvante, nos casos que apresentam fatores prognósticos desfavoráveis como, por exemplo, metástases linfonodais e invasão linfovascular, ou pré-operatória nos casos Ib1, Ib2, IIa e IIb com invasão parametrial em menos de 1/3 proximal (Nag et al., 2000; Perez et al., 1995; Landoni et al., 1997; Atlan et al., 2002; Jacinto et al., 2007).

O potencial curativo da radioterapia é aumentado pelo emprego da braquiterapia, a qual permite que altas doses de radiação sejam liberadas

¹ A radioterapia é uma modalidade de tratamento que utiliza radiações do tipo ionizantes para destruir ou inibir o crescimento de células tumorais. A teleterapia (*tele*, do grego “à distância”), ou radioterapia externa, é realizada com uso de aceleradores lineares ou aparelhos de cobalto. Nessa técnica, existe uma distância física entre o paciente e a fonte da radiação. Na braquiterapia (*brachys* do grego “próximo”), são usadas fontes de radiação em contato direto com os tecidos a serem irradiados.

diretamente no tumor com um elevado gradiente, permitindo melhor proteção dos tecidos normais vizinhos. A dose de tolerância dos órgãos de risco, neste caso bexiga e reto, tem sido o grande limitador da dose máxima no volume-alvo (Nag et al., 2000).

Baalbergen et al. (2013) fizeram uma revisão em todos os artigos encontrados nos principais bancos de dados de 1950 a 2012 para avaliar a melhor conduta terapêutica em tumores de colo uterino iniciais. Para carcinoma de células escamosas do colo uterino, observaram que a resposta à cirurgia ou à radioterapia exclusivas são similares, diferente dos casos de adenocarcinoma, em que, de acordo com alguns estudos, apresentam resultados melhores com a cirurgia. Se houver suspeita de linfonodos comprometidos por ressonância magnética (RM) ou tomografia por emissão de pósitrons - tomografia computadorizada (PET-CT) o ideal é a radioquimioterapia. Contudo, não existem ainda revisões sistemáticas entre cirurgia versus radioquimioterapia para tumores iniciais de colo uterino (Baalbergen et al., 2013). Para tumores em estágio Ia, a cirurgia é a primeira escolha, mas em casos nos quais esta seja contraindicada pelas condições clínicas da paciente, a radioterapia é indicada e se restringe à braquiterapia intracavitária na dose de 60 a 75 Gy no ponto A se for de baixa taxa de dose, ou 36 a 45 Gy em 6 a 8 frações se for de alta taxa de dose (Halperin et al., 2008).

Para o estágio Ib, o mesmo se aplica, com preferência para a radioquimioterapia no caso de tumores maiores que 4 cm (Ib2). A partir

desse estágio, a radioterapia deve incluir todo o volume tumoral, assim como os linfonodos pélvicos (Herrera e Prior, 2013; Halperin et al., 2008).

A radioquimioterapia é a escolha para todos os casos de tumores de colo de útero localmente avançados e em algumas situações, o estadiamento IVa também pode ser tratado com exenteração pélvica (Halperin et al., 2008).

Convencionalmente utiliza-se teleterapia (RT externa) com técnica de quatro campos em *box* de 45 Gy (25 frações de 1,8 Gy/dia por cinco dias consecutivos com intervalo de dois dias), com complementação de dose em paramétrios, se indicada. A braquiterapia intracavitária com dose equivalente a 40 Gy no ponto A deve ser realizada sempre que possível. Quando se utiliza alta taxa de dose, a dose da braquiterapia está em torno de 28 Gy administrada em 4 inserções de 7Gy no Ponto A² (ICRU 38, 1985; Fenkell et al., 2011; De Leeuw et al., 2011).

No Brasil, grande parte dos serviços optam por quatro inserções de 7 Gy, embora em alguns casos optem por 5 frações de 6 Gy, esquema este comumente usado nos Estados Unidos (Silva et al., 2013; Fenkell et al., 2011; Nag et al., 2000). O valor de dose biológica efetiva (BED)³, incluindo a dose de 45 Gy da teleterapia, dos esquemas de quatro inserções de 7 Gy, cinco frações de 6 Gy, seis frações de 6 Gy e oito frações de 5 Gy é igual a, respectivamente, 93,3 Gy₃, 90 Gy₃, 108 Gy₃ e 106,7 Gy₃.

² “Vários sistemas foram desenvolvidos para a prescrição em braquiterapia. O relatório nº 38 da Comissão Internacional de Unidades e Medidas da Radiação (ICRU 38) sugere padronizar a maneira de relatar a dose e o volume do tratamento. Nele são listados itens que deveriam ser incluídos na prescrição de um tratamento intracavitário. Pontos de referência para avaliação da dose em bexiga e reto são definidos no triângulo vesical (na superfície posterior do balão do cateter de Foley preenchido com 7 ml de contraste) e na parede anterior do reto (0,5 cm além da parede posterior da vagina, respectivamente [...]).”

³ Conceito discutido a seguir no item 1.4 .

A braquiterapia de alta taxa de dose pode ser realizada durante a teleterapia, a fim de minimizar o tempo total de tratamento, visto que seu início posterior à quinta semana do primeiro dia da radioterapia externa tem influência negativa na sobrevida das pacientes portadoras de câncer de colo de útero (Campos, 2011).

Uma dose adicional em paramétrios pode ser indicada se estes estiverem comprometidos. Não há consenso sobre a técnica ideal ou a dose a ser administrada nesses casos. Campos paralelos e opostos anteroposteriores e posteroanteriores (AP-PA) com blocos de proteção central continuam sendo o método mais comum para se aplicar o reforço parametrial (Fenkell et al., 2011). A dose pode chegar a até 20 Gy, sendo uma das mais comuns a dose de 5,4 Gy após a irradiação de toda a pelve com 45 Gy (Halperin et al., 2008; Viswanathan et al., 2012).

Com a evolução da técnica da braquiterapia, novos recursos permitem aplicar a dose necessária ao tumor de colo, avaliando com mais precisão as doses recebidas pela bexiga e pelo reto. O grupo de trabalho da GEC-ESTRO [formado em 1990 pela fusão do *Groupe Européen de Curiethérapie (GEC)* e a *European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ESTRO)*] introduziu os conceitos de alvo baseado na ressonância magnética e avaliação e relato da relação dose-volume de maneira tridimensional (Haie-Meder et al., 2005; Potter et al., 2006).

Apesar disso, a realidade dos centros de braquiterapia é distante da ideal, pois a maioria dos centros não utiliza tomografia computadorizada ou RM no planejamento da braquiterapia (Silva et al., 2013). Situação similar

foi encontrada na Grã-Bretanha em um levantamento de 2008 que demonstrou que apenas 4,3% dos centros de braquiterapia utilizava RM para o planejamento (Paton et al., 2012). As razões encontradas variaram desde dificuldades com o custo, como disponibilidade da RM no momento da inserção, aumento do tempo para fazer o exame e o planejamento, incertezas maiores na definição de aplicador e adequação da paciente para a RM (Paton et al., 2012).

Os principais órgãos em risco adjacentes ao colo uterino – reto e bexiga – devem ter quantificada a dose recebida tanto pela tele quanto pela braquiterapia. Na teleterapia a distribuição da dose é homogênea na pelve, exceto quando um reforço adicional é dado em linfonodos comprometidos ou nos paramétrios (Van de Kamer et al., 2011). Na braquiterapia, entretanto, a distribuição da dose obedece à lei do inverso do quadrado da distância, a qual dita que a intensidade da dose decresce proporcionalmente ao quadrado da distância de um determinado ponto à fonte radioativa. Há, portanto, a aplicação de uma dose central na pelve muito mais elevada que na periferia (Wachter-Gestner et al., 2003), levando a um maior risco de superdosagem nos tecidos adjacentes, muito próximos ao implante.

1.3 - Efeitos colaterais agudos e tardios da radioterapia

A eficácia da radioterapia ainda é limitada pela tolerância dos tecidos sadios incluídos dentro do volume alvo de irradiação e pelos seus

efeitos colaterais. Entender os mecanismos da degeneração é, portanto, essencial para a melhora na tolerância ao tratamento e ao desenvolvimento de métodos para reabilitação dos tecidos (Gallet et al., 2011).

Histologicamente, os quatro principais fenômenos envolvidos no desenvolvimento dos efeitos tardios actínicos são a inflamação, a fibrose, as alterações vasculares e a depleção celular (Hill et al., 2001; Williams et al., 2003; Stone et al., 2003; Martin et al., 2000). Após a radioterapia, dois tipos de efeitos determinísticos⁴ são classicamente distinguíveis dependendo do tempo de sua ocorrência: efeitos agudos e efeitos tardios (Denham et al., 2002; Dorr et al., 2001). Todavia, deve ser considerado que a distinção entre agudo e crônico é arbitrária porque se trata na verdade de um *continuum* (Hill et al., 2001; Williams et al., 2003). Os efeitos tardios ou crônicos são consequência de uma remodelação tecidual imperfeita e de lesões persistentes induzidas pela radiação. Contudo os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento desses efeitos continuam incertos (Hill et al., 2001; Williams et al., 2003).

Gallet et al. (2011) analisaram as variações dos principais mediadores das quatro famílias de citocinas e fatores de crescimento envolvidos nas trocas intercelulares durante a degeneração tecidual após a radiação. Os autores avaliaram as alterações ocorridas na pele e no músculo de animais irradiados com 30 Gy com Cobalto-60 e observaram que, com o tempo, a fibrose aumentou tanto na pele como no músculo; já a inflamação na pele decresceu após seis meses e voltou a aumentar em um

⁴ Efeito determinístico é aquele cuja severidade do efeito no indivíduo afetado varia de acordo com a dose e para o qual existe geralmente um limiar.

ano. Entretanto, no músculo a inflamação continuou aumentando com o tempo (Figuras 1 e 2) (Gallet et al., 2011).

Em relação à bexiga, a dose de tolerância para um risco de 5% em cinco anos ($TD_{5/5}$ - do inglês *Tolerance Dose*) de ocorrência de contratura é de 65 Gy se dois terços do órgão forem irradiados e 80 Gy se for apenas um terço (Hall e Giaccia, 2012). Marks et al. (1995) descreveram que a dose de tolerância da bexiga em 10% do seu volume é de 70 Gy, isso considerando a soma das doses recebidas durante a teleterapia e a braquiterapia. A dose em todo volume da bexiga com teleterapia para os tumores do colo uterino tipicamente varia de 40 a 50 Gy e a dose total incluindo a dose da braquiterapia nas regiões mais próximas do implante se aproxima de 70 a 90 Gy podendo ultrapassar 100 Gy (Viswanathan et al., 2010). Contudo, a verdadeira dose máxima é desconhecida, pois a topografia destas regiões irradiadas varia entre as frações, na maioria das pacientes, devido à *Natureza* não estática da bexiga, tendo sido relatado um movimento aproximado de 1 a 4 cm e uma variação de volume de até 44% (Hellebust et al., 2001).

A revisão da análise quantitativa dos efeitos nos tecidos normais, QUANTEC (*Quantitative Analysis of Normal Tissue Effects in the Clinic*), resume os dados de dose/volume/resultado da radioterapia tridimensional atualmente disponíveis e aperfeiçoa as diretrizes (*guidelines*) sobre a tolerância de dose e volume dos tecidos normais elaboradas pelo clássico artigo de Emami et al. publicado em 1991 (Emami et al., 1991; Marks et al., 2010). Para a bexiga, as recomendações para restrição de dose

(*constraints*) foram: 15% ou menos do volume da bexiga pode receber mais que 80 Gy; 25% ou menos do volume pode receber dose > 75 Gy; 35% ou menos do volume, dose > 70 Gy e não mais que 50% do volume pode receber dose > 65 Gy (Viswanathan et al., 2010).

A túnica mucosa da bexiga é composta por um epitélio estratificado de transição ou polimorfo sustentado por lâmina própria fibroelástica. O epitélio da bexiga consiste de uma camada basal formada por células diploides pequenas cobertas por várias camadas de células de transição grandes e na superfície por uma camada de células grandes polipoides com uma membrana espessa resistente à irritação causada pela urina (Hall e Giaccia, 2012). A túnica muscular é organizada em várias direções. E a túnica adventícia ou serosa é presente na região superior e adventícia no restante (Figura 3). A taxa de renovação celular é baixa e as células superficiais têm uma expectativa de vida longa, de modo que a proliferação acelerada após a radioterapia se inicia meses após a irradiação (Hall e Giaccia, 2012). A senescência de células funcionais diferenciadas então revela uma lesão latente na camada basal. A frequência urinária aumenta em paralelo com o dano e a perda de células da bexiga. A ausência dessas células da superfície explica a irritação da urina nas camadas mais profundas, estimulando a proliferação celular. Os efeitos tardios subsequentes são a fibrose e a redução da capacidade vesical (Hall e Giaccia, 2012).

FONTE: Gallet P, Merlin JL, Leroux A et al., Plos One. 2011. Vol. 6, e29399. Reimpressão permitida pela política da revista PLoS One (conforme a *Creative Commons Attribution License* que permite uso irrestrito, distribuição e reprodução em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados).

Figura 1 - Mudanças histológicas após a radiação na pele e no músculo durante a evolução na escala da inflamação, fibrose, alterações vasculares e celulares.

FONTE: Gallet P, Merlin JL, Leroux A *et al.*, Plos One. 2011. Vol. 6, e29399. Reimpressão permitida pela política da revista PLoS One (conforme a *Creative Commons Attribution License* que permite uso irrestrito, distribuição e reprodução em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados).

Figura 2 - Demonstração gráfica da evolução na escala da inflamação, fibrose, alterações vasculares e celulares após a radiação na pele e no músculo (controle 0 Gy e irradiados 30 Gy). Na pele a fibrose é crescente com o tempo e as alterações celulares são decrescentes, enquanto a inflamação tem um decréscimo aos 6 meses e novo pico com um ano. No músculo, a fibrose tem um decréscimo aos 6 meses e novo pico com um ano, contudo as alterações celulares e a inflamação são crescentes com o tempo.

FONTE: Acervo digital de lâminas da Universidade São Judas Tadeu, 2013. Disponível em: <<http://www.usjt.br/acervolaminas/index.php/citologia/4-histologiageral/51-tecidos-epiteliais-de-revestimento#5>>. Autorização para reimpressão concedida pela autora do Acervo.

Figura 3 - Epitélio da bexiga em aumento de 100 e 400x.

Os efeitos urinários agudos da radioterapia no tratamento do câncer de colo uterino são secundários à cistouretrite e incluem disúria, aumento da frequência urinária, nictúria e hematúria micro ou macroscópica (Halperin et al., 2008). Sintomas tardios atribuídos a uma lesão global da bexiga incluem disúria, aumento da frequência urinária, urgência, contratura vesical, espasmos, fluxo reduzido e incontinência (Viswanathan et al., 2010). Efeitos crônicos oriundos de lesão focal da bexiga incluem hematúria, fístula, obstrução, ulceração e necrose (Viswanathan et al., 2010).

A incidência dos efeitos colaterais tardios da radioterapia variam de 3 a 5% para os estadiamentos I e IIa de colo uterino, e 10 a 15% para IIb e III (Halperin et al., 2008). De modo geral, a ocorrência de efeitos colaterais graves na bexiga é de menos de 10% nas pacientes irradiadas por tumores do colo uterino (Marks et al., 1995). Li et al. (1995) avaliaram a ocorrência da cistite e observaram que 51,1% das pacientes desenvolveram cistite de dois a cinco anos após a radioterapia, 16,7% em cinco a dez anos e apenas 3,4% no primeiro ano. Beskow et al. (2012) avaliaram 171 pacientes submetidas à radioterapia por câncer de colo uterino, com um seguimento médio de 66 meses (variando de 8 a 109 meses), e encontraram 15% de efeitos tardios em bexiga e/ou reto, sendo que 7% apenas na bexiga e 3% nos dois órgãos.

Entretanto, dada a possível latência de várias décadas entre o tratamento e a manifestação clínica da sequela, é provável que os artigos subestimem a real porcentagem desses efeitos (Gardner et al., 2002; Eifel et al., 1995). Patel et al. (2005) encontraram um tempo médio necessário para a instalação dos efeitos colaterais tardios em bexiga em torno de 24,4 meses

(18-38 meses). Perez et al. (1984) relataram complicações urinárias tardias surgindo entre três a cinco anos após a radioterapia.

1.4- Dose Biológica Efetiva (BED)

Fowler em 1989 publicou um artigo introduzindo o conceito de dose biológica efetiva (BED do inglês *Biologically Effective Dose*) como uma medida única global da eficácia do esquema radioterápico em um dado tecido. Sendo assim, BED é uma ferramenta de radiobiologia teórica baseada no modelo linear quadrático (LQ do inglês *linear quadratic model*) para sobrevivência celular para comparar a eficácia de regimes diferentes de radioterapia envolvendo diferentes tipos de fracionamento (Fowler, 1989), e vários estudos foram publicados nos últimos anos correlacionando o BED com a resposta clínica (Hedman et al., 2013; Beskow et al., 2012).

O valor do BED é calculado aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\text{BED} = nd [1 + d/(\alpha/\beta)]$$

onde,

n = número de frações de radioterapia

d = dose por fração de radioterapia

α/β = dose na qual os componentes linear e quadrático da morte celular são iguais

De acordo com o tecido ou associação que se deseja estudar, o valor de α/β pode variar, sendo menor para os tecidos de resposta lenta ou tardia e maior para os tecidos de resposta rápida ou aguda, onde se enquadram a maioria dos tumores. Dessa forma, um mesmo esquema de radioterapia vai ter diferentes valores de BED conforme o tecido que se deseja estudar. Por outro lado, para um mesmo tecido, diferentes esquemas de radioterapia podem ter seu efeito comparado de acordo com os respectivos valores de BED calculados.

As recomendações da GEC-ESTRO sugerem um valor uniforme do $\alpha/\beta = 10$ Gy para tumores e CTV (do inglês *clinical target volume*) e $\alpha/\beta = 3$ Gy para todos os órgãos em risco (Pötter et al., 2006). Para a bexiga os valores de α/β variam de 3 a 10 (Dörr, 2009; Fowler, 1989; Pötter et al., 2006; Chen et al., 2010; Marks et al., 1995). Dörr (2009) descreve uma variação de 5 a 10 no α/β considerando os efeitos da contração da musculatura vesical e a ulceração, que podem ocorrer em anos a décadas após a radioterapia.

1.5- Efeito biológico da radiação ionizante e mecanismos de reparo do DNA

O efeito biológico da radiação ionizante resulta principalmente do dano ao DNA, o qual é considerado seu alvo crítico. A radiação age por dois mecanismos diferentes (Hall e Giaccia, 2012):

- Efeito direto – o fóton interage diretamente com a dupla hélice do DNA;
- Efeito indireto – o fóton interage com a água gerando radicais livres e estes interagem com o DNA. Como a água corresponde a 80% da célula, estima-se que o efeito indireto seja responsável por 2/3 do dano causado ao DNA pelas radiações ionizantes eletromagnéticas como o Raio-X.

A radiação ionizante causa um grande número de lesões no DNA, sendo que a maioria é reparada com sucesso pelas células. Este dano ao DNA ocorre de diferentes maneiras (Hall e Giaccia, 2012):

- Quebra em uma única fita de DNA do cromossomo – é a quebra de fita simples (*Single Strand Break - SSB*) o reparo deverá ser conseguido com facilidade por haver a outra fita como molde (*template*);
- Quebra em mais de uma posição em ambas as fitas de DNA do cromossomo com muitas bases de distância entre elas – o reparo deverá ser conseguido com facilidade, pois biologicamente funcionam como quebras de uma fita apenas;
- Quebra em ambas as fitas de DNA do cromossomo diretamente opostas ou com poucas bases de distância entre elas – ocorre a quebra de dupla fita (*Double Strand Break - DSB*) e o cromossomo se parte em dois. A DSB é considerada a lesão mais deletéria causada pela radiação ionizante (Martin et al., 2013).

Uma dose de radiação que leva em média a um evento letal por célula deixa cerca de 37% ainda viáveis. Para células de mamíferos essa dose de radiação ionizante eletromagnética está entre 1 e 2 Gy, e o número de cada um dos tipos de lesões no DNA detectadas imediatamente após essa dose por célula é (Hall e Giaccia, 2012; Ward et al., 1988; Goodhead et al., 1994):

- Danos em bases nitrogenadas – acima de 1.000;
- Quebras de fita simples (SSB) – 1.000;
- Quebras de dupla fita (DSB) – 40, sendo que este tipo de quebra aumenta linearmente com o aumento da dose, o que deve significar que as duas fitas são quebradas pela passagem do mesmo fóton.
- DNA-DNA *cross-links* – 20;
- DNA-protein *cross-links* – 150;
- Dano agrupado ao DNA não-DSB [definidas como duas ou mais lesões dentro de uma ou duas voltas da dupla hélice do DNA induzidas pela passagem de um fóton (Shikazono et al., 2009)] – 160 a 320.

Além da questão dosimétrica, outro fator que parece ter relevância é o fator genético. A diversidade interpessoal das respostas dos tecidos normais de pacientes submetidos a esquemas terapêuticos semelhantes seria explicada pelos polimorfismos genéticos. Diferentes das mutações que por definição têm uma incidência inferior a 1% na população geral, os polimorfismos apresentam incidência elevada (alguns, por exemplo,

em 45% da população) e podem estar influenciando a ocorrência dos efeitos colaterais, determinando a radiosensibilidade individual.

As células eucariotas dispõem de diversos mecanismos para lidar com a instabilidade genômica decorrente da replicação do DNA e com a enorme gama de fatores que geram danos a este. As vias de reparo são compostas por inúmeras proteínas, abrangendo os mais variados tipos de dano que podem ser causados ao DNA. Tais mecanismos são identificados em vias distintas, porém não totalmente independentes. Diversas proteínas acabam sendo bastante redundantes, enquanto outras agem sobre substratos específicos, trabalhando exclusivamente em certas vias (Strachan e Read, 2010).

Os mecanismos usados pelas células dos mamíferos para corrigir as lesões induzidas por radiação nas bases nitrogenadas são diferentes dos usados para reparar quebras de dupla fita. Além disso, diferentes mecanismos são acionados dependendo da fase do ciclo celular em que está a célula que foi irradiada (Hall e Giaccia, 2012).

Os mecanismos de reparo do DNA das células eucariotas incluem (Strachan e Read, 2010):

- a. Atividade de exonuclease da DNA polimerase I: tem a função de revisão na polimerização, corrigindo a incorporação errada de bases durante a replicação.
- b. Reparação direta: Estão implicados três genes, dos quais o melhor caracterizado codifica a O(6)-metilguanina-DNA metiltransferase, capaz de remover grupos metil de guaninas.

- c. Correção da introdução de códons de parada prematuros (sigla em inglês NMD): Degradação dos transcritos que possuem *stop* códons (códons de parada) prematuros.
- d. Reparação por excisão de bases (sigla em inglês BER)
- e. Reparação por excisão de nucleotídeos (sigla em inglês NER)
- f. Reparo do emparelhamento errôneo do DNA (sigla em inglês MMR): Repara os erros que surgem durante a replicação.
- g. Recombinação homóloga: Corrige quebras da dupla cadeia do DNA. Alguns dos genes envolvidos são o *NBN*, o *BLM*, o *ATM* e os genes *BRCA1* e *BRCA2*.
- h. Junção terminal não-homóloga (sigla em inglês NHEJ): Mecanismo incorreto de reparo de quebras de dupla cadeia.

Dentre os mecanismos celulares para correção de lesões no DNA, os cinco mais relevantes são detalhados a seguir (Martin et al., 2013).

1.5.1-Reparo por excisão de base (BER)

Reparo por excisão de base (BER) é a via de reparo do dano ao DNA predominante para o processamento de pequenas lesões, derivadas de dano por oxidação e alquilação em bases nitrogenadas. Este reparo se inicia com o reparo específico da lesão pela DNA glicosilase, a qual é responsável pela excisão da base lesionada, e em seguida completado por duas subvias distintas: o caminho curto, no qual apenas um único nucleotídeo é recolocado, e o caminho longo, no qual 2 a 13 nucleotídeos são repostos. Cada subvia do BER baseia-se na formação de complexos proteicos em

torno do sítio da lesão no DNA, de modo a facilitar o reparo de maneira coordenada (Figura 4). Esse processo complexo de formação promove um acréscimo na especificidade e eficiência da via do BER, auxiliando na manutenção da integridade genômica e prevenindo o acúmulo de erros na célula (Krwawicz et al., 2007; Almeida et al., 2007).

Danos nas bases induzidos por radiação são bem reparados por essa via, mas defeitos no BER podem causar aumento na taxa de mutação, contudo usualmente não determinam aumento na radiosensibilidade da célula (Hall e Giaccia, 2012). Embora mutações no gene *XRCC1*, o qual participa do BER, estejam associadas a um aumento de 1,7 vezes na radiosensibilidade celular, acredita-se que isto seja decorrente da potencial participação deste gene em outra via responsável por outros tipos de reparo como as quebras de fita simples do DNA.

FONTE: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – KEGG*. Disponível em:
http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map03410.

Figura 4 - Genes envolvidos na via de reparo por excisão de base (BER).

1.5.2-Reparo por excisão de nucleotídeo (NER)

O reparo por excisão de nucleotídeo (NER) é um mecanismo que reconhece e repara danos maiores ao DNA, causados por compostos genotóxicos, agentes carcinógenos e exposição à radiação ultravioleta (UV). Algumas doenças estão relacionadas à deficiência hereditária na via do NER, entre as quais o *Xeroderma pigmentosum*, Síndrome de Cockayne e a tricotiodistrofia (de Boer et al., 2000; Kraemer et al., 2007).

As lesões do DNA como *cross-links* DNA-DNA e DNA-proteína têm seu mecanismo de reparo ainda incerto, mais parecem envolver NER e reparo por recombinação (Hall e Giaccia, 2012).

O reparo do dano ao DNA envolve diversas proteínas distribuídas em duas diferentes subvias, conhecidas como reparo acoplado à transcrição (TCR-NER) e reparo do genoma global (GGR-NER). O TCR refere-se ao reparo acelerado de lesões localizadas na fita de DNA dos genes ativamente transcritos pela RNA polimerase II. Já no GGR, o primeiro passo de reconhecimento do dano envolve um complexo protéico (de Laat et al., 1999). Os passos subsequentes de ambas as subvias são similares, e estão ilustrados na Figura 5.

Mutações nos genes envolvidos no NER não levam a aumento na radiosensibilidade celular (relativa às radiações ionizantes). Contudo as mesmas determinam um aumento na sensibilidade ao dano causado no DNA pela luz Ultravioleta e alguns agentes antineoplásicos como os alquilantes.

FONTE: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – KEGG.
Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map03420>.

Figura 5 - Genes envolvidos na via de reparo por excisão de nucleotídeo (NER).

1.5.3-Reparo de pareamento errôneo (MMR)

O reparo de pareamento errôneo (MMR) é constituído por uma via biológica altamente conservada e desempenha um papel crucial na manutenção na estabilidade genômica (Figura 6). O MMR corrige pareamentos errados de base de DNA ocorridos durante a replicação, evitando assim que alguma mutação seja preservada durante a divisão celular (Jiricny, 2006). O MMR também é responsável por suprimir a recombinação homóloga, e recentemente foi atribuído a ele um papel importante na sinalização do dano ao DNA (Li, 2008). Defeitos no MMR estão associados com instabilidade em escala genômica, predisposição a certos tipos de câncer, como o câncer colorretal hereditário não-polipóide (HNPCC), resistência a agentes quimioterápicos, anomalias durante a meiose e esterilidade em mamíferos (Marti et al., 2002).

Uma revisão feita sobre os efeitos da radiação ionizante e o MMR apontou resultados conflitantes de diversos estudos, sendo que alguns relataram aumento da radiosensibilidade, outros da radiorresistência e houve alguns que não relataram associação deste tipo de reparo com os danos causados no DNA pela radiação ionizante (Martin et al., 2010).

FONTE: Adaptado de *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – KEGG*. Disponível em: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map03430.

Figura 6 - Genes envolvidos na via de reparo de pareamento errôneo (MMR).

1.5.4-Reparo por junção de extremidades não-homólogas (NHEJ)

A junção de extremidades não-homólogas (NHEJ) repara quebras de fita dupla de DNA (DSBs) através da ligação direta das extremidades. NHEJ envolve a ligação do heterodímero da proteína Ku às extremidades de fita dupla de DNA, seguido do recrutamento do complexo DNA-PKcs, o processamento das extremidades e finalmente o recrutamento do complexo DNA ligase IV (LIG4)-XRCC4, resultando na ligação das extremidades quebradas (Zhang et al., 2007), como pode ser visto na Figura 7. Foi demonstrado que bactérias realizam a NHEJ utilizando apenas duas proteínas (Ku e a DNA ligase), enquanto em eucariotos o mecanismo requer diversos fatores para ser viável (Weller et al., 2002; Weller et al., 2004). A NHEJ repara DSBs em qualquer fase do ciclo celular, realizando a ligação de duas extremidades de DNA resultantes de DSB, sem a necessidade de homologia de sequência, fazendo com que o mecanismo de reparo fique sujeito a erros (Wyman et al., 2006). Contudo, a NHEJ é primariamente encontrada na fase G1 do ciclo celular, momento em que o material genético não está duplicado e, por isso, não existem cromátides irmãs para servirem como molde (*template*) (Hall e Giaccia, 2012).

Eukaryotic type

FONTE: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – KEGG. Disponível em:
http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map03450.

Figura 7 - Genes envolvidos na via de reparo do DNA por junção de extremidades não-homólogas (NHEJ).

A resposta imediata da célula à DSB induzida pela radiação é a ativação de um grupo de sensores que serve tanto para promover o reparo do DNA como para prevenir que a célula continue avançando no ciclo celular antes que o reparo seja concluído. Esses sensores são as proteínas ATM e ATR, as quais são recrutadas no sítio de quebra do DNA. A competição entre a recombinação homóloga (HR) e a NHEJ pelo reparo é em parte regulada pela proteína 53BP1. Funcionalmente o ATM promove o processamento da extremidade de DNA quebrada para gerar uma fita simples de DNA recombinante através da regulação da atividade do complexo proteico Nbs/Mre11/RAD50, e esta atividade de ressecção da extremidade 5' do ATM é reduzida pela 53BP1 (Hall e Giaccia, 2012).

1.5.5- Recombinação homóloga (HR)

A recombinação homóloga (HR) é essencial para um reparo preciso de quebras de fita dupla de DNA (DSBs), evitando uma potencial lesão letal. A HR ocorre tardiamente na fase S-G2 do ciclo celular, envolvendo a geração de uma região de DNA de fita simples, seguido pela invasão da fita homóloga e pareamento com a fita lesionada, formação da junção de Holliday, síntese do DNA utilizando a fita homóloga como molde, migração do fragmento e resolução da junção (Figura 8). A família de proteínas RecA/Rad51 desempenha um papel central nesta via (Kawabata

et al., 2005). Proteínas supressoras de tumor, como a BRCA2 e RecQ helicase mantêm, em parte, a integridade do genoma através da HR (Ouyang et al., 2008).

A HR proporciona ao genoma do mamífero um mecanismo de reparo de DSBs de alta fidelidade. Particularmente o aumento da atividade dessa via da HR na fase S tardia e na fase G2 sugere que sua função primária é o reparo e a restauração da função da forquilha de replicação onde ocorreu a DSB.

Ao contrário do que ocorre com a NHEJ que não requer homologia de sequência para religar as extremidades quebradas, a HR requer contato físico com uma cromátide íntegra para que esta sirva de molde (Hall e Giaccia, 2012). A inativação dos genes da HR resulta em radiosensibilidade e instabilidade genômica (Figura 9). A desregulação desses genes também pode levar a câncer por perda da heterozigosidade⁵ (LOH).

⁵ “A perda somática de um alelo de um gene supressor de tumor envolve frequentemente a perda do material cromossômico, variando em extensão desde algumas centenas de pares de bases a uma sub-banda ou até ao cromossomo completo. Esses eventos são chamados de perda de heterozigosidade LOH (Loss Of Heterozygosity), que consiste na comparação de loci polimórficos do DNA extraído de um tecido normal e de um tumoral do mesmo indivíduo.” Referência: Osborne RJ, Hamshire MG. A genome-wide map showing common regions of loss of heterozygosity/allelic imbalance in breast cancer. *Cancer Res.* 2000; 60(14):3706-12.

FONTE: Adaptado de *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – KEGG*. Disponível em: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko03440.

Figura 8 - Genes envolvidos na via de reparo do DNA por recombinação homóloga (HR).

FONTE: Qiagen Sample & Assay Technologies - Genes & Pathways. Disponível em:
 <<http://www.qiagen.com/products/genes%20and%20pathways/Pathway%20Details.aspx?pwid=46>>.
 Autorização para reimpressão obtida em 25 maio 2013 junto à Qiagen.

Figura 9 - Proteínas da recombinação homóloga e suas interações na via do ATM.

1.6- Radiossensibilidade: Dano ao DNA, apoptose e reparo

A radiossensibilidade não tem seu mecanismo e seus determinantes completamente compreendidos, resultando em dados conflitantes entre os diferentes autores (Foray et al., 2013; Henríquez-Hernández et al., 2013). Existem três tipos de dano ao DNA causado pela radiação ionizante em relação à possibilidade de reparo dos mesmos:

- Dano letal – irreversível e sem possibilidade de reparo leva a morte celular;
- Dano potencialmente letal – dano que pode ser reparado dependendo de certas circunstâncias do meio;
- Dano subletal – dano possível de ser reparado em horas (antes da próxima fração de radioterapia ser aplicada) em circunstâncias normais a menos que outro dano subletal seja adicionado (por uma segunda dose de radiação).

As bases radiobiológicas que sustentam o uso da radioterapia fracionada em vez de dose única para a maioria dos tratamentos tem como fundamento os chamados "5 R's" da radioterapia, os quais são os fatores que influenciam na radiossensibilidade celular e na recuperação do tecido sadio: recrutamento, reoxigenação das células tumorais em hipóxia (oxigênio aumenta a radiossensibilidade), redistribuição das células nas fases do ciclo celular (fase S é radorresistente e as fases G2 tardia e M radiossensíveis), repopulação das células tumorais e radiossensibilidade (Bristow et al., 2007; Begg, 2009). O objetivo geral da radioterapia é maximizar a dose de

radiação dentro do tumor e assim a morte celular, para alcançar o controle local e minimizar a dose e morte celular nos tecidos normais para diminuir a morbidade aguda e tardia relacionadas ao tratamento (Bentzen, 2006). Esse é o conceito de índice terapêutico (*therapeutic ratio*) (Eriksson et al., 2010).

A apoptose é a principal modalidade de morte celular observada em resposta à radiação em células naturalmente propensas à apoptose como as células hematopoiéticas e os tumores delas originados (Jonathan et al., 1999). Essas células são tipicamente programadas para rápida indução e execução de morte por apoptose, a qual ocorre dentro de horas após a exposição à radiação (Eriksson et al., 2010). Por outro lado, a apoptose tem um papel modesto na resposta à radioterapia na maioria dos tumores sólidos (Eriksson et al., 2010). Grande parte dos tumores perde seu mecanismo pró-apoptótico durante a progressão (Hollstein et al., 1991). Outras modalidades de morte celular devem então estar em funcionamento após a radiação, de modo a compensar a não indução da apoptose. Isso inclui senescência radioinduzida, uma forma de morte celular proliferativa em que há a parada permanente do ciclo celular (Gewirtz et al., 2008). Outra importante morte celular é a catástrofe mitótica, que é o principal tipo de morte celular radioinduzida especialmente em tumores sólidos que geralmente são relutantes à apoptose (Ianzini et al., 2006). Ao contrário do que ocorre na apoptose precoce a inativação do *TP53* parece promover e não inibir a indução da catástrofe mitótica (Ianzini et al., 2006). A catástrofe mitótica é considerada o principal mecanismo de morte celular de tumores sólidos em resposta à radioterapia (Eriksson et al., 2010).

Foray (2013) discorreu a respeito do que poderia ser considerado um trabalho reprodutível ou resultado decorrente do que ele chamou “artefatos técnicos”. Avaliando os achados de trabalhos com pacientes portadores de Ataxia-telangiectasia (AT), uma doença de herança autossômica recessiva causada por uma mutação no gene *ATM*, comparados com indivíduos radorresistentes (grupo controle), o autor defende o conceito de que a radiosensibilidade está relacionada não à quantidade inicial de quebras de fita dupla no DNA (DSB) e sim à porcentagem de quebras que não são reparadas, e cita os resultados de Iliakis (1991), Joubert (2008) e Belyaev (2010). As células de portadores de Ataxia-telangiectasia, a mais radiosensível das síndromes, mostram cerca de 40 DSB por Gray, exatamente como os controles radorresistentes, contudo sistematicamente uma porcentagem maior dessas quebras não é reparada nos portadores da síndrome (Joubert et al., 2008).

Em relação à apoptose, tanto os portadores de Ataxia-telangiectasia como o grupo controle, não demonstraram diferença, apesar da diferença clínica existente entre os grupos em relação à radiosensibilidade (Foray et al., 1997; Schmitz et al., 2003).

1.7- O Gene *TP53*

O gene *TP53* (OMIM 191170; NM_000546), com tamanho aproximado de 20 kb, está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) (Figura 10), contendo 16 éxons, sendo o primeiro deles não-

codificante e contendo o primeiro íntron longo (aproximadamente 10 kb). O gene *TP53* é responsável pela regulação de genes alvos que induzem parada do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo do DNA ou mudanças no metabolismo da célula (Bond et al., 2004), de modo que a atuação da p53 é fundamental para a prevenção de tumores (Bond et al., 2004) (Figura 11 e 12). Este gene codifica a proteína p53, contendo 393 resíduos de aminoácidos, consistindo de cinco domínios estruturais e funcionais (Cho et al., 1994; Bouchet et al., 2006) , com massa molecular aproximada de 43 kDa. O domínio N-terminal consiste em um domínio ácido de transativação transcricional, o qual é requerido para a ativação de genes induzíveis por p53. O domínio central é responsável pela ligação ao DNA, facilitando a ligação sequência-específica da p53 ao DNA. O domínio de tetramerização é essencial para que ocorra a interação entre monômeros da p53, formando um dímero, e a consequente interação de dímeros, formando um tetrâmero. A tetramerização é fundamental para o correto desempenho da habilidade da p53 de regular positivamente a expressão gênica (Bai et al., 2006). Estes três domínios contribuem para a ativação transcricional de um grande número de alvos da p53, incluindo a proteína multifuncional p21 e as proteínas proapoptóticas BAX, PUMA, e NOXA.

Ara et al. descreveram, em 1990, um polimorfismo comum do gene *TP53* que ocorre no segundo nucleotídeo do códon 72, havendo a substituição de uma citosina por uma guanina, de modo a promover a troca do aminoácido prolina (CCC) pelo aminoácido arginina (CGC). Este polimorfismo está registrado no banco de dados do National Center for

Biotechnology Information (rs1042522; R72P) e se localiza na posição 466 do mRNA (2640nt). A frequência descrita para os genótipos é: C/C 30,13%; C/G 33,01% e G/G 36,86%.

FONTE: Adaptado do site Ensembl.org de acesso livre disponível em:
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?g=ENSG00000141510;r=17:7565097-7590856.

Figura 10 - Localização Genômica do gene *TP53*. Figura A - Localização do gene *TP53* no cromossomo 17. Figura B - Localização do gene *TP53* em maior aumento mostrando apenas o braço curto (p) do cromossomo 17, e a localização do gene *TP53* na região 1 banda 3 sub-banda 1 (17p13.1).

Dumont et al. (2003), em um trabalho avaliando o polimorfismo do códon 72 (P72R) da p53, em portadores da síndrome de Lynch, demonstraram que os heterozigotos Arg/Pro desenvolveram câncer color-retal 13 anos antes dos homozigotos Arg/Arg, confirmando o que foi demonstrado in vitro, isto é, que o alelo Arg tem maior capacidade de induzir a apoptose que o alelo Pro. Contudo, as variantes Pro72 e Arg72 têm a mesma habilidade de se ligar ao DNA, sendo conformacionalmente indistinguíveis e ambas denominadas *wild type* (tipo/alelo selvagem), porém

a variante Pro72 induz mais intensamente a transcrição do que a Arg72, enquanto que esta última por sua vez induz a apoptose mais rapidamente e por isso é mais potente em suprimir a transformação tumoral que o Pro72 (Thomas et al., 1999).

FONTE: Qiagen Sample & Assay Technologies - Genes & Pathways. Disponível em: <
<http://www.qiagen.com/products/genes%20and%20pathways/Pathway%20Details.aspx?pwid=339>>.
 Autorização para reimpressão obtida em 25 maio 2013 junto à Qiagen.

Figura 11 - Genes envolvidos na via do TP53.

Os achados de Dumont et al. (2003) sugerem que a variante Arg72 tem capacidade de induzir a apoptose 15 vezes mais que a Pro72 por ter maior habilidade de localizar a mitocôndria, liberando assim o citocromo C. Orsted et al. (2007) também demonstraram esta maior habilidade da variante Arg72, porém mostraram ainda que a variante Pro72 tem maior capacidade de paralisar o ciclo em G1 que o Arg72.

Outras diferenças têm sido relatadas em relação a este SNP (*single nucleotide polymorphism*) do códon 72 da p53, como por exemplo, que a variante Arg72 é mais susceptível à ligação com a oncoproteína E6 do vírus HPV presente nos tumores de colo de útero (Storey et al., 1998), embora não haja consenso sobre a existência de um aumento de susceptibilidade ao câncer relacionado ao HPV em pacientes com o alelo Arg72 (Dumont et al., 2003).

Além de induzir a expressão gênica, a p53 regula negativamente a transcrição de um grande número de genes, incluindo os que codificam a BCL-2 (Akhtar et al., 2006), MCL-1 (Pietrzak et al., 2008), e a survivina (Hoffman et al., 2002), todos estes supressores de apoptose, e MDR-1 (Chin et al., 1992; Johnson et al., 2005; Löhr et al., 2003), o qual confere o fenótipo de multirresistência a drogas. Esta propriedade da p53 é associada ao domínio rico em prolina localizado entre o domínio de ligação ao DNA e a região de transativação. A repressão por p53 ocorre indiretamente através da ativação da transcrição de proteínas repressoras (Löhr et al., 2003).

FONTE: Qiagen Sample & Assay Technologies - Genes & Pathways. Disponível em: <
<http://www.qiagen.com/products/genes%20and%20pathways/Pathway%20Details.aspx?pwid=338>>.
 Autorização para reimpressão obtida em 25 maio 2013 junto à Qiagen.

Figura 12 - Genes envolvidos na via da apoptose do TP53.

Em células normais livre de estresse, a proteína p53 é mantida estável a baixas concentrações no citosol, o que restringe seu impacto no

destino da célula (Michael et al., 2003). O *turnover* da p53 é predominantemente regulado pela ubiquitinação e degradação mediada pela proteína Mdm2. Seguido de vários estímulos intra e extracelulares, como dano ao DNA (como os causados por radiação ionizante, radiação UV, aplicação de drogas citotóxicas ou agentes quimioterápicos, e infecções virais), choque térmico, hipóxia, e superexpressão de Oncogenes, a p53 selvagem é ativada, emergindo como uma proteína reguladora pivô de diversas respostas biológicas, tanto no nível celular quanto tecidual e/ou sistêmico (Vousden et al., 2002; Vogelstein et al., 2000; Levine, 1997). O estresse genotóxico desencadeia uma série de modificações pós-traducionais⁶ na p53 que contribuem para sua estabilização, acúmulo nuclear e ativação bioquímica (Ljungman, 2000; Meek, 2004). A rápida ativação da p53 devido à radiação ionizante é mediada pela atividade quinase da proteína ATM (ataxia-telangectasia-mutated). Uma vez ativada, a p53 e seus efetores à jusante (como a p21, por exemplo) regulam diferentes respostas, incluindo a parada do ciclo celular em G1 e G2, possibilitando o reparo de danos ao DNA, a senescência prematura induzida por estresse (SIPS) ou o encaminhamento da célula à apoptose. Outras funções gênicas reguladas pela p53 abrangem a comunicação com células adjacentes, reparo de DNA danificado ou em estabelecer arcos de *feedback* positivos ou

⁶ “O genoma humano possui cerca de 23 mil genes capaz de gerar um proteoma significativamente grande. Isto ocorre devido à diversificação nos níveis pós-transcricionais e pós-traducionais. No nível transcricional, várias moléculas de mRNA podem ser produzidas a partir de um único gene através do *splicing* alternativo, e menos frequentemente por edição do RNA. Após a transcrição, muitas proteínas passam por processos de modificação ou clivagem para chegar a suas formas funcionais. E é através dessas modificações pós-traducionais que as estruturas e funções das proteínas são tão diversificadas.” Referência: Johnson M. Métodos de pesquisa em modificações proteicas. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.13070/mm.pt.2.118>.

negativos afim de aumentar ou atenuar as funções da p53 e integrar tais respostas ao estresse através de outras vias de transdução de sinais.

Em trabalhos recentes (Zhang et al., 2009; Zhang et al., 2011), foi construído um modelo computacional integrativo da rede de interações da p53 em resposta à radiação ionizante. Esse modelo é composto por quatro módulos: reparo de DNA, sensor ATM, controle de *feedback* centrado na p53 e decisão do destino celular. O módulo de decisão do destino celular é era limitado à parada em G1 e apoptose. O modelo prediz múltiplas ondas de atuação da p53 e p21 após a irradiação, e duas formas de p53: a p53 *arrester*, fosforilada na Ser 15 e mediando a parada nos pontos de checagem através da p21, e a p53 *killer*, com uma fosforilação adicional na Ser 46, mediando a apoptose através da caspase-3. Em condições normais (sem manipulação gênica) o nível de p53 *killer* (fosforilada na Ser 46) apresentou-se 6 vezes maior em relação à p53 *arrester* (fosforilada na Ser15), sendo a primeira se manifestando completamente 24 horas após a exposição à 7,5 Gy de radiação ionizante, com predição de indução de apoptose em 100 % das células (Zhang et al., 2011).

1.8- Gene *MDM2*

O Mouse Double Minute 2 ou *MDM2* (OMIM 164785) está localizado no locus 12q14.3-q15 (Figura 13). Este gene é um regulador negativo da p53, sendo superexpresso em muitos tumores (Freedman et al., 1999).

FONTE: Adaptado de site Ensembl.org de acesso livre disponível em:
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?g=ENSG00000135679.

Figura 13 - Localização Genômica do gene *MDM2*. Figura A - Localização do gene *MDM2* no cromossomo 12. Figura B - Localização do gene *MDM2* em maior aumento mostrando apenas o braço longo (q) do cromossomo 12, e a localização do gene *MDM2* na região 1 banda 4 sub-banda 3 à região 1 banda 5 (12q14.3-q15).

O gene *MDM2* possui dois promotores, sendo que o promotor 1 (P1) se localiza anteriormente ao éxon 1 e outro promotor (P2) entre os éxons 1 e 2 (Figura 14). Um polimorfismo de base única no promotor 2 (SNP309T→G; rs2279744) no gene *MDM2*, na posição 309 a partir do primeiro nucleotídeo do íntron 1 (posição 601 na sequência completa do gene), aumenta a expressão do gene e está associado a uma aceleração drástica do desenvolvimento de tumores na síndrome Li-Fraumeni, assim como em sarcomas esporádicos (Bond et al., 2004). A frequência dos genótipos do SNP309 descrita por alguns autores é a seguinte: T/T 37,0 a

46,4%; T/G 36,4 a 50,2% e; G/G 10,7 a 18,0% (Lind et al., 2006; Sotamaa et al., 2005).

Bougeard et al. (2006) avaliaram o risco de desenvolver câncer de 61 indivíduos, e nos pacientes homozigotos para o alelo G do SNP309 do gene *MDM2* e homozigotos para a variante Arg72 do gene *TP53*, a idade de diagnóstico dos tumores foi 16,9 anos. Já nos pacientes com genótipos T/T para *MDM2* e a p53 Pro/Pro foi 43 anos, mostrando um efeito acumulativo, porque a variante Arg72 tem maior afinidade de associação com a *MDM2* (Bougeard et al., 2006).

Figura 14 - Região promotora do gene *MDM2* e localização do SNP309. A presença do SNP309 no promotor do *MDM2* aumenta a afinidade deste pela proteína reguladora de transcrição Sp1 aumentando a expressão do gene. Reimpresso a partir da revista Cell, Vol. 119, Bond GL, Hu W et al. A Single Nucleotide Polymorphism in the *MDM2* Promoter Attenuates the p53 Tumor Suppressor Pathway and Accelerates Tumor Formation in Humans, p. 592, com permissão do autor.

A proteína Mdm2 foi inicialmente identificada como uma proteína parceira de interação da p53, possuindo uma potente capacidade inibitória sobre a transcrição mediada pela p53 (Momand et al., 1992). O gene *MDM2* está localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q14.3-q15), contendo 12 éxons. A proteína Mdm2 possui 497 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de aproximadamente 56 kDa, sendo constituída por quatro domínios funcionais.

Na porção N-terminal da Mdm2 encontra-se o domínio de interação com a p53 (do resíduo 19 até $\pm$ 108), o qual se liga ao domínio de transativação na região amino terminal da p53. A estrutura cristalográfica do fragmento N-terminal da Mdm2 ligada a um peptídeo do domínio de transativação da p53 demonstrou que o domínio de ligação a p53 da Mdm2 contém uma fenda hidrofóbica na qual os resíduos da p53 (resíduos de 18 a 26) ligam-se como uma hélice alfa anfipática. Os aminoácidos da p53 envolvidos na interação com a Mdm2 também são requeridos para a sua ligação à maquinaria de transcrição (Kussie et al., 1996). A ligação da Mdm2 bloqueia o domínio de transativação da p53, direcionando-a rapidamente à degradação, através de ubiquitinação mediada pela via proteolítica (Kubbutatand Vousden, 1998). Dessa forma, mesmo se a Mdm2 não for capaz de encaminhar a p53 para a degradação, ela atua como uma reguladora negativa da p53, interferindo na habilidade desta de interagir com a maquinaria de transcrição.

O domínio central da Mdm2 é um domínio ácido necessário para a interação com a proteína ribossomal L5, assim como com a proteína

p300/CBP (CREB-binding protein). Em 2001 foram feitos experimentos utilizando mutantes de Mdm2 que não possuíam o domínio central. Estes eram capazes de fazer a ubiquitinação correta da p53, porém falhando em degradá-la (Argentini et al., 2001; Zhu et al., 2001). A jusante deste domínio central encontra-se um domínio de dedo de zinco, responsável pela interação da Mdm2 com as proteínas ribossomais L5 e L11, desempenhando um papel crítico em sua habilidade de degradação da p53 (Lindstrom et al., 2007; Manfredi, 2010), seguido pelo domínio RING, comum em ligases E3, sendo responsável atividade E3 ligase da *MDM2* e servindo como sítio de interação com a proteína MdmX (Tanimura et al., 1999, Manfredi, 2010).

É importante notar que a perda de Mdm2 condicional em vários tecidos adultos provoca morte celular dependente de p53 acompanhada por acúmulo da p53 e ativação da expressão dos genes alvo (Wade et al., 2010; Marine et al., 2010). Surpreendentemente, mutações pontuais no domínio RING como a Mdm2C462A, causa letalidade p53-dependente de uma maneira semelhante à que ocorre quando há a completa deleção do gene *MDM2*. Esta observação sugere que a ligação de Mdm2 com o domínio de transativação de p53 têm pouco efeito, enquanto a atividade de E3 ligase dentro do domínio RING é suficiente para explicar a inibição de p53 mediada por Mdm2 (Clegg et al., 2008). Após a estas descobertas, o domínio RING da Mdm2 se tornou a peça central de regulação p53 *in vivo*.

1.9-Gene *ATM*

O gene *ATM* (OMIM 607585; NM_000051.3) é um gene encontrado mutado na ataxia-telangectasia (AT), e por isso é conhecido como “ataxia telangectasia mutated”. Este gene produz uma proteína quinase serina/treonina, cujos alvos para fosforilação incluem p53, *MDM2*, c-Abl, CHK1 e 2, NBS1, BRCA1 e histona H2AX (Berra et al., 2006).

O gene *ATM* é localizado no cromossomo 11q22-q23 e todo o gene tem 150kb, 66 éxons e é transcrito em um mRNA (NM_000051) com uma sequência codificante de 9168 pares de base (Schrauder et al., 2008) (Figura 15).

FONTE: Adaptado de site Ensembl.org de acesso livre disponível em:
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?g=ENSG00000149311;r=11:108093211-108239829.

Figura 15 - Localização Genômica do gene *ATM*. Figura A - Localização do gene *ATM* no cromossomo 11 (108,093,211 - 108,239,829). Figura B - Localização do gene *MDM2* em maior aumento mostrando apenas o braço longo (q) do cromossomo 12, e a localização do gene *MDM2* na região 2 banda 2 à região 2 banda 3 (11q22-q23).

A proteína ATM (NP_000042) tem papel central na cascata de sinalização de uma das lesões mais citotóxicas, a quebra da dupla fita de DNA (Berra et al., 2006). Fenotipicamente, os pacientes com ataxia-telangectasia apresentam degeneração cerebelar que leva a uma severa disfunção neuromotora progressiva, imunodeficiência, instabilidade genômica, alta incidência de tumores malignos, sensibilidade à radiação ionizante e a agentes que induzem quebra da dupla fita de DNA (Berra et al., 2006).

A proteína ATM apresenta atividade quinase induzida por irradiação ionizante. Além disso, também está envolvida na detecção de danos no DNA e controle da progressão do ciclo celular (Berra et al., 2006). Esse mecanismo de detecção e sinalização dos danos, conhecido como "checkpoint", representa a primeira resposta celular contra lesões no DNA, seguida da consequente ativação de uma rede intrincada de sinalização (Berra et al., 2006). Ao mesmo tempo em que o "checkpoint" permite que as células parem o ciclo celular, também permite que haja tempo para reparar os danos antes de recomeçar o ciclo. No caso de dupla quebra no DNA, gerada, por exemplo, por radiação ionizante ou por erro de replicação, a proteína ATM parece ter um papel central nesse sistema, sendo uma das primeiras transdutoras da presença do dano via fosforilação de vários efetores (Berra et al., 2006). O controle preciso e decisivo dessa proteína inicia-se com a ativação e estabilização de p53, com a proteína ATM fosforilando a proteína p53 na serina-15 em resposta à radiação ionizante (Khanna et al., 1998). ATM também é capaz de fosforilar a histona H2AX,

em um processo que parece ser essencial no recrutamento de fatores de reparo, como RAD51 e BRCA1 (Berra et al., 2006; Cortez et al., 1999). A ATM ativa a proteína BRCA1, que é uma das reguladoras do "checkpoint" das fases S e G2/M (Berra et al., 2006). Outro substrato da proteína ATM é a CHK2, uma proteína quinase relacionada ao "checkpoint" na transição da fase G1/S e da fase S e que, por sua vez, também fosforila p53.

A quinase 2 dependente de ciclina (CDK2) é necessária na síntese de DNA na fase S do ciclo celular, e a CDC25A fosfatase ativa a CDK2 (Falck et al., 2001). A ATM participa da destruição da CDC25A fosfatase em resposta à radiação ionizante, deste modo atuando também no checkpoint da fase S (Falck et al., 2001).

As mutações e polimorfismos do gene *ATM* têm sido levantados como possíveis causas de maior radiosensibilidade do tecido normal de algumas pacientes com câncer de mama (Ho et al., 2007). Ho et al. (2007) demonstraram maior incidência de eventos adversos crônicos (fibrose) em pacientes portadoras de câncer de mama, submetidas à radioterapia que apresentavam o polimorfismo *ATM*_{ex39} 5557G>A (D1853N). Neste polimorfismo de base única (*single nucleotide polymorphism* – SNP), ocorre a substituição da guanina pela adenosina no 5557º nucleotídeo do frame de leitura (posição 5942 do mRNA do gene *ATM*, pois o códon de iniciação ou *start codon* do mRNA está na posição 386), levando a uma alteração na proteína com a troca do aminoácido ácido aspártico (Asp/D) pela asparagina (Asn/N) no códon 1853 (D1853N). Os genótipos do SNP *ATM*_{ex39} 5557G>A (rs1801516) são descritos nos artigos com a seguinte frequência: G/G de

56,2 a 75,6%; G/A de 22,2 a 37,0% e; A/A de 2,1 a 7,5% (Tomminska et al., 2006; Schrauder et al., 2008; Heikkinen et al., 2005).

A ataxia-telangectasia (A-T) é uma doença autossômica recessiva rara causada por uma deficiência na proteína ATM (*ataxia-telangectasia mutated*). Esta doença está relacionada a mutações no gene *ATM* que resultam em uma proteína truncada ou não funcional (Zhang et al., 1997). O gene *ATM* possui 153k pares de bases e está localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q22-q23), sendo composto por 66 éxons. A proteína ATM possui 3056 resíduos com uma massa molecular de aproximadamente 350 kDa, possuindo 5 domínios funcionais. Esta proteína é membro de uma família de proteínas Ser/Thr quinase PIKK (*phosphatidylinositol 3 kinase-like kinase*), a qual inclui as proteínas ATR (*ataxia-telangectasia and RAD3-related*) e mTOR (*mammalian target of rapamycin*), entre outras (Lempiäinen et al., 2009).

Na região N-terminal da ATM, encontra-se o domínio *HEAT repeat*, responsável pela interação com a porção C-terminal da NBS1, proteína associada ao reparo de quebra de fita dupla de DNA. Posteriormente ao domínio *Heat repeat*, está localizado o domínio FAT (FRAP-ATM-TRRAP), o qual interage com o domínio quinase de ATM (localizado logo em seguida), estabilizando a região C-terminal da proteína. O domínio regulatório PIKK (PRD) e o domínio FATC (FRAP-ATM-TRRAP *C-terminal*), localizados na porção C-terminal da proteína, ficam responsáveis pela regulação do domínio quinase da ATM (Lempiäinen et al., 2009).

A ativação da ATM foi primeiramente observada em um leve aumento da atividade quinase em células tratadas com agentes causadores de dano ao DNA (Canman et al., 1998; Banin et al., 1998). Em uma célula livre de danos, a ATM mantém uma conformação homodimérica (Bakkenist et al., 2003), permanecendo inativa. Após a indução da quebra de fita dupla de DNA, a ATM é ativada pela 53BP1, dissociando-se em monômeros (Lee et al., 2010). Com sua ativação, uma porção de ATM nucleares é rapidamente recrutada para o sítio danificado no DNA, onde grande parte permanece por algumas horas (Andegeko et al., 2001), enquanto a outra porção da ATM permanece no citoplasma. A ATM torna-se então um componente ativo das “proteínas de vigília” associadas ao sítio de DSB, sendo responsáveis, direta ou indiretamente, por diversos eventos de fosforilação e modificações pós-traducionais em um intrincado sistema de interações (Figura 16).

Um bom exemplo da regulação em etapas múltiplas por vias dependentes de ATM é a ativação e estabilização da p53 em resposta ao dano ao DNA (Mirzayans et al., 2012; Reinhardt et al., 2012). Este foi o primeiro evento de fosforilação mediado por ATM caracterizado em detalhes, utilizado para descrever sua atividade (Siliciano et al., 1997; Canman et al., 1998; Banin et al., 1998). Essa regulação da p53 dependente de ATM é a modulação central para o transcriptoma celular induzido por DSB (Rashi-Elkeles et al., 2011). Dessa forma, a p53 dirige a expressão não só de genes envolvidos nos mecanismos de sobrevivência celular (regulação de pontos de checagem do ciclo celular), mas também de genes que promovem a

morte celular programada (Sullivan et al., 2011; Choi et al., 2011). A interligação entre esses mecanismos opostos acaba por determinar o destino da célula, sendo influenciado pelo tipo e amplitude dos danos.

Fonte: http://www.biologend.com/pop_pathway.php?id=22

Figura 16 - Rede de interações da proteína ATM após sinalização de dano ao DNA. A ATM desencadeia principalmente uma resposta de reparo ao DNA, podendo levar a célula afetada a destinos como a apoptose e parada do ciclo celular por diversas vias diferentes de sinalização.

Portanto, sendo um dos efeitos da radiação a ação direta no DNA e a eficiência no reparo destas quebras na fita dupla (DSB - *Double Strand Break*) um mecanismo genético complexo (Hall e Giaccia, 2012), avaliaremos polimorfismos de base única de alguns dos genes responsáveis pelo reparo desse tipo de dano (*TP53*, *ATM* e *MDM2*).

2. OBJETIVOS

Objetivo principal

1. Verificar a incidência de efeitos colaterais tardios na bexiga urinária em pacientes submetidas à radioterapia por câncer de colo de útero e analisar a influência de três polimorfismos genéticos de base única (SNP) de três genes, *TP53*, *ATM* e *MDM2*, na radiosensibilidade individual dessas pacientes.

Objetivos secundários

Estudar a associação de cistite actínica crônica com:

2. Características da paciente (idade, comorbidades e hábitos de vida);
3. Fatores relacionados ao tratamento executado (cirurgia prévia, quimioterapia concomitante à radioterapia e dose recebida de radiação);
4. Sintomas clínicos referidos e relação com os achados da cistoscopia (bexiga normal ou com cistite actínica).

3. METODOLOGIA

3.1 - Aspectos éticos

Este estudo foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o nº 0587/08 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás sob o nº 012/2008 (Anexos 7.1 e 7.2).

Após parecer favorável, as pacientes que preenchiam os critérios de inclusão e que foram localizadas pelos dados registrados no prontuário, ou durante retorno de rotina no Serviço de Ginecologia do Hospital Araújo Jorge, foram convidadas a participar do estudo a partir da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 7.3). Com a concordância, as pacientes foram agendadas para serem submetidas a uma cistoscopia, um exame ginecológico, responder um questionário baseado na escala do LENT-SOMA para a bexiga (Anexo 7.4) e doar uma amostra de sangue em um mesmo dia.

3.2-Seleção de pacientes

Foi realizada uma avaliação retrospectiva dos prontuários, fichas de braquiterapia e teleterapia das pacientes portadoras de câncer de colo

uterino submetidas a radioterapia de 1999 a 2004. Foram selecionadas pacientes portadoras de neoplasia maligna do colo do útero em estádios clínicos (Ec) Ia, Ib, IIa, IIb e IIIb, submetidas a radioterapia (teleterapia e braquiterapia), concomitante ou não à quimioterapia, atendidas no Hospital Araújo Jorge (HAJ) em Goiânia, Goiás.

Há uma grande limitação no estudo frente a necessidade de selecionar pacientes que ainda estivessem vivas após longo tempo de seguimento.

3.2.1 - Critérios de inclusão

- a) Pacientes com diagnóstico histopatológico de carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma ou carcinoma adenoescamoso do colo uterino submetidas à radioterapia com teleterapia e braquiterapia;
- b) Seguimento mínimo de cinco anos;
- c) Assinatura do TCLE (Res. 196/96 e complementares, CNS);
- d) Concordância em comparecer na data pré-agendada para realização dos procedimentos do estudo.

3.2.2 - Critérios de exclusão

- a) Casos de pacientes que faleceram ou não foram localizadas.
- b) Pacientes que realizaram radioterapia em outros serviços.
- c) Pacientes sem condições clínicas para realização de cistoscopia.

- d) Falta de condições cognitivas para responder ao questionário de efeitos colaterais.
- e) Comprometimento tumoral do terço inferior da vagina;
- f) Reirradiação pélvica.

Foram coletados dados referentes às características do tumor, idade da paciente, presença de comorbidades (hipertensão arterial sistêmica, diabetes, doenças do aparelho urinário), dose de teleterapia e de braquiterapia, presença de efeitos colaterais urinários tardios.

O dimensionamento da amostra considerou um n de 500, um $p = 0,40$ (conforme achados clínicos de maior grau das primeiras 50 pacientes avaliadas), e (erro da estimativa) = 0,10 e GC (grau de confiança) = 90% (Arango, 2005), de modo que a amostra de 50 pacientes atendeu ao tamanho amostral necessário.

Uma busca ativa das pacientes pelos dados que constam nos prontuários foi realizada começando por 2004 e retrocedendo na ordem numérica dos registros até se completar a amostra desejada de 50 sujeitos de pesquisa que continuaram fazendo seguimento no Serviço de Ginecologia do Hospital Araújo Jorge. Essas pacientes foram contatadas e aceitaram participar da fase prospectiva do trabalho assinando o termo de consentimento livre e esclarecido, após a orientação sobre a pesquisa e a autorização para a coleta de uma amostra de 10 ml de sangue para análise dos polimorfismos dos genes de interesse e para a realização de uma cistoscopia (realizada por um urologista acompanhado da radioterapeuta responsável pela pesquisa).

3.3 - Radioterapia realizada

3.3.1 - Técnica da Teleterapia

O tratamento com radiação consistiu de uma combinação de radioterapia externa (teleterapia) e interna (braquiterapia). Na teleterapia foi prescrita a dose prescrita de 45 Gy em toda a pelve (cinco frações de 1,8 Gy por cinco dias seguidos com dois dias de intervalo). O tratamento foi realizado em um acelerador linear com fótons de 6 MV (Clinac 600C, Varian, Palo Alto, CA), usando a técnica de quatro campos em *box* com radioterapia convencional com planejamento baseado em radiografias ortogonais.

3.3.2 - Técnica da Braquiterapia

A braquiterapia de alta taxa de dose (BATD) pós-carga por controle remoto com Irídio-192 foi realizada usando aplicadores metálicos em anel (*Nucletron, an Elekta company [Elekta AB, Estocolmo, Suécia]*), com diferentes diâmetros (26, 30 e 34 mm) e comprimentos de sonda intrauterina (20, 40 e 60 mm), sendo que nas pacientes operadas foi utilizado apenas o anel (Figura 17). É rotina colocar-se uma sonda vesical de

Folley com preenchimento do balão com 7 ml de solução radiopaca. O equipamento utilizado foi o microSelectron-HDR pós-carga com controle remoto (*Nucletron, an Elekta company [Elekta AB, Estocolmo, Suécia]*) com fonte de Irídio-192 com atividade nominal de 10 Ci.

Após a colocação do aplicador, foram feitas duas radiografias planas ortogonais, uma anteroposterior e outra laterolateral. A partir dessas radiografias foram definidos o ponto A e os pontos de referência da bexiga e do reto segundo o ICRU Report 38 (ICRU, 1985). O ponto de bexiga fica no centro do balão da sonda vesical na radiografia AP e, na radiografia laterolateral, na projeção desse ponto na parede posterior do balão (Figura 17 C e D). O sistema de planejamento usado foi o PLATO® (*Nucletron, an Elekta company [Elekta AB, Estocolmo, Suécia]*).

As pacientes foram submetidas a quatro inserções de BATD, uma por semana, recebendo 7 Gy, calculados no ponto A por inserção, iniciando em média 2 semanas após o início da teleterapia, exceto as pacientes operadas que iniciavam na mesma semana do início da teleterapia.

Figura 17 - Aplicadores usados na braquiterapia intracavitária de alta taxa de dose. A) aplicadores (afastador retal, sonda intra-uterina e colpostato em anel); B) Vista lateral do sistema montado; C) radiografia anteroposterior com o sistema posicionado na paciente e o ponto de referência da bexiga segundo o ICRU 38 (seta); D) radiografia lateral com o sistema posicionado e o ponto de referência da bexiga segundo o ICRU 38 (seta).

3.4 - Classificação da toxicidade

A gradação dos efeitos colaterais foi feita pelo sistema LENT-SOMA (*Late Effects of Normal Tissues – Subjective, Objective, Management and Analytic system*) (LENT SOMA tables, 1995), a partir dos dados colhidos pelo prontuário (os quais não apresentavam sistematização) e a partir de um

questionário baseado na escala do LENT-SOMA para a bexiga (Anexos 7.4 e 7.5). Originalmente foi recomendado que os escores SOMA fossem somados e então divididos pelo número de perguntas para se definir um escore global, contudo como esse método subestima a severidade de alguns efeitos colaterais pela “diluição” do escore, foi considerado o valor mais alto encontrado, assim como realizado por ANACAK et al. (2001). Pacientes que desenvolveram reações adversas crônicas classificadas com o escore LENT-SOMA maior ou igual a dois foram consideradas pacientes com efeitos adversos de alto grau.

Todas as pacientes foram submetidas à cistoscopia. A presença de cistite actínica foi investigada, assim como sua intensidade, modo de apresentação (difusa ou localizada), porção da bexiga atingida e presença de fístula. A intensidade da cistite observada na cistoscopia seguiu o critério objetivo da escala LENT-SOMA e foi classificada de zero a quatro. Para a avaliação dos sintomas clínicos, o resultado da cistoscopia não foi considerado em conjunto para a graduação conforme o LENT-SOMA, tendo sido avaliado como uma variável à parte e considerada como o padrão-ouro para a confirmação de cistite actínica crônica.

3.5 - Estimativa de dose na bexiga

Para calcular a dose biológica efetiva (BED) na bexiga foram utilizados valores de $\alpha/\beta = 3$ e 5. A dose recebida na teleterapia foi somada à dose recebida no ponto de referência da bexiga segundo o ICRU 38 após

a conversão de ambas em dose biológica efetiva. Tendo sido radioterapia externa convencional, padronizou-se que a bexiga, e o ponto de referência de bexiga, receberam a dose total da radioterapia externa. Para tal padronização foi considerado que a dose da radioterapia externa é aplicada em grandes porções da parede vesical, chegando a 60-90% de toda bexiga conforme demonstrado por Haie-Meder e Potter (2004). A dose recebida no reforço parametrial não foi considerada na dose da bexiga por ter sido realizado com dois campos AP-PA com bloco de proteção central.

3.6 - Obtenção das amostras de sangue e extração de DNA genômico

Foram coletadas 50 amostras de 10ml de sangue periférico heparinizado. Após a coleta, o material foi submetido à extração de DNA e armazenado em microtubos a -20°C.

A extração de DNA a partir do sangue periférico coletado de cada paciente foi realizada com equipamento e a tecnologia desenvolvida pela Invitrogen (Carlsbad, CA; Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) (Figura 18). O kit *iPrep™ PureLink™ gDNA Blood* possui a tecnologia das *Dynabeads MyOne™ SILANE* que são partículas magnéticas monodispersas (1 µm) com uma superfície tipo sílica e uma área de superfície específica. A purificação do DNA da amostra foi obtida utilizando o procedimento de

purificação baseado em partículas e evita o uso de centrífugas e sistemas a vácuo, além de extrair 13 amostras em 30 minutos.

No processo totalmente automatizado, as células foram lisadas com o tampão de lise do kit e as proteínas digeridas com proteinase K. O lisado foi misturado com Dynabeads MyOne™ SILANE para subsequente ligação do DNA da amostra. O DNA ligado às partículas magnéticas foi separado do lisado utilizando separação magnética. As partículas foram lavadas exaustivamente com os tampões de lavagem para remoção dos contaminantes. O DNA genômico foi então eluído com tampão apropriado previsto no kit.

A integridade do DNA foi analisada em gel de agarose 0,8% e fotodocumentado pelo Molecular Imager Gel Doc™ XR System (Bio-Rad Laboratories INC). O DNA genômico foi quantificado utilizando o bioanalisador de DNA Nanodrop (ThermoScientific, USA).

3.7 - Amplificação das regiões gênicas de *TP53*, *ATM* e *MDM2*

A amplificação das regiões gênicas dos três genes foi realizada no Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA; Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). Ao DNA genômico da paciente foi adicionado uma *master mix* de AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA; Life Technologies Corporation, Carlsbad,

CA), a qual contém em sua mistura o tampão para PCR, deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP) e AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase High Fidelity.

Figura 18 - A extração de DNA a partir do sangue periférico realizada com equipamento *iPrep*™.

Gene TP53

Para amplificação da região do gene *TP53* que inclui o códon 72 foi definido um par de oligonucleotídeos. Foi usada como sequência iniciadora direta a 5' - ATGGAGGAGCCGCAGTCAGA - 3' (posição 10953-10972) e, como sequência iniciadora reversa, a 5'-TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC - 3' (posição 11457-11479), tendo como produto da reação em cadeia da polimerase (PCR do inglês

Polymerase Chain Reaction) um fragmento de 527 pares de base (pb) (Tabela 1). Esta amplificação foi realizada com um ciclo de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos com as seguintes etapas:

- Desnaturação do DNA da amostra: 95°C por 30 segundos;
- Anelamento dos oligonucleotídeos (*primers*): 61,3°C por 30 segundos;
- Extensão: 72° C por um minuto.

Após 40 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 72°C por sete minutos. Por fim, após esta, a reação foi mantida a 4°C até o congelamento ou até a eletroforese.

Gene ATM

Para amplificação da região do gene *ATM* que inclui o códon 1853 foi definido um par de oligonucleotídeos, dos quais foram usadas como sequência iniciadora direta a 5' – AGCAGTATGTTGAGTTTATGGC - 3' (posição 81700-81721) e como sequência iniciadora reversa, a sequência 5'-TGAATCCAAGTTTGCAGG - 3' (posição 82003-82017), gerando um produto de PCR de 317 pares de bases (Tabela 1). Essa amplificação foi realizada com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos contendo as seguintes etapas:

- Desnaturação do DNA da amostra: 94°C por 30 segundos;
- Anelamento dos oligonucleotídeos (*primers*): 54,3°C por 30 segundos;

- Extensão: 72°C por um minuto.

Após 40 ciclos foi realizada uma etapa de extensão final de 72°C por sete minutos. Por fim, após esta, a reação foi mantida a 4°C até o congelamento ou a eletroforese.

Gene MDM2

Para amplificação da região do gene *MDM2* que contém a posição 601 do mesmo foi utilizado um par de oligonucleotídeos iniciadores dos quais foram usadas como sequência iniciadora direta a 5' – CGGGAGTTCAGGGTAAAGGT - 3' e, como sequência iniciadora reversa a 5' - AGCAAGTCGGTGCTTACCTG – 3' que juntas produziram um fragmento de PCR de 352 pares de bases (Tabela 1). Essa amplificação foi realizada com um ciclo de desnaturação a 95° C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos contendo as seguintes etapas:

- Desnaturação do DNA da amostra: 94° C por 30 segundos;
- Anelamento dos oligonucleotídeos (*primers*): 60,3° C por 30 segundos;
- Extensão: 72° C por 1 minuto.

Após 40 ciclos foi realizada uma etapa de extensão final de 72°C por sete minutos. Por fim, após esta, a reação foi mantida a 4°C até o congelamento ou a eletroforese.

Tabela 1. Descrição das sequências dos oligonucleotídeos iniciadores.

Gene/Polimorfismo	Oligonucleotídeos	Fragmento (pb)
<i>TP53</i> / s1042522	Oligonucleotídeo direto 5' - ATGGAGGAGCCGCAGTCAGA - 3'	527
	Oligonucleotídeo reverso 5' - TCTGGGAAGGGACAGAAAGATGAC - 3'	
	SNaPshot R72P 5' - GCCAGAGGCTGCTCCCC - 3'	
<i>ATM</i> /rs1801516	Oligonucleotídeo direto 5' – AGCAGTATGTTGAGTTTATGGC - 3'	317
	Oligonucleotídeo reverso 5' - TGAATCCAAGTTTGCAGG - 3'	
	SNaPshot D1853N 5' - GATTCATGATATTTTACTCCAA -3'	
<i>MDM2</i> / rs2279744	Oligonucleotídeo direto 5' - CGGGAGTTCAGGGTAAAGGT - 3'	352
	Oligonucleotídeo reverso 5' - AGCAAGTCGGTGCTTACCTG – 3'	
	SNaPshot SNP309T->G 5' - CCGGGGGCTGCGGGGCGCT – 3'	

Avaliação e purificação dos produtos de PCR antes do sequenciamento

Para avaliação dos produtos de PCR, os mesmos foram submetidos à eletroforese para conferência dos tamanhos esperados. Em seguida os fragmentos foram purificados utilizando ExoSAP-IT™ (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.). Foi utilizado 5µl da reação pós-amplificação e 2µl da enzima ExoSAP-IT, totalizando 7µl de reação. O sistema de reação

foi incubado a 37°C por 15 minutos para remoção do excesso de sequências iniciadoras e nucleotídeos oriundos da reação de PCR. Finalmente, a reação foi incubada a 80°C por 15 minutos para total inativação da enzima. Nesse sentido, o produto amplificado estava pronto para ser sequenciado.

3.8- Reação de Sequenciamento por Extensão de Base Única

O sequenciamento foi realizado com a reação de SNaPshot™ (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). Foram preparados três tipos de microtubos de 200 µl para a reação:

- Reação de controle positivo: adicionado 5 µl do mix de reação de SNaPshot™, 2 µl da amostra controle, 1 µl de oligonucleotídeos-controle e 2 µl de água deionizada (total 10 µl);
- Reação de controle negativo: adicionado 5 µl do mix de reação de controle negativo, 1 µl de oligonucleotídeos-controle e 4 µl de água deionizada (total 10 µl);
- 50 Microtubos com amostra das pacientes: 5 µl do mix de reação de SNaPshot™, 3 µl de pool de produtos de PCR, 1 µl de pool de oligonucleotídeos de SNaPshot™ e 1 µl de água deionizada (total 10 µl).

Tanto as amostras quanto as reações-controle foram colocadas em microplacas e levadas ao termociclador. A mistura da reação de SNaPshot™ contém AmpliTaq DNA polimerase, ddNTPs marcados por fluorescência e tampão de reação. O oligonucleotídeo interno foi pré-desenhado segundo recomendações do fabricante ao lado do polimorfismo de interesse. Para a reação de sequenciamento foram definidos oligonucleotídeos internos diretos. Para o gene *TP53* foi utilizado o oligonucleotídeo interno com a seguinte sequência: 5' - GCCAGAGGCTGCTCCCC - 3'. Para o gene *ATM*, o oligonucleotídeo definido foi: 5'- GATTCATGATATTTTACTCCAA -3'. Para o gene *MDM2*, o oligonucleotídeo interno foi 5'- CCGGGGGCTGCGGGGCCGCT - 3' (Tabela 1).

Os tubos foram colocados no termociclador com volume ajustado para 10 µl. Os passos a seguir foram repetidos por 25 ciclos:

- Desnaturação do DNA da amostra: Aquecimento rápido até 96°C, permanecendo nessa temperatura por 10 segundos;
- Anelamento dos oligonucleotídeos (*primers*): Resfriamento rápido até 55,3°C para o *TP53*, 49°C para o *ATM* e 83,2°C para o *MDM2* permanecendo nessa temperatura por 5 segundos;
- Extensão: Aquecimento rápido até 60°C, permanecendo nessa temperatura por 30 segundos.

Após a termociclagem as amostras foram resfriadas até 4°C, permanecendo nessa temperatura até que o tratamento pós-extensão estivesse preparado. Para realização a eletroforese capilar no ABI PRISM

3130xL Genetic Analyzer, o sequenciador foi configurado para capilares de 36 cm e para o polímero POP-4, por se tratar da técnica de SNaPshot™ (Applied Biosystems, Foster City, CA; Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). Para a preparação das amostras para eletroforese foram adicionados 9 µl de Hi-Di formamida em cada tubo; 0,5 µl de volume final de produtos de SNaPshot™ e 0.5 µl de Gene-Scan-120-LIZ. Os poços foram agitados e centrifugados brevemente e as amostras foram desnaturadas ao serem colocadas a uma temperatura de 95°C por 5 minutos. Após esta etapa as amostras foram deixadas a 4°C até que fosse possível realizar o próximo passo que é o carregamento do analisador. Ao final desse processo foi realizada a eletroforese capilar, na qual as bases fluorescentes incorporadas foram sequenciadas.

3.9 - Análise estatística

Após a coleta dos dados em questionário e levantados em prontuário, foi realizada a caracterização da amostra por meio de cálculos de medida de dispersão e tendência central. As variáveis foram testadas para verificação de possíveis associações por meio dos testes *t* de Student, para variáveis contínuas paramétricas, ou Mann-Whitney quando essas não tinham distribuição normal. Para avaliar possíveis associações entre as variáveis categóricas foram utilizados teste do qui-quadrado (χ^2), teste exato de Fisher e teste de Wilcoxon. A associação entre os polimorfismos de *TP53*, *ATM* e

MDM2 e os efeitos adversos à radioterapia foi estimada pelo teste de χ^2 ou teste exato de Fisher. Todas as análises foram realizadas considerando o nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95%.

As análises foram realizadas com o pacote de software estatístico IBM SPSS Statistics versão 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

4. RESULTADOS

Foram levantados os dados de contato presentes nos prontuários de todas as pacientes que preenchiam os critérios de inclusão iniciando em 2004 e retrocedendo até que se conseguisse convidar e incluir no estudo 50 pacientes, de modo que foram incluídas pacientes que haviam sido submetidas à radioterapia por câncer de colo de útero de 1999 a 2004. As características da amostra incluída no estudo estão descritas na tabela 2.

Não foi encontrada relação estatisticamente significativa entre a idade e a ocorrência de cistite diagnosticada na cistoscopia e tampouco entre a idade e os sintomas urinários tardios avaliados pelos dados do prontuário, pelo questionário e pela maior graduação entre os dois ($p = 1,00$; $p = 0,30$; $p = 0,96$ e $p = 0,40$, respectivamente).

O estadiamento do tumor também não influenciou no surgimento dos efeitos colaterais urinários conforme avaliado pela cistoscopia, pelos dados do prontuário, pelo questionário e pela maior graduação entre os dois ($p = 0,13$; $p = 0,81$; $p = 0,74$ e $p = 0,87$, respectivamente), tendo o mesmo ocorrido em relação à comorbidade diabetes ($p = 0,68$; $p = 0,21$; $p = 0,14$ e $p = 0,78$, respectivamente).

Quando avaliamos a presença da comorbidade hipertensão arterial sistêmica e a ocorrência de sintomas urinários tardios, não houve relação significativa com os achados da cistoscopia, dados do prontuário e

nem com o maior grau de sintomas relatado ($p = 0,27$; $p = 0,66$ e $p = 0,18$, respectivamente), contudo, houve associação com os dados colhidos pelo questionário ($p = 0,03$). Avaliamos a idade dos grupos com e sem hipertensão e verificamos que as pacientes com hipertensão, e que eram o grupo com mais queixas pelo questionário, eram significativamente mais velhas que as sem hipertensão (idade ao diagnóstico $64,8 \pm 8,1$ e $54,9 \pm 10,4$ anos respectivamente, $p = 0,001$).

O etilismo não pode ser avaliado, pois apenas uma paciente relatava esse ter esse hábito de vida. As demais variáveis (tabagismo e outros tratamentos) não apresentaram relação estatisticamente significativa com os efeitos urinários tardios (Tabela 3).

Para se avaliar o possível o viés que seria as pacientes com maior tempo de seguimento apresentando maiores chances de efeitos tardios, o tempo de seguimento foi avaliado em relação à graduação clínica da cistite coletada do prontuário, estabelecida pelo questionário e o maior grau relatado, além da graduação na cistoscopia. Não houve relação estatisticamente significativa em nenhum caso ($p = 0,44$; $p = 0,28$; $p = 0,91$ e $p = 0,51$, respectivamente). Como os dados do prontuário não eram detalhados e os do questionário apresentavam a limitação do viés de memória, não foi possível avaliar o tempo para o surgimento dos sintomas urinários em cada paciente.

Tabela 2. Caracterização da amostra pelos dados clinicodemográficos, hábitos de vida e tipo de tratamento realizado.

	n = 50
Idade (anos)	
Média $\pm$ desvio padrão	59,6 $\pm$ 10,6
Mínimo – Máximo	36 – 79
Etilismo	1 (2%)
Tabagismo	18 (36%)
Tempo de seguimento (anos)	
Média $\pm$ desvio padrão	9,0 $\pm$ 1,2
Mínimo – Máximo	6,5 – 11,5
Estadiamento clínico	
Ia	5 (10%)
Ib	24 (48%)
Ila	5 (10%)
Ilb	10 (20%)
IIIb	5 (10%)
IVa	1 (2%)
Histologia do tumor primário do colo do útero	
Carcinoma de células escamosas	46 (92%)
Adenocarcinoma	3 (6%)
Adenoescamoso	1 (2%)
Grau de diferenciação	
Grau I	1 (2%)
Grau II	26 (52%)
Grau III	12 (24%)
Grau IV	1 (2%)
Sem outras especificações	10 (20%)
Diabetes	7 (14%)
Hipertensão	24 (48%)
Histerectomia com braquiterapia adjuvante	31 (62%)
Quimioterapia concomitante à teleterapia	6 (12%)

Tabela 3 - Avaliação do tabagismo e de outras variáveis relacionadas a outros tratamentos realizados e sua relação com os efeitos urinários tardios considerando as quatro variáveis analisadas separadamente (n = 50).

Variável analisada	Variável dependente	p*
Tabagismo	Cistoscopia	0,77
	Prontuário	0,31
	Questionário	0,09
	Maior grau clínico	0,53
QT concomitante à RT	Cistoscopia	0,38
	Prontuário	0,90
	Questionário	0,27
	Maior grau clínico	0,18
Histerectomia (S/N)	Cistoscopia	0,39
	Prontuário	0,24
	Questionário	0,52
	Maior grau clínico	0,37
Cirurgia (adjuvância S/N)	Cistoscopia	0,43
	Prontuário	0,16
	Questionário	0,77
	Maior grau clínico	0,44

* Realizado teste exato de Fisher, considerando nível de significância $\alpha = 0,05$.
 Abreviaturas: QT = quimioterapia; RT = radioterapia; S/N = sim ou não.

Os efeitos colaterais tardios na bexiga, avaliados pelos critérios do LENT-SOMA, estão descritos na Tabela 4. Para minimizar o viés de mensuração por serem dados retrospectivos colhidos no prontuário fora de protocolo, as pacientes responderam a um questionário e os dados das duas fontes foram comparados.

Tabela 4. Efeitos tardios na bexiga (LENT-SOMA) segundo dados colhidos pelas respostas ao prontuário, questionário e maior grau relatado e segundo o resultado da cistoscopia (n = 50).

LENT-SOMA	Prontuário	Questionário	Maior grau relatado	Cistoscopia
Grau 0	33 (66%)	9 (18%)	7 (14%)	22 (44%)
Grau I	0 (0%)	26 (52%)	20 (40%)	20 (40%)
Grau II	11 (22%)	14 (28%)	16 (32%)	7 (14%)
Grau III	6 (12%)	0 (0%)	6 (12%)	0 (0%)
Grau IV	0 (0%)	1 (2%)	1 (2%)	1 (2%)
Total	50 (100%)	50 (100%)	50 (100%)	50 (100%)

Para a avaliação dos sintomas clínicos, o resultado da cistoscopia não foi considerado em conjunto com esses para o estabelecimento da graduação conforme o LENT-SOMA, tendo a cistoscopia sido avaliada como uma variável à parte e considerada como o padrão ouro. Na cistoscopia realizada não foi observado nenhum caso de recidiva tumoral invadindo a bexiga, contudo 56% das pacientes apresentaram algum grau de cistite actínica (Tabela 4; Figura 19).

Os efeitos colaterais descritos nos prontuários estavam subestimados em relação aos efeitos colaterais descritos nas respostas ao questionário ($p = 0,006$). Sendo assim, seguindo as orientações propostas para o uso da escala do LENT-SOMA, foi considerado o maior grau relatado entre as duas fontes e computado como uma terceira variável que foi deste modo denominada (Anacak et al., 2001).

Figura 19 - Imagens de cistoscopias de três pacientes do estudo, portadoras de carcinoma de colo uterino, após terem sido submetidas à teleterapia pélvica (45 Gy) e braquiterapia intracavitária de alta taxa de dose (28 Gy/ 7 Gy por inserção). Paciente A – Mucosa vesical normal; Paciente B – paciente com cistite actínica SOMA Grau I; Paciente C – paciente com cistite actínica SOMA Grau II.

A graduação conforme o LENT-SOMA dos efeitos tardios na bexiga segundo dados colhidos pelas anotações do prontuário não demonstrou relação com os resultados da cistoscopia ($p = 0,10$). A graduação conforme o LENT-SOMA dos efeitos tardios na bexiga segundo as queixas relatadas pelo questionário e o maior grau relatado entre estas e as do prontuário demonstraram que quanto maior a graduação clínica, maior a graduação cistoscópica ($p = 0,005$ e $p = 0,010$, respectivamente).

A dose biológica efetiva (BED) da teleterapia, da braquiterapia e da radioterapia total foi calculada. Os resultados das relações entre a BED e os achados da cistoscopia, dados dos prontuários, dos questionários e o maior grau relatado entre estes estão apresentados nas tabelas 5 a 8, respectivamente. Não foi encontrada relação estatisticamente significativa entre a dose biológica efetiva e os achados da cistoscopia e os sintomas urinários crônicos tanto registrados pelos dados do prontuário como os dados de maior grau entre prontuário e questionário (Tabelas 5, 6 e 8). Contudo, foi encontrada relação estatisticamente significativa entre a BED da radioterapia total, tanto com α/β igual a três como igual a cinco, e os sintomas referidos pelo questionário ($p = 0,04$) (Tabela 7). As pacientes que tiveram seus sintomas graduados em maior ou igual a dois pela escala do LENT-SOMA receberam uma média de dose maior que as que apresentaram sintomas menos graves (grau < 2).

Tabela 5 - Dose biológica efetiva na bexiga por tratamento realizado considerando dois valores distintos de α/β de acordo com o resultado da cistoscopia (n = 50).

	Cistoscopia		p-valor [#]
	Normal	Cistite actínica	
BED (Gy ₃) teleterapia	72,2 ± 1,1	74,4 ± 6,7	0,096
BED (Gy ₃) braquiterapia	20,8 ± 11,3	21,2 ± 11,0	0,902
BED (Gy ₃) radioterapia	93,0 ± 11,8	95,6 ± 13,8	0,484
BED (Gy ₅) teleterapia	61,3 ± 0,4	63,1 ± 5,2	0,074
BED (Gy ₅) braquiterapia	16,6 ± 8,4	16,9 ± 8,1	0,900
BED (Gy ₅) radioterapia	77,9 ± 8,5	80,1 ± 10,3	0,439

[#] Teste t de Student

Tabela 6 - Dose biológica efetiva na bexiga por tratamento realizado considerando dois valores distintos do α/β de acordo com a graduação na escala LENT-SOMA em relação aos dados registrados no prontuário (n = 50).

	LENT-SOMA		p-valor [#]
	Grau < 2	Grau ≥ 2	
BED (Gy ₃) teleterapia	72,4 ± 2,2	75,5 ± 8,1	0,147
BED (Gy ₃) braquiterapia	21,2 ± 10,0	20,5 ± 13,0	0,841
BED (Gy ₃) radioterapia	93,6 ± 10,7	96,0 ± 16,7	0,601
BED (Gy ₅) teleterapia	61,5 ± 1,7	63,9 ± 6,2	0,137
BED (Gy ₅) braquiterapia	17,0 ± 7,4	16,4 ± 9,7	0,803
BED (Gy ₅) radioterapia	78,5 ± 7,8	80,3 ± 12,4	0,596

Teste t de Student

Tabela 7 - Dose biológica efetiva na bexiga por tratamento realizado considerando dois valores distintos do α/β de acordo com a graduação na escala LENT-SOMA em relação aos relatados no questionário (n = 50).

	LENT-SOMA		p-valor [#]
	Grau < 2	Grau ≥ 2	
BED (Gy ₃) teleterapia	72,4 ± 1,9	76,1 ± 8,6	0,12
BED (Gy ₃) braquiterapia	19,2 ± 10,3	25,2 ± 11,8	0,07
BED (Gy ₃) radioterapia	91,5 ± 10,6	101,3 ± 15,4	0,04
BED (Gy ₅) teleterapia	61,5 ± 1,6	64,2 ± 6,6	0,13
BED (Gy ₅) braquiterapia	15,5 ± 7,6	19,9 ± 8,7	0,08
BED (Gy ₅) radioterapia	77,0 ± 7,9	84,1 ± 11,3	0,04

Teste t de Student

Tabela 8 - Dose biológica efetiva na bexiga por tratamento realizado considerando dois valores distintos do α/β de acordo com a graduação na escala LENT-SOMA em relação ao de maior grau relatado (n = 50).

	LENT-SOMA		p-valor [#]
	Grau < 2	Grau ≥ 2	
BED (Gy ₃) teleterapia	72,5 ± 2,2	74,7 ± 7,1	0,17
BED (Gy ₃) braquiterapia	20,2 ± 9,8	22,0 ± 12,4	0,57
BED (Gy ₃) radioterapia	96,6 ± 10,2	96,6 ± 15,5	0,30
BED (Gy ₅) teleterapia	61,6 ± 1,8	63,2 ± 5,4	0,20
BED (Gy ₅) braquiterapia	16,2 ± 7,2	17,5 ± 9,2	0,59
BED (Gy ₅) radioterapia	77,8 ± 7,6	80,7 ± 11,4	0,32

Teste t de Student

Foi realizada a genotipagem para os polimorfismos do códon 72 do gene *TP53* (P72R), do promotor 2 do gene *MDM2* (SNP309 T→G) e da posição 5557 do *frame* de leitura do gene *ATM* (*ATM*_{ex39} 5557G>A) das 50 pacientes utilizando a técnica de extensão de base única (Tabela 9).

A Figura 20 mostra a análise eletroforética em gel de agarose a 0,8% da extração automatizada do DNA genômico de 36 pacientes como exemplo. O perfil de migração mostra uma única banda revelando integridade do material extraído. A quantidade de DNA genômico extraído em µg/ml está mostrada nessa figura.

A Figura 21 mostra a análise eletroforética, nas mesmas condições descritas anteriormente, da amplificação do fragmento de 317 pares de bases do gene *ATM*. A amplificação para os outros fragmentos de

interesse (*TP53* e *MDM2*) também mostraram banda única no peso molecular correspondente.

Tabela 9 - Genotipagem dos três polimorfismos genéticos das pacientes portadoras de câncer de colo de útero pela técnica de SNaPshot® (n = 50).

Polimorfismo	Frequência	Porcentagem (%)
<i>TP53</i> (P72R)		
p53 ProPro (CC)	07	14,0
p53 ProArg (CG)	16	32,0
p53 ArgArg (GG)	27	54,0
<i>MDM2</i> (SNP309T→G)		
SNP309 TT	22	44,0
SNP309 TG	22	44,0
SNP309 GG	06	12,0
<i>ATM</i> ex39 5557G>A		
<i>ATM</i> 5557 GG	42	84,0
<i>ATM</i> 5557 GA	08	16,0

Na avaliação do genótipo de cada um dos três polimorfismos genéticos e sua relação com os efeitos urinários tardios considerando as quatro variáveis analisadas separadamente (Tabela 10), a única relação estatisticamente significativa foi entre o polimorfismo de nucleotídeo único do gene *MDM2* e os resultados encontrados na cistoscopia.

Figura 20 - Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% da integridade e quantificação do DNA genômico extraído das primeiras 36 pacientes.

Figura 21 - Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% dos produtos do PCR da região em estudo do gene *ATM* das 50 pacientes.

Tabela 10 - Avaliação dos três polimorfismos genéticos pela técnica de SNaPshot® e sua relação com os efeitos urinários tardios considerando as quatro variáveis analisadas separadamente (n = 50).

SNP	Variável analisada	<i>p</i> *
<i>TP53</i> (P72R)	Cistoscopia	0,92
	Prontuário	0,50
	Questionário	0,80
	Maior grau clínico	0,84
<i>MDM2</i> (SNP309T→G)	Cistoscopia	0,001 §
	Prontuário	0,13
	Questionário	0,86
	Maior grau clínico	0,70
<i>ATM</i> ex39 5557G>A	Cistoscopia	0,44
	Prontuário	0,75
	Questionário	0,86
	Maior grau clínico	0,95

* Realizado teste exato de Fisher, considerando nível de significância $\alpha=0,05$.

§ Pacientes homozigotas TT e heterozigotas TG do SNP309T→G apresentaram maior incidência de cistite actínica na cistoscopia que as pacientes homozigotas GG.

Analizando separadamente os genótipos do *MDM2* em relação à intensidade da cistite (Tabela 11), a diferença foi entre as pacientes heterozigotas TG e as homozigotas GG ($p = 0,001$) apenas. Não houve diferença entre homozigotas TT e heterozigotas TG ($p = 0,13$) ou entre as homozigotas TT e as homozigotas GG ($p=0,07$).

Tabela 11 - Avaliação do *MDM2* (SNP309T→G) e sua relação com a intensidade da cistite diagnosticada pela cistoscopia classificada conforme a escala do LENT-SOMA (n = 50).

Genótipo	SOMA grau 0	SOMA grau 1	SOMA grau 2	SOMA grau 4	p*
<i>MDM2</i> (SNP309 TT)	11	07	03	01	0,011
<i>MDM2</i> (SNP309 TG)	05	13	04	00	
<i>MDM2</i> (SNP309 GG)	06	00	00	00	

* Razão de verossimilhança (*Likelihood Ratio*), considerando nível de significância $\alpha = 0,05$.

Sobre a diferença estatística entre os genótipos *MDM2* TG e GG, nenhuma das seis pacientes GG tinha o polimorfismo *ATM* ex39 5557G>A, o qual é associado à maior radiosensibilidade em outros tecidos normais. Porém, analisando só as pacientes *ATM* GG, a diferença entre os genótipos de *MDM2* permanece ($p < 0,001$).

Após descartar que houve influência do gene *ATM* nos resultados encontrados para o gene *MDM2*, foram analisados os subgrupos dos genótipos do *TP53* em relação ao genótipo do *MDM2* e a ocorrência de cistite diagnosticada pela cistoscopia (Tabelas 12 e 13). No subgrupo de pacientes com o genótipo *TP53* (P72R) GG, foi observada diferença estatística na ocorrência de cistite diagnosticada pela cistoscopia entre aquelas com genótipo *MDM2* TT e naquelas com *MDM2* TG, tendo havido maior incidência de cistite nas pacientes com a proteína p53 mais apta para a apoptose, mas com o polimorfismo do gene *MDM2* que não promove maior degradação da p53 (*MDM2* TT) ($p = 0,03$) (Tabela 13).

Tabela 12 - Avaliação do *MDM2* (SNP309T→G) e sua relação com o genótipo *TP53* (P72R) (n = 50).

Genótipos	<i>TP53</i> CC	<i>TP53</i> CG	<i>TP53</i> GG	Total
<i>MDM2</i> (SNP309 TT)	04	05	13	22
<i>MDM2</i> (SNP309 TG)	03	09	10	22
<i>MDM2</i> (SNP309 GG)	00	02	04	06 [§]
Total	07	16	27	50

[§] Todas essas pacientes eram *ATM* ex39 5557 GG.

Tabela 13 - Porcentagem da cistite diagnosticada pela cistoscopia em relação ao genótipo do SNP309 do gene *MDM2* agrupando as pacientes pelo genótipo do códon 72 do gene *TP53* (n = 50).

	Incidência de cistite (% e n casos/ n total)	Comparações entre os genótipos do <i>MDM2</i>	p*
<i>TP53</i> (P72R) CC			
<i>MDM2</i> TT	25 (1/4)	TT x TG	0,14
<i>MDM2</i> TG	100 (3/3)		
<i>TP53</i> (P72R) CG			
<i>MDM2</i> TT	20 (1/5)	TT x TG	0,09
<i>MDM2</i> TG	77,8 (7/9)	TT x GG	1,00
<i>MDM2</i> GG	0 (0/2)	TG x GG	0,11
<i>TP53</i> (P72R) GG			
<i>MDM2</i> TT	69,2 (9/13)	TT x TG	1,00
<i>MDM2</i> TG	70 (7/10)	TT x GG	0,03
<i>MDM2</i> GG	0 (0/4)	TG x GG	0,07

* Realizado teste exato de Fisher, considerando nível de significância $\alpha = 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Efeitos adversos nos tecidos normais após a radioterapia são comuns e podem afetar significativamente a qualidade de vida das pacientes. No tratamento do câncer do colo do útero localmente avançado pode ser esperado algum grau de toxicidade urinária e intestinal após um longo prazo. Neste estudo, a incidência de toxicidade urinária induzida por radiação e sua relação com parâmetros clínicos e genéticos foram os principais desfechos analisados. Um grupo de 50 pacientes com diagnóstico de câncer de colo do útero foi selecionado retrospectivamente para esse fim.

A toxicidade tardia na bexiga induzida por radiação foi analisada por meio de parâmetros clínicos e uma avaliação cistoscópica objetiva, que foi considerada o padrão ouro para o diagnóstico de cistite. No geral, uma incidência de 56% de cistite foi detectada, principalmente graus 1 e 2, com apenas uma paciente (2% dos casos) com toxicidade grave grau 4. Há relatos de até 23% de efeitos tardios da radiação em pacientes com neoplasias ginecológicas. Gondi et al. (2012) compararam as taxas de toxicidades tardias grau ≥ 3 após radioterapia isolada (195 pacientes) e quimioirradiação concomitantes (179 pacientes) em 374 pacientes com câncer de colo do útero. Com um seguimento de três anos, a taxa de toxicidade tardia urológica grave foi de 1,1% nas pacientes submetidas a radioterapia exclusiva e 3,7% no grupo com quimioirradiação, respectivamente ($p = 0,063$).

Os estudos sobre radiosensibilidade de tecidos normais, em geral, assumem o desenho de estudos caso-controle, em que os pacientes expostos vão desenvolver os efeitos colaterais actínicos (casos) ou não (controles). Desse modo, para que haja sucesso na análise estatística da amostra, é fundamental que haja uma correta classificação dos indivíduos nas duas categorias. Acima da média observada em outros tipos de pesquisas, o número de estudos similares que apresentam resultados conflitantes em radiosensibilidade é muito expressivo. Todavia isso seja esperado por se tratar de um efeito multifatorial, certamente os vieses que ocorrem nas pesquisas em relação à amostra dos pacientes envolvidos têm um papel significativo nesse fato.

O tempo de seguimento é um determinante muito importante, pois os efeitos colaterais crônicos da radioterapia podem surgir de modo muito tardio, tendo sido relatado em média até 4 a 5 anos para o surgimento da cistite actínica após a radioterapia por câncer de colo de útero (Georg et al., 2012; Chen et al., 2010; Li et al., 1995). Entretanto, não é incomum encontrar artigos avaliando efeitos urinários crônicos com seguimentos curtos (Das et al., 2011; Kasuya et al., 2011), havendo estudos relatando avaliações com seguimentos de apenas seis meses (Anacak et al., 2001). Esse viés de aferição foi evitado neste trabalho ao se obter um tempo médio de seguimento de nove anos, com mínimo de 6,5 anos e máximo de 11,5 anos, embora desse modo outro viés de seleção seja criado, pois são naturalmente selecionadas pacientes com melhor prognóstico. Pacientes que tenham apresentado efeitos colaterais muito intensos e que tenham

morrido em decorrência desses (equivalente ao grau V do RTOG – *Radiation Therapy Oncology Group*), não foram selecionadas para a pesquisa. Além disso, as pacientes que morreram em decorrência da doença não tiveram tempo suficiente para desenvolver complicações. Portanto, a baixa taxa de cistite grave observada em nosso estudo pode não representar a verdadeira incidência em toda a população tratada no mesmo período.

Na avaliação de sintomas, foi observada uma discrepância entre os sintomas relatados nos prontuários e os referidos pelas pacientes no questionário específico aplicado no momento do estudo (34% versus 82% respectivamente). Considerando-se que os resultados da cistoscopia foram significativamente relacionados com as respostas do questionário, pode-se inferir que houve um viés de aferição pela falta de padronização dos médicos ginecologistas na coleta de dados referentes aos efeitos colaterais tardios da radioterapia durante o seguimento dessas pacientes, que ocorria no Serviço de Ginecologia a partir do segundo mês após o tratamento, e não mais no Serviço de Radioterapia. As informações contidas nos prontuários das pacientes geralmente refletiam relatos espontâneos das mesmas, de modo que assim apenas os relatos de efeitos colaterais mais graves foram registrados, havendo uma perda importante de dados sobre os efeitos leves. Essa hipótese foi confirmada quando se comprovou que a gradação dos efeitos colaterais pelo sistema LENT-SOMA, a partir dos dados colhidos pelo prontuário, apresentou resultados que subestimaram aqueles resultantes dos dados relatados pelas pacientes a partir de um questionário direcionado aos sintomas da radioterapia baseado na escala do LENT-SOMA para a

bexiga, reforçando a necessidade do uso de escalas de avaliação sistemáticas e objetivas durante o seguimento. Ainda assim, o questionário também apresentou um viés de memória, pois o mesmo foi aplicado muitos anos depois do término da radioterapia e, por isso, todas as variáveis que foram analisadas frente aos efeitos colaterais foram avaliadas em relação aos três bancos de dados: oriundos de relatos do prontuário, das respostas ao questionário e de um banco que considerou o maior grau de efeito colateral registrado pelo prontuário ou questionário. Muitos artigos utilizam dados retrospectivos dos prontuários, e este viés pode estar ocorrendo prejudicando assim a correta classificação dos efeitos tardios dos pacientes nos artigos sobre radiosensibilidade tecidual, o que deixa uma margem para questionamentos dos resultados encontrados em estudos retrospectivos, principalmente naqueles com curtos períodos de seguimento das pacientes.

Neste estudo, a graduação conforme o LENT-SOMA dos efeitos colaterais na bexiga segundo dados colhidos pelas anotações do prontuário não demonstraram relação com os resultados da cistoscopia, subestimando a incidência de cistite LENT-SOMA grau 1 diagnosticada endoscopicamente que foi de 40% dos casos, enquanto nenhuma paciente com cistite grau 1 foi relatada pelo prontuário, sendo 68% de pacientes grau 0 por esse método. É interessante observar que a graduação segundo as queixas relatadas pelo questionário e o maior grau relatado entre estas e as do prontuário demonstraram que quanto maior a graduação clínica maior a graduação cistoscópica. Os relatos descritos na literatura, contudo, referem incidências

de queixas clínicas grau 2 e 3 de até 5% em 48 meses, muito inferior ao observado pelos achados cistoscópicos acima descritos de 14% desses graus, talvez pelo maior tempo de seguimento deste estudo ou pelo fato desses efeitos não estarem sendo avaliados com cistoscopias durante o seguimento das pacientes (Perez et al., 1984).

A idade não influenciou na ocorrência de efeitos colaterais crônicos na amostra deste estudo, resultado discordante de outros resultados na literatura como Huscher et al. (2009) que encontraram significância com a ocorrência de efeitos intestinais, mas que corrobora com Jereczek-Fossa et al. (1998) e Barillot et al. (2000) que avaliaram especificamente efeitos urinários e não encontraram relação com a idade, embora este último tenha descrito relação com o estadiamento do tumor, o qual não foi significativo neste estudo. Chen et al. (2009) não encontraram relação dos efeitos urinários nem com a idade, nem com o estadiamento clínico e presença de diabetes mellitus. Entretanto, há autores que têm achados bem distintos dos encontrados, relatando ter associação de efeitos colaterais não apenas com a idade, como também com diabetes e antecedentes de cirurgia pélvica antes da radioterapia (Perez et al., 1999); mas mesmos neste estudo não foi observado relação com tabagismo. Relação da presença da hipertensão com a diminuição do fluxo urinário por sua vez foi descrita por Barnett et al. (2011), mas não com outras complicações urinárias, corroborando com os dados anteriormente descritos.

Um grande estudo, incluindo mais de 3000 pacientes com câncer cervical apresentou forte relação entre as complicações da irradiação pélvica

com o tabagismo, raça e outras características das pacientes. Entre as conclusões, foi relatado maior toxicidade vesical em pessoas de origem europeia em relação às de origem africana (Eifel et al., 2000). No entanto, nenhuma avaliação genética específica foi realizada. Na casuística deste estudo, a associação de cirurgia não se correlacionou com os efeitos urinários tardios. A associação de quimioterapia, que pode ter um papel importante no aumento da toxicidade (Green et al., 2001), também não se mostrou prejudicial. No entanto, nesse caso, o baixo número de pacientes que receberam quimioirradiação provavelmente comprometeu essa análise.

Alguns autores avaliaram a influência da dose de radioterapia nas complicações tardias. Beskow et al. (2012) avaliaram 171 pacientes submetidas à radioterapia por câncer de colo uterino, com um seguimento médio de 66 meses (variando de 8 a 109 meses), e encontraram 15% de efeitos tardios em bexiga e/ou reto, sendo que 7% apenas na bexiga e 3% nos dois órgãos. Contudo, não encontraram relação entre o BED ($\alpha/\beta = 3$) e os efeitos colaterais em bexiga e reto, assim como Chen et al. (2009), levando ao questionamento sobre a validade do uso dos pontos de referência de reto e bexiga do ICRU 38 nessas avaliações. Semelhante ao relatado nestes artigos retrospectivos, os dados coletados dos prontuários das pacientes deste estudo não foram relacionados à BED. Porém os dados relatados pelas pacientes através de um questionário dirigido a efeitos urinários tardios foi mais fidedigno e apresentou relação não apenas com o valor de BED da radioterapia total como também com os achados da

cistoscopia, demonstrando como o critério na coleta desses dados pode influenciar os resultados dos estudos.

Quanto aos resultados genéticos encontrados, houve um predomínio dos polimorfismos *TP53* (P72R) ArgArg p53 (GG) (54%) e *ATM* 5557GG (84%) entre as pacientes do estudo (Tabela 9). Heterozigotos TG em relação ao SNP309 T→G do *MDM2* apresentaram maior incidência de cistite actínica diagnosticada por cistoscopia. Deve notar-se que nenhuma das seis pacientes GG (Tabelas 11 e 12) apresentou o polimorfismo *ATM* ex39 5557G>A, que está associado a uma maior sensibilidade à radiação em doentes com câncer da mama e próstata (Andreassen et al., 2006; Cesaretti et al., 2005), mas não em pacientes com câncer do colo do útero (Béranek et al., 2011; Paulíková et al., 2014). O genótipo *MDM2* GG associado com o genótipo *TP53* P72R GG parece que pode ser considerado como um genótipo de proteção (pacientes com menor incidência de cistite actínica) talvez por apresentarem assim uma menor capacidade de apoptose das células que sofreram danos ao DNA pois a proteína p53 será degradada mais rapidamente (Tabela 13).

Embora a diferença na incidência de cistite entre os grupos *MDM2* TT (25%) e *MDM2* TG (100%) pareça relevante, não foi estatisticamente significativa ($p = 0,14$), talvez também pelo pequeno número de casos neste subgrupo. Essa influência do polimorfismo do *MDM2* parece tornar-se menos evidente quando a paciente é heterozigota para o códon 72 do gene *TP53* e aparentemente se inverte quando a paciente é homozigota CC tendo assim, uma proteína p53 mais capaz de reparo do que de induzir apoptose.

Isto se traduzirá numa menor incidência de cistite, quando os níveis de p53 não estão reduzidos (*MDM2* TT). Essa hipótese é corroborada por dados experimentais de Dumont et al. (2003) que indicam que as duas variantes polimórficas de p53 (Pro72 e Arg72) são funcionalmente distintas, com a Arg72 apresentando uma capacidade muito melhor de induzir apoptose que a Pro72.

Da mesma forma, Zhang et al. (2011) descobriram que a resposta celular é mediada tanto pelo nível quanto pelas modificações pós-translacionais de p53, e que a p53 é ativada de maneira progressiva. Postulam que as combinações de comportamentos pulsátil e *switch-like* da p53 podem representar um modo de controle flexível e eficiente do comportamento celular evitando a apoptose precoce e promovendo a execução da apoptose.

Além disso, os nossos resultados estão em conformidade com os achados de que a quantidade de p53 ativada, e a duração de sua ativação, influenciam a resposta da célula ao dano, promovendo tanto a interrupção do ciclo celular e o reparo do DNA quanto a morte por apoptose ou senescência (Das et al., 2008).

Existe também uma relação importante da p53 com a *MDM2*, um regulador negativo direto de p53. A variante Arg72 (mais capaz de induzir apoptose) da proteína p53 demonstrou uma maior afinidade com *MDM2* em comparação com a variante Pro72 (Das et al., 2008). Um ligeiro aumento nos níveis de *MDM2* é capaz de promover uma inativação da p53 suficiente para desenvolver células tumorais, sem qualquer mutação da p53 (Vazquez

et al., 2008). O SNP309 é encontrado no promotor do gene *MDM2* e está demonstrado que aumenta a afinidade do ativador de transcrição Sp1, resultando em níveis mais elevados de *MDM2* RNA e proteínas com a atenuação subsequente da via da p53 (Bond et al, 2004).

Estes resultados, aliados aos do presente estudo, sugerem que uma associação do polimorfismo *TP53* (P72R) GG com o *MDM2* SNP309 TT também pode ser um fator de risco para a cistite actínica. O aumento da apoptose promovida por um maior nível da variante Arg72 da proteína p53 e sua relação com os efeitos tardios da radiação ainda está para ser provado, como o efeito negativo no reparo. Não encontramos publicações que levam à conclusão de que uma maior quantidade de p53 com uma maior tendência à apoptose possa ser responsável pelos efeitos colaterais na bexiga.

No entanto, outros autores concluem que haplótipos em vez de sítios polimórficos de um único nucleotídeo nos genes pode caracterizar melhor a radiosensibilidade individual (Dumont et al., 2003).

Assim, uma simples descrição de uma associação entre um único SNP genótipo, neste caso de *MDM2*, com a ocorrência de cistite seria uma visão simplista, e precisa ser melhor explicada no contexto da biologia molecular.

Em relação ao polimorfismo do gene *ATM* pesquisado, o 5557G>A, a ausência dos homozigotos AA nesta amostra não permitiu que fossem encontrados resultados significantes, que poderiam corroborar com os achados de Angèle et al. (2003) que demonstraram haver radiosensibilidade aumentada apenas nos homozigotos AA com um risco

de 6,76 (1,19 - 38,43) em relação ao GG, não tendo sido encontradas diferenças entre os heterozigotos GA e os homozigotos GG. Andreassen et al. (2006) avaliaram 120 pacientes e também não tiveram nenhuma paciente com o genótipo AA, e em relação aos heterozigotos GA e os homozigotos GG não encontraram diferença de radiosensibilidade para fibrose de pele.

Bentzen et al. em 2006 publicaram um artigo a respeito das expectativas quanto aos achados moleculares na prevenção ou redução dos efeitos radioterápicos tardios. Relatavam a necessidade de estudos com amostras de milhares de pacientes e citavam o europeu GENEPI com mais de cinco mil casos. Os autores então concluíam o artigo afirmando que em cinco a dez anos, ou seja, de 2011 a 2016, grandes avanços teriam sido feitos na melhora da qualidade de vida dos pacientes submetidos a radioterapia por se prevenir os efeitos tardios com uma melhor compreensão genética dos seus mecanismos. Avaliando os achados publicados até este ano de 2014 é pouco provável que a estimativa dos autores se confirme. Muito tem sido feito e avançado em técnicas moleculares, mas ainda pouco se padronizou para um adequado desenho de estudo com o rigor necessário para a correta classificação das pacientes entre os graus de efeitos tardios desenvolvidos e seu fenótipo de radiosensibilidade. E sem sabermos classificar o fenótipo, o genótipo radiosensível continuará sendo um mistério.

Trabalhos prospectivos com seguimento por radioterapeutas das pacientes por mais de cinco anos para corretas detecção e graduação dos efeitos colaterais actínicos precisam ser realizados para que se obtenham

resultados mais acurados sobre a relação dose-efeito e a radiosensibilidade determinada geneticamente. Quando isso não for possível, a realização da cistoscopia pode diminuir o risco de uma incorreta classificação das pacientes quanto ao grau de sua radiosensibilidade na bexiga.

Pela pequena prevalência de homozigotos AA no SNP *ATMex39 5557G>A*, a avaliação da radiosensibilidade em relação a este polimorfismo requer uma amostra expressiva, visto que os heterozigotos parecem não ter diferenças estatísticas com as pacientes homozigotas para o alelo selvagem. Outros estudos que também precisam ser realizados são pesquisas básicas que avaliem as alterações funcionais causadas na proteína ATM pelo polimorfismo *ATMex39 5557G>A*, os quais podem ser esclarecedores e devem enfatizar a influência desse SNP na regulação da proteína p53.

Por outro lado, foi observada uma tendência à menor incidência de cistite em pacientes homozigotas CC para o códon 72 associadas a uma menor degradação da p53 pela *MDM2* (genótipo TT no SNP309 do gene), tendo assim uma proteína p53 mais apta a reparo que apoptose.

Portanto, esses resultados sugerem que pacientes cujas células apresentem um genótipo que favorece a apoptose em detrimento do reparo diante do dano ao DNA causado pela radiação estariam mais propensas a ter efeitos colaterais urinários crônicos.

Estudos com maior casuística e incluindo pacientes homozigotas GG para o SNP309 do gene *MDM2* poderão confirmar esses achados.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo nos permitem concluir que:

1. Os efeitos tardios radioinduzidos em bexiga, confirmados por cistoscopia, foram observados em 56% da população estudada, sendo 54% grau 2 ou menor. Entre os polimorfismos genéticos estudados, apenas o polimorfismo de nucleotídeo único *MDM2* (SNP309) - variante TG, apresentou relação com a ocorrência de cistite crônica induzida por radiação.
2. Idade, comorbidades e hábitos de vida não demonstraram relação com a ocorrência de efeitos colaterais urinários tardios.
3. O único fator de tratamento relacionado com o maior risco de cistite, avaliado pelo questionário específico, foi a dose total de radioterapia correspondente a uma BEDGy₃ acima de 100 Gy.
4. Houve relação positiva entre os sintomas relatados no questionário específico com os achados da cistoscopia.

7. ANEXOS

Anexo 7.1 - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o nº 0587/08.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PROTOCOLO

Local: P2 - Radioterapia

Recebido por: [assinatura]

Data: 03/01/09

Aluna está com o que foi aprovado

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 17/12/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0587/08**, intitulado: **"DOSE DE TOLERÂNCIA DA BEXIGA NO TRATAMENTO DE TUMORES DO COLO DE ÚTERO COM RADIOTERAPIA: EFEITOS TARDIOS, DOSE NA PAREDE VESICAL POSTERIOR E POLIMORFISMOS DE P53, ATM E MDM2."** apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA E RADIOTERAPIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Heloisa de Andrade Carvalho**
 Pesquisador (a) Executante: **Juliana Castro Dourado Pinezi**

CAPPesq, 18 de Dezembro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo 7.2 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás sob o nº 012/2008.

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE
AO CÂNCER EM GOIÁS

PROTOCOLO CEPACCG Nº 012/08

Goiânia, 24/04/2008

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Dra. Juliana Castro Dourado Pinezi

ORIENTADORA: Dra. Heloísa de Andrade Carvalho

CO-ORIENTADORADO: Dra. Renata de Bastos Ascenção Soares

TÍTULO: Dose de Tolerância da Bexiga no tratamento de Tumores do Colo de Útero com radioterapia: Efeitos Tardios, Dose na Parede vesical Posterior e Polimorfismo de p53, ATM e MDM2.

Área Temática: Grupo III

Área de Conhecimento: Medicina

Local de Realização: Hospital Araújo Jorge/ACCG – Radioterapia

Senhor(a) Pesquisador(a),

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás, após o análise dos documentos apresentados em resposta às pendências solicitadas, aprovou o projeto de Pesquisa acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão (ões) e publicação (ões).

Dr. Elismauro Francisco Mendonça

Vice – Coordenador do CEP/ACCG

Anexo 7.3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Você está sendo convidada a participar, como voluntária, em uma pesquisa. Esse consentimento é exclusivo para esta pesquisa, sem possibilidade de extensão do mesmo para outros projetos. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final este documento, que está em duas vias (uma da pesquisadora e a outra sua). Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida sobre seus direitos você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás, pelo telefone 3243-7000 ou o Vice-Coordenador do Comitê de Ética da ACCG Dr. Alexandre João Meneghini pelo mesmo telefone, ramal 7050.

O título da pesquisa é “DOSE DE TOLERÂNCIA DA BEXIGA NO TRATAMENTO DE TUMORES DO COLO DE ÚTERO COM RADIOTERAPIA: EFEITOS TARDIOS, DOSE NA PAREDE VESICAL POSTERIOR E POLIMORFISMOS DE *TP53*, *ATM* e *MDM2*”.

A pesquisadora responsável é a Dra. Juliana Castro Dourado Pinezi, que, em caso de dúvidas pode ser contatada pelos telefones (062) 2437022/243-7140. Os outros pesquisadores são a Dra. Heloisa de Andrade Carvalho e a Dra. Renata Bastos Ascenço Soares, que é encontrada no telefone (062) 3243-7151. Quem está lhe explicando este termo é a enfermeira Graziella Dias Pinheiro Machado.

Sobre a pesquisa:

- Esse estudo se propõe a avaliar a variação dos efeitos colaterais crônicos na bexiga decorrentes da braquiterapia intracavitária de acordo com a dose recebida na época do tratamento. Seus resultados poderão ajudar a desenvolver um método para diminuir os efeitos colaterais do tratamento da sua doença;
- Será realizada uma cistoscopia (exame feito com a colocação de um tubo fino pelo canal da bexiga para visualizá-la por dentro) sem custo para você paciente, para melhor avaliação e tratamento dos efeitos colaterais da bexiga;
- Além disso, será solicitada a doação de 10 ml de sangue (metade de uma seringa) para avaliar se você tem predisposição genética para ter efeitos colaterais da radioterapia;
- Seus dados pessoais (como nome) permanecerão confidenciais, sem exposição pública;
- Não haverá qualquer compensação financeira por sua participação ou danos pela pesquisa;
- Se houver necessidade você terá toda a assistência necessária;
- Você poderá retirar seu consentimento a qualquer hora sem prejuízo para seu acompanhamento;
- A forma do seu acompanhamento não será modificado, respeitando a indicação do Serviço de Ginecologia que é seu serviço de origem.

Dra. Juliana Castro Dourado Pinezi

Eu, _____,
RG _____, CPF _____, prontuário _____, concordo em participar da pesquisa acima descrita, como sujeito. Fui devidamente informada e esclarecida pelos pesquisadores sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento, assistência ou tratamento.

Goiânia, ____ de _____ de 200__ .

Assinatura da paciente

Presenciamos a solicitação de consentimento após os esclarecimentos e o aceite da paciente.

Testemunha: _____ Assinatura: _____

Testemunha: _____ Assinatura: _____

Anexo 7.4 – Escala LENT-SOMA (*Late Effects of Normal Tissues – Subjective, Objective, Management and Analytic system*) (LENT SOMA tables, 1995).

Table 3. LENT/SOMA scales for bladder

	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
<i>Subjective</i>				
Dysuria	Occasional and minimal	Intermittent and tolerable	Persistent and intense	Refractory and excruciating
Frequency	3–4 hour intervals	2–3 h intervals	1–2 h intervals	Hourly
Hematuria	Occasional	Intermittent	Persistent with clot	Refractory
Incontinence	< weekly episodes	< daily episodes	≤ 2 pads/undergarments/day	Refractory
Decreased stream	Occasionally weak	Intermittent	Persistent but incomplete obstruction	Complete obstruction
<i>Objective</i>				
Hematuria	Microscopic, normal hemoglobin	Intermittent macroscopic, < 10% decrease in hemoglobin	Persistent macroscopic, 10–20% decrease in hemoglobin	Refractory, > 20% decrease in hemoglobin
Endoscopy	Patchy atrophy or telangiectasia without bleeding	Confluent atrophy or telangiectasia with gross bleeding	Ulcerations into muscle	Perforation, fistula
Maximum volume	> 300 cc–400 cc	> 200 cc–300 cc	> 100 cc–200 cc	≤ 100 cc
Residual volume	25 cc	> 25 cc–100 cc	> 100 cc	
<i>Management</i>				
Dysuria	Occasional non-narcotic	Regular non-narcotic	Regular narcotic	Surgical intervention
Frequency	Alkalization	Occasional antispasmodic	Regular narcotic	Cystectomy
Hematuria/Telangiectasia	Iron therapy	Occasional transfusion or single cauterization	Frequent transfusion or coagulation	Surgical intervention
Incontinence	Occasional use of incontinence pads	Intermittent use of incontinence pads	Regular use of pad or self-catheterization	Permanent catheter
Decreased stream		< Once-a-day self-catheterization	Dilatation, > once-a-day self-catheterization	Permanent catheter, surgical catheterization
<i>Analytic</i>				
Cystography	Assessment of mucosal surface			
Volumetric analysis	Assessment of bladder capacity in milliliters			
Contrast radiography	Assessment for ulcers, capacity, and contractility			
Ultrasound	Assessment of wall thickness, sinus, and fistula formation			
Electromyography	Assessment of sphincter activity using intraluminal pressure transducer, contraction pressure, and volume curves			

Anexo 7.5 – Questionário aplicado durante consulta com as pacientes.

FICHA DE COLETA DE DADOS COM A PACIENTE

Prontuário: _____ **Iniciais do nome:** _____ **Id:** _____

1. Diabetes? () NÃO () SIM
2. HAS? () NÃO () SIM
3. Alguma outra doença crônica ? Qual? _____
4. Etilismo (bebe com frequência)? () NÃO () SIM
5. Tabagismo? () NÃO () SIM Quantos anos? _____ Cigarros/dia: _____
6. Infecções urinárias frequentes antes da RT? () NÃO () SIM
7. Infecções urinárias frequentes depois da RT? () NÃO () SIM
8. Hematúria macroscópica (sangue na urina) teve algum episódio? _____
Quantos meses pós-RT? _____ No momento apresenta? _____
9. Disúria (ardor ao urinar) persistente em algum período? _____ Quantos meses após a RT? _____ No momento apresenta? () NÃO () SIM
10. Polaciúria persistente em algum período? () NÃO () SIM; Quantos meses após a RT? _____ No momento apresenta? () NÃO () SIM; Chegou a ser mais que uma vez por hora? () NÃO () SIM;
11. Urgência persistente em algum período? () NÃO () SIM; Quantos meses após a RT? _____ No momento apresenta? () NÃO () SIM
12. Poliúria (aumento do volume de urina, geral > 2,5 litros por dia) persistente em algum período? () NÃO () SIM; Quantos meses após a RT? _____ ; No momento apresenta? () NÃO () SIM
13. Nictúria (acorda 2 ou mais vezes para urinar) persistente em algum período? _____ Quantos meses após a RT? _____ ; No momento apresenta? () NÃO () SIM; Chegou a ser mais que uma vez por hora?
14. Incontinência urinária (perda involuntária de urina) persistente em algum período? _____ Quantos meses após a RT? _____ No momento apresenta? _____
15. Dor em baixo ventre tipo cólica que precisou de remédio persistente em algum período? _____ Quantos meses após a RT? _____ ; No momento apresenta? _____ Qual remédio usou? _____
16. Retenção urinária não relacionada a coágulos na urina que precisou de passagem de sonda vesical de demora alguma vez? _____ Quantos meses após a RT? _____ No momento apresenta? () NÃO () SIM;
17. Alguma alteração intestinal persistente em algum período? _____ Quantos meses após a RT? _____ No momento apresenta? _____ Qual remédio usou? _____
18. Dor ou sangramento retal persistente em algum período? _____ Quantos meses após a RT? _____ No momento apresenta? _____ Qual remédio usou? _____
19. Ocorreu estenose (estreitamento) da vagina após a RT? _____ Há dificuldade ou impossibilidade de ter relação sexual por isso? () NÃO () SIM

8. REFERÊNCIAS

Akhtar RS, Geng Y, Klocke BJ, Latham CB, Villunger A, Michalak EM, Strasser A, Carroll SL, Roth KA. BH3-only proapoptotic Bcl-2 family members Noxa and Puma mediate neural precursor cell death. *The Journal of Neuroscience*. 2006; 26 (27): 7257–7264.

Almeida KH, Sobol RW. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst)*. 2007; 6: 695-711.

Anacak Y, Yalman D, Ozsaran Z, Haydaroğlu A. Late radiation effects to the rectum and bladder in gynecologic cancer patients: the comparison of LENT/SOMA and RTOG/EORTC late-effects scoring systems. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001; 50(5):1107-12.

Andegeko Y, Moyal L, Mittelman L, Tsarfaty I, Shiloh Y, Rotman G. Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. *J. Biol. Chem*. 2001; 276 (41): 38224–30.

Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Overgaard J. Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes. *Radiother Oncol*. 2003; 69(2):127-35.

Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Sørensen FB, Overgaard J. Risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis in relation to single nucleotide polymorphisms in TGFB1, SOD2, XRCC1, XRCC3, APEX and ATM--a study based on DNA from formalin fixed paraffin embedded tissue samples. *Int J Radiat Biol.* 2006; 82(8):577-86.

Andreassen CN, Overgaard J, Alsner J, et al. ATM sequence variants and risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis after postmastectomy radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 64(3):776-783.

Angèle S, Romestaing P, Moullan N, Vuillaume M, Chapot B, Friesen M, Jongmans W, Cox DG, Pisani P, Gérard JP, Hall J. ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: association with breast cancer risk and clinical radiosensitivity. *Cancer Res.* 2003; 63(24):8717-25.

Arango HG. *Bioestatística Teórica e Computacional*. 2ª Edição. Guanabara Koogan; Rio de Janeiro (Brasil); 2005: p. 362.

Argentini M, Barboule N, Wasylyk B. The contribution of the acidic domain of MDM2 to p53 and MDM2 stability. *Oncogene*. 2001; 20(11):1267-75.

Atlan D, Touboul E, Deniaud-Alexandre E et al. Operable Stages IB and II cervical carcinomas: a retrospective study comparing preoperative

uterovaginal brachytherapy and postoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 54: 780-793.

Baalbergen A, Veenstra Y, Stalpers L. Primary surgery versus primary radiotherapy with or without chemotherapy for early adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013; 1:CD006248.

Bai L, Zhu WG. p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *J. Cancer Mol*. 2006; 2(4): 141-153.

Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003; 421 (6922): 499–506.

Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*. 1998; 281 (5383): 1674–1677.

Barendsen GW. Dose fractionation, dose rate and isoeffect relationships for normal tissue responses. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982; 8:1981–97.

Barillot I, Horiot J, Maingon P, et al. Impact on treatment outcome and late effects of customized treatment planning in cervix carcinomas: Baseline

results to compare new strategies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 48:189–200.

Barillot I, Horiot JC, Maingon P, et al. Maximum and mean bladder dose defined from ultrasonography: Comparison with the ICRU reference in gynaecological brachytherapy. *Radiother Oncol* 1994; 30:231–238.

Barnett GC, De Meerleer G, Gulliford SL, Sydes MR, Elliott RM, Dearnaley DP. The impact of clinical factors on the development of late radiation toxicity: results from the Medical Research Council RT01 trial (ISRCTN47772397). *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2011; 23(9):613-24.

Begg AC: Predicting response to radiotherapy: Evolutions and revolutions. *Int J Radiat Biol*. 2009; 85: 825-836.

Belyaev IY. Radiation-induced DNA repair foci: spatio-temporal aspects of formation, application for assessment of radiosensitivity and biological dosimetry. *Mutat Res*. 2010; 704:132–41.

Bentzen SM: Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: Radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6: 702-713.

Beránek M, Drastíková M, Paulíková S, et al. Analysis of D1853N ATM polymorphism in radiosensitive patients with cervical carcinoma. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2011; 54(3):111-116.

Berra CM, Menck CFM, Di Mascio P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Quím. Nova* [online]. 2006; 29 (6): 1340-4.

Beskow C, Agren-Cronqvist AK, Lewensohn R, Toma-Dasu I. Biological effective dose evaluation and assessment of rectal and bladder complications for cervical cancer treated with radiotherapy and surgery. *J Contemp Brachytherapy*. 2012; 4(4):205-12.

Blakely T, Barendregt JJ, Foster RH, Hill S, Atkinson J, Sarfati D, Edwards R. The association of active smoking with multiple cancers: national census-cancer registry cohorts with quantitative bias analysis. *Cancer Causes Control*. 2013: 12.

Bond GL, Hu W, Bond EE, et al. A single nucleotide polymorphism in the *MDM2* promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*. 2004; 119(5): 591-602.

Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002; 55:244–65.

Bouchet BP, Caron de Fromentel C, Puisieux A, Galmarini CM. p53 as a target for anti-cancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006; 58(3):190-207.

Bristow RG, Ozcelik H, Jalali F, et al: Homologous recombination and prostate cancer: A model for novel DNA repair targets and therapies. *Radiother Oncol* 2007; 83: 220-230.

Campos, CAMS. Avaliação da sobrevida das pacientes portadoras de câncer do colo uterino IIIb tratadas com radioterapia exclusiva e radioquimioterapia. Hospital AC Camargo. *Tese de Doutorado*. São Paulo, 2011: 70p.

Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science.* 1998; 281 (5383): 1677–9.

Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008; 110(3 Suppl 2): S4-7.

Cesaretti JA, Stock RG, Lehrer S, et al. ATM sequence variants are predictive of adverse radiotherapy response among patients treated for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005; 61(1):196-202.

Chen SW, Liang JA, Hung YC, Yeh LS, Chang WC, Yang SN, Lin FJ. Geometrical sparing factors for the rectum and bladder in the prediction of grade 2 and higher complications after high-dose-rate brachytherapy for cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009; 75(5):1335-43.

Chen SW, Liang JA, Shiau AC, Yu CY, Hung YC, Yeh LS, Chang WC, Lin WC, Yang SN, Lin FJ. Lack of dose-rate effect of ¹⁹²Ir source activity on pelvic control and late complications after high-dose-rate brachytherapy for cervical cancer. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2010; 51(2):173-9.

Chin KV, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science*. 1992; 255(5043): 459-62.

Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*. 1994; 265(5170):346-55.

Choi M, Shi J, Jung SH, Chen X, Cho KH. Attractor landscape analysis reveals feedback loops in the p53 network that control the Cellular response to DNA damage. *Sci Signal*. 2012; 5 (251): ra83.

Christopherson WM, Parker JE. Relation of cervical cancer to early marriage and childbearing. *New England J. Med*. 1965; 273: 235-239.

Clegg HV, Itahana K, Zhang Y. Unlocking the *MDM2*-p53 loop: ubiquitin is the key. *Cell Cycle*. 2008; 7(3):287-92.

Coutts AS, Adams CJ, La Thangue NB. p53 ubiquitination by *MDM2*: a never ending tail? *DNA Repair (Amst)*. 2009; 8(4):483-90.

Cox JD, Stetz J, Pajak TK. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31(5):1341-6.

Das D, Chaudhuri S, Deb AR, Aich RK, Gangopadhyay S, Ray A. Treatment of cervical carcinoma with high-dose rate intracavitary brachytherapy: two years follow-up study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011; 12(3):807-10.

Das S, Boswell SA, Aaronson SA, Lee SW. P53 promoter selection: choosing between life and death. *Cell Cycle*. 2008; 7:154–7.

de Boer J, Hoeijmakers JHJ. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*. 2000; 21 (3): 453-460.

de Laat WL, Jaspers NGJ, Hoeijmakers JHJ. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev*. 1999; 13: 768-785.

De Leeuw AA, Van de Kamer JB, Moerland MA, Philippens ME, Jürgenliemk-Schulz IM. The effect of alternative biological modelling parameters (α/β and half time of repair $T_{1/2}$) on reported EQD2 values in the treatment of advanced cervical cancer. *Radiother Oncol*. 2011; 101(2):337-42.

Denham JW, Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'. *Radiother Oncol*. 2002; 63: 129–145.

Dorr W, Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol*. 2001; 61: 223–231.

Dörr W. Pathogenesis of normal tissue side effects. In: Joiner M, van der Kogel A. *Basic clinical radiobiology*. 4th ed. London (England): Arnold; 2009: 180.

Douglas BG, Fowler JF. Fractionation schedules and a quadratic dose-effect relationship. *Br J Radiol*. 1975; 48: 502-504.

Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet.* 2003; 33(3):357-65.

Eifel PJ, Levenback C, Wharton JT, et al. Time course and incidence of late complications in patients treated with radiation therapy for FIGO stage IB carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995; 32:1289–1300.

Eifel PJ, Jhingran A, Bodurka DC, et al. Correlation of smoking history and other patient characteristics with major complications of pelvic radiation therapy for cervical cancer. *J Clin Oncol.* 2000; 20:3651-3657.

Emami B, Lyman J, Brown A, Coia L, Goitein M, Munzenrider JE, Shank B, Solin LJ, Wesson M. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1991; 21(1):109-22.

Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced Cell death mechanisms. *Tumour Biol.* 2010; 31(4):363-72.

Fellner C, Potter R, Knocke TH, et al. Comparison of radiography-and computed tomography-based treatment planning in cervix cancer in

brachytherapy with specific attention to some quality assurance aspects.

Radiother Oncol 2001; 58:53–62.

Fenkell L, Assenholt M, Nielsen SK, Haie-Meder C, Pötter R, Lindegaard J, Tanderup K. Parametrial boost using midline shielding results in an unpredictable dose to tumor and organs at risk in combined external beam radiotherapy and brachytherapy for locally advanced cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011; 79(5):1572-9.

Foray N, Colin C. Relationship between radiosensitivity, initial DNA damage, apoptosis and gene expression: Between reproducible works and technical artefacts. *Breast.* 2013; 22(2):185.

Foray N, Priestley A, Alsbeih G, Badie C, Capulas EP, Arlett CF, Malaise EP. Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol.* 1997; 72:271–83.

Fowler JF. The Linear-Quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy: A review. *Brit J Radiol.* 1989; 62:679-94.

Gallet P, Phulpin B, Merlin JL, Leroux A, Bravetti P, McCellem H, Tran N, Dolivet G. Long-term alterations of cytokines and growth factors expression

in irradiated tissues and relation with histological severity scoring. *PLoS One*. 2011; 6(12):e29399.

Gardner BG, Zietman AL, Shipley WU, et al. Late normal tissue sequelae in the second decade after high dose radiation therapy with combined photons and conformal protons for locally advanced prostate cancer. *J Urol*. 2002; 167:123–126.

Georg P, Pötter R, Georg D, Lang S, Dimopoulos JC, Sturdza AE, Berger D, Kirisits C, Dörr W. Dose effect relationship for late side effects of the rectum and urinary bladder in magnetic resonance image-guided adaptive cervix cancer brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012; 82(2):653-7.

Gewirtz DA, Holt SE, Elmore LW. Accelerated senescence: an emerging role in tumor Cell response to chemotherapy and radiation. *Biochem Pharmacol*. 2008; 76:947–57.

Gondi V, Bentzen SM, Sklenar KL, et al. Severe late toxicities following concomitant chemoradiotherapy compared to radiotherapy alone in cervical cancer: an inter-era analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012; 84(4): 973-982.

Goodhead DT. Initial events in the Cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol.* 1994; 65:7–17.

Green JA, Kirwan JM, Tierney JF, et al. Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2001; 358(9284):781-786.

Gu B, Zhu WG. Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *Int J Biol Sci.* 2012; 8(5): 672-84.

Haie-Meder C, Potter R, Van Limbergen E, Briot E, De Brabandere M, Dimopoulos J, et al. Recommendations from Gynaecological (GYN) GEC-ESTRO Working Group (I): concepts and terms in 3D image based 3D treatment planning in cervix cancer brachytherapy with emphasis on MRI assessment of GTV and CTV. *Radiother Oncol.* 2005; 74:235–45.

Haie-Meder C, Potter R. *Textbook for teaching course on brachytherapy in gynaecological malignancies.* Brussels: ESTRO; 2004.

Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the Radiologist.* 7th edition. Lippincott Williams and Wilkins Publishing; Philadelphia (EUA); 2012.

Halperin EC, Perez CA, Brady LW, Wazer DE, Freeman C, Prosnitz LR. *Perez and Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology.* 5th edition.

Lippincott Williams and Wilkins Publishing; Philadelphia (EUA); 2008: 320-323.

Hedman M, Björk-Eriksson T, Brodin O, Toma-Dasu I. Predictive value of modelled tumour control probability based on individual measurements of in vitro radiosensitivity and potential doubling time. *Br J Radiol*. 2013; 86(1025): 20130015.

Hellebust TP, Dale E, Skjonsberg A, et al. Interfraction variations in rectum and bladder volumes and dose distributions during high dose rate brachytherapy treatment of the uterine cervix investigated by repetitive CT-examinations. *Radiother Oncol* 2001; 60:273–280.

Henríquez-Hernández LA, Bordón E, Pinar B, Lloret M, Rodríguez-Gallego C, Lara PC. Prediction of normal tissue toxicity as part of the individualized treatment with radiotherapy in oncology patients. *Surg Oncol*. 2012; 21(3):201-6.

Henríquez-Hernández LA, Lara PC. Reply to the Letter to the Editor from Foray and Colin, entitled 'Relationship between radiosensitivity, initial DNA damage, apoptosis and gene expression: Between reproducible works and technical artefacts': Genetics are essential in the response of normal tissues to radiation. *Breast*. 2013; 22(3):367.

Herrera FG, Prior JO. The role of PET/CT in cervical cancer. *Front Oncol.* 2013; 3: 34.

Hill RP, Rodemann HP, Hendry JH, Roberts SA, Anscher MS. Normal tissue radiobiology: from the laboratory to the clinic. *Int J Radiat Oncol Biol Phys:* 2001; 49: 353–365.

Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem.* 2002; 277(5):3247-57.

Hogle WP. The state of the art in radiation therapy. *Semin Oncol Nurs.* 2006; 22: 212–220.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science.* 1991; 253:49–53.

Huscher A, Bignardi M, Magri E, Vitali E, Pasinetti N, Costa L, Frata P, Magrini SM. Determinants of small bowel toxicity in postoperative pelvic irradiation for gynaecological malignancies. *AntiCancer Res.* 2009; 29(11):4821-6.

Ianzini F, Bertoldo A, Kosmacek EA, Phillips SL, Mackey MA. Lack of p53 function promotes radiation-induced mitotic catastrophe in mouse embryonic fibroblast Cells. *Cancer Cell Int*. 2006; 6:11.

Iliakis G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays*. 1991; 13:641–8.

International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2008 cancer fact sheet. *Cervical Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008*. Lyon (France): IARC; 2010. Available from < <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/cervix.asp>>. [2013 Jan 14]

International Commission on Radiation Units and Measurements. *Dose and volume specification for reporting intracavitary therapy in gynecology*. ICRU Report 38. Bethesda: ICRU; 1985: 1-16.

Jacinto AA, Castilho MS, Novaes PE et al. Preoperative external beam radiotherapy and reduced dose brachytherapy for carcinoma of the cervix: survival and pathological response. *Radiat Oncol*. 2007; 2: 9.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61(2):69-90.

Jereczek-Fossa B, Jassem J, Nowak R, Badzio A. Late complications after postoperative radiotherapy in endometrial cancer: analysis of 317 consecutive cases with application of linear-quadratic model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1998; 41(2):329-38.

Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7: 335-46.

Johnson RA, Shepard EM, Scotto KW. Differential regulation of MDR1 transcription by the p53 family members. Role of the DNA binding domain. *J Biol Chem*. 2005; 280 (14):13213-9.

Jonathan EC, Bernhard EJ, McKenna WG. How does radiation kill Cells? *Curr Opin Chem Biol*. 1999; 3:77–83.

Joubert A, Zimmerman KM, Bencokova Z, Gastaldo J, Chavaudra N, Favaudon V, Arlett CF, Foray N. DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *Int J Radiat Biol* 2008; 84:1–19.

Kasuya G, Ogawa K, Iraha S, Nagai Y, Shiraishi M, Hirakawa M, Samura H, Toita T, Kakinohana Y, Kudaka W, Inamine M, Ariga T, Nishimaki T, Aoki Y, Murayama S. Severe late complications in patients with uterine cancer

treated with postoperative radiotherapy. *AntiCancer Res.* 2011; 31(10):3527-33.

Kawabata M, Kawabata T, Nishibori M. Role of recA/RAD51 family proteins in mammals. *Acta Med Okayama.* 2005; 59:1-9.

Keighley E. Carcinoma of the cervix among prostitutes in a women's prison. *Br J Vener Dis.* 1968; 44(3):254-5.

Kim HJ, Kim S, Ha SW, Wu HG. Are doses to ICRU reference points valuable for predicting late rectal and bladder morbidity after definitive radiotherapy in uterine cervix cancer? *Tumori.* 2008; 94(3):327-32.

Kraemer KH, Patronas NJ, Schiffmann R, Brooks PB, Tamura D, DiGiovanna JJ. Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *NeuroScience.* 2007; 145: 1388-96.

Krwawicz J, Arczewska KD, Speina E, Maciejewska A, Grzesiuk E. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. *Acta Biochim Pol.* 2007; 54: 413-34.

Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich NP. Structure of the *MDM2* oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*. 1996; 274(5289):948-53.

Landoni F, Maneo A, Colombo A et al. Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. *Lancet* 1997; 350: 535-540.

Lee JH, Goodarzi AA, Jeggo, PA, Paull TT. 53BP1 promotes ATM activity through direct interactions with the MRN complex. *EMBO J*. 2010; 29: 574–85.

Lempiäinen H, Halazonetis TD. Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *EMBO J*. 2009 21; 28(20):3067-73

LENT SOMA tables. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31 (5): 1049–1091.

Levine AJ. p53, the Cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997; 88(3): 323-31.

Li A, Sun J, Chao H. Late bladder complications following radiotherapy of carcinoma of the uterine cervix. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 1995; 30(12):741-3.

Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*. 2008; 18: 85-98.

Ling CC, Schell MC, Working KR, et al. CT-assisted assessment of bladder and rectum dose in gynecological implants. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1987; 13:1577–1582.

Ljungman M. Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by Cellular stress. *Neoplasia*. 2000; 2(3):208-25.

Logsdon MD, Eifel PJ. FIGO IIIB squamous Cell carcinoma of the cervix: An analysis of prognostic factors emphasizing the balance between external beam and intracavitary radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999; 43:763–775.

Löhr K, Möritz C, Contente A, Dobbstein M. p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. *J Biol Chem*. 2003; 278 (35): 32507-16.

Louie KS, de Sanjose S, Diaz M, Castellsagué X, Herrero R, Meijer CJ, Shah K, Franceschi S, Muñoz N, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. *Br J Cancer*. 2009; 100(7):1191-7.

Marine JC, Lozano G. MDM2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. *Cell Death Differ.* 2010; 17(1):93-102.

Marks LB, Carroll PR, Dugan TC, Anscher MS. The response of the urinary bladder, urethra, and ureter to radiation and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995; 31(5):1257-80.

Marks LB, Yorke ED, Jackson A, Ten Haken RK, Constone LS, Eisbruch A, Bentzen SM, Nam J, Deasy JO. Use of normal tissue complication probability models in the clinic. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010; 76 (3 Suppl):S10-9.

Marti TM, Kunz C, Fleck O. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell Physiol.* 2002; 191:28-41.

Martin LM, Marples B, Coffey M, Lawler M, Lynch TH, Hollywood D, Marignol L. DNA mismatch repair and the DNA damage response to ionizing radiation: making sense of apparently conflicting data. *Cancer Treat Rev.* 2010; 36(7):518-27.

Martin LM, Marples B, Davies AM, Atzberger A, Edwards C, Lynch TH, Hollywood D, Marignol L. DNA mismatch repair protein MSH2 dictates Cellular survival in response to low dose radiation in endometrial carcinoma Cells. *Cancer Lett.* 2013; 335(1):19-25.

Martin M, Delanian S, Sivan V, Vozenin-Brotons MC, Reisdorf P, et al. Radiation-induced superficial fibrosis and TGF- α 1. *Cancer Radiother.* 2000; 4: 369–384.

Meek DW. The p53 response to DNA damage. *DNA Repair (Amst).* 2004; 3(8-9):1049-56.

Michael D, Oren M. The p53-*MDM2* module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol.* 2003; 13(1):49-58.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Brasil. *Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil.* Rio de Janeiro: INCA; 118p; 2011.

Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Murray D. New insights into p53 signaling and cancer Cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012: 170325.

Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 *Oncogene* product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 1992; 69(7):1237-45.

Nag S, Erickson B, Thomadsen B, Orton C, Demanes JD, Petereit D. The American Brachytherapy Society recommendations for high-dose-rate brachytherapy for carcinoma of the cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 48:201-11.

Ouyang KJ, Woo LL, Ellis NA. Homologous recombination and maintenance of genome integrity: Cancer and aging through the prism of human RecQ helicases. *Mech Ageing Dev.* 2008; 129:425-40.

Paton AM, Chalmers KE, Coomber H, Cameron AL. Dose escalation in brachytherapy for cervical cancer: impact on (or increased need for) MRI-guided plan optimisation. *Br J Radiol.* 2012; 85(1020):e1249-55.

Paulíková S, Petera J, Sirak I, et al. ATM and TGFB1 genes polymorphisms in prediction of late complications of chemoradiotherapy in patients with locally advanced cervical cancer. *Neoplasma* 2014; 61(1):70-76.

Pelloski CE, Palmer M, Chronowski GM, et al. Comparison between CT-based volumetric calculations and ICRU reference-point estimates of radiation doses delivered to bladder and rectum during intracavitary radiotherapy for cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62:131–137.

Perez CA, Breaux S, Bedwinek JM, Madoc-Jones H, Camel HM, Purdy JA, Walz BJ. Radiation therapy alone in the treatment of carcinoma of the uterine cervix. II. Analysis of complications. *Cancer*. 1984; 54(2):235-46.

Perez CA, Grigsby PW, Camel HM et al. Irradiation alone or combined with surgery in stage IB, IIA, and IIB carcinoma of uterine cervix: update of a nonrandomized comparison. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31: 703-716.

Perez CA, Grigsby PW, Lockett MA. Radiation morbidity in carcinoma of the uterine cervix: Dosimetric and clinical correlation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 44:855–866.

Pietrzak M, Puzianowska-Kuznicka M. p53-dependent repression of the human MCL-1 gene encoding an anti-apoptotic member of the BCL-2 family: the role of Sp1 and of basic transcription factor binding sites in the MCL-1 promoter. *Biol Chem*. 2008; 389(4):383-93.

Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJ, Snijders P, Bosch FX, de Sanjosé S, Muñoz N; IARC Multi-centre Cervical Cancer Study Group. Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes Control*. 2003; 14(9): 805-14.

Potter R, Haie-Meder C, Limbergen E, Barillot I, De Brabandere M, Dimopoulos J, et al. Recommendations from gynaecological (GYN) GEC

ESTRO working group (II): concepts and terms in 3D image-based treatment planning in cervix cancer brachytherapy—3D dose volume parameters and aspects of 3D image-based anatomy, radiation physics, radiobiology. *Radiother Oncol* 2006; 78:67–77.

Rashi-Elkeles S, Elkon R, Shavit S, Lerenthal Y, Linhart C, Kupershtein A, Amariglio N, Rechavi G, Shamir R, Shiloh Y. Transcriptional modulation induced by ionizing radiation: p53 remains a central player. *Mol. Oncol.* 2011; 5 (4): 336–348.

Reinhardt HC, Schumacher B. The p53 network: Cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet.* 2012; 28 (3): 128–136.

Schmitz A, Bayer J, Dechamps N, Thomas G. Intrinsic susceptibility to radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57:769–78.

Schoepfel SL, LaVigne ML, Martel MK, et al. Three-dimensional treatment planning of intracavitary gynecologic implants: Analysis of ten cases and implications for dose specification. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 28:277–283.

Shikazono N, Noguchi M, Fujii K, Urushibara A, Yokoya A. The yield, processing and biological consequences of clustered DNA damage induced by ionizing radiation. *J Radiat Res.* 2009; 50(1):27-36.

Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the Cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 14(4):197-210.

Siliciano JD, Canman CE, Taya Y, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev.* 1997; 11 (24): 3471–81.

Silva RMV, Macedo LE, Pinezi JCD, Souza DN. The Current Situation of Cervical Brachytherapy in Brazil. In: *Proceedings of the 25th International Nuclear Physics Conference INPC 2013; 2013 Jun 2-7; Firenze (Italy). Palazzo dei Congressi of Firenze; 2013.*

Silva RMV, Pinezi JCD, Macedo LEA, Souza DN. Current situation of high-dose-rate brachytherapy for cervical cancer in Brazil. *Radiol Bras.* 2014; 47(3): 159–164.

Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol* 2003; 4: 529–536.

Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics. 4th Ed. New York: Garland Science.; 2010. 781 p.

Stromberger C, Kom Y, Kawgan-Kagan M, Mensing T, Jahn U, Schneider A, Budach V, Köhler C, Marnitz S. Intensity-modulated radiotherapy in patients with cervical cancer. An intra-individual comparison of prone and supine positioning. *Radiat Oncol.* 2010; 5:63.

Sullivan KD, Gallant-Behm CL, Henry RE, Fraikin JL, Espinosa JM. The p53 circuit board. *Biochim. Biophys. Acta* 2012; 1825: 229–244.

União Internacional para o Controle do Câncer (*Union for International Cancer Control* - UICC). Sistema TNM. Disponível em: <<http://www.uicc.org/resources/tnm/publications-resources>>. Acessado em 11/8/2014.

USJT. Acervo digital de lâminas da Universidade São Judas Tadeu. Disponível em: <<http://www.usjt.br/acervolaminas/index.php/citologia/4-histologiageral/51-tecidos-epiteliais-de-revestimento#5>>. Último acesso em 12 de março de 2013.

Van de Kamer JB, De Leeuw AAC, Moerland MA, Jürgenliemk-Schulz IM. Determining DVH parameters for combined external beam and

Brachytherapy treatment: 3D biological dose adding for patients with cervical cancer. *Radiother Oncol* 2010; 94:248–53.

Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL (2008) The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 7: 979–987. Review.

Viswanathan AN, Creutzberg CL, Craighead P, McCormack M, Toita T, Narayan K, Reed N, Long H, Kim HJ, Marth C, Lindegaard JC, Cerrotta A, Small W Jr, Trimble E. International brachytherapy practice patterns: a survey of the Gynecologic Cancer Intergroup (GCIg). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012; 82(1):250-5.

Viswanathan AN, Yorke ED, Marks LB, Eifel PJ, Shipley WU. Radiation dose-volume effects of the urinary bladder. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010; 76(3 Suppl):S116-22.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000; 408(6810): 307-10.

Vousden KH, Lu X. Live or let die: the Cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(8):594-604.

Wachter-Gerstner N, Wachter S, Reinstadler E, et al. Bladder and rectum dose defined from MRI based treatment planning for cervix cancer brachytherapy: comparison of dose-volume histograms for organ contours and organ wall, comparison with ICRU rectum and bladder reference point. *Radiother Oncol* 2003; 68:269-76.

Wade M, Wang YV, Wahl GM. The p53 orchestra: *MDM2* and *MdmX* set the tone. *Trends Cell Biol.* 2010; 20(5):299-309.

Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian Cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1988; 35:95–125.

Weller GR, Brandt VL, Roth DB. Doing more with less in bacterial DNA repair. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 1158-9.

Weller GR, Kysela B, Roy R, Tonkin LM, Scanlan E, Della M, Devine SK, Day JP, Wilkinson A, di Fagagna FA, Devine KM, Bowater RP, Jeggo PA, Jackson SP, Doherty AJ. Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science.* 2002; 297: 1686-9.

WHO. Vaccines against human papillomavirus. [Last accessed on 2011 June 4]. Available from: <<http://www.who.int/vaccines/en/hpvrd.shtml/shtml/shtml>>.

Williams J, Chen Y, Rubin P, Finkelstein J, Okunieff P. The biological basis of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Semin Radiat Oncol* 2003; 13: 182–188.

Wyman C, Kanaar R. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* 2006; 40: 363-83.

Zhang N, Chen P, Khanna KK, Scott S, Gatei M, Kozlov S, Watters D, Spring K, Yen T, Lavin MF. Isolation of full-length ATM cDNA and correction of the ataxia-telangiectasia Cellular phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997, 22;94 (15): 8021-6.

Zhang XP, Liu F, Cheng Z, Wang W. Cell fate decision mediated by p53 pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106 (30): 12245–50.

Zhang XP, Liu F, Wang W. Two-phase dynamics of p53 in the DNA damage response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108 (22): 8990-5.

Zhang Y, Hefferin ML, Chen L, Shim EY, Tseng HM, Kwon Y, Sung P, Lee SE, Tomkinson AE. Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14: 639-46.

Zhu Q, Yao J, Wani G, Wani MA, Wani AA. *MDM2* mutant defective in binding p300 promotes ubiquitination but not degradation of p53: evidence for the role of p300 in integrating ubiquitination and proteolysis. *J Biol Chem.* 2001; 276(32):29695-701.