

"When you stop waiting, that is the moment you see everything that you want to see. This is the moment you receive what you want, because you discover everything you have."

Tulku Lobsang

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

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

Agradecimientos

Embora, pela sua finalidade académica, uma dissertação seja um trabalho individual, muitos foram os que contribuíram para que mais uma etapa da minha vida se concretizasse. Por essa razão de-sejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, directora do Serviço de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela orientação deste projecto, pelo apoio, disponibilidade, pelas críticas e conselhos na revisão do manuscrito e, em especial, pela partilha de conhecimento, experiência científica e pelos ensinamentos.

À Mestre Mafalda Laranjo, por me ter supervisionado, pela dedicação e ajuda diária ao longo deste ano. Pela partilha de conhecimento pela orientação e pela revisão deste manuscrito.

À Doutora Maria João Carvalho pela ajuda na realização deste projecto, pelo apoio e simpatia quer na partilha de conhecimento científico, quer na realização deste manuscrito.

À Mestre Ana Margarida Abrantes, por toda a disponibilidade e ajuda ao longo deste ano, pela simpatia, dedicação e partilha de conhecimento.

Ao Doutor Artur Paiva, à Dra. Andreia Ribeiro e à Ana Paula Lopes, do Centro de Histocompatibilidade dos Hospitais da Universidade de Coimbra, os meus agradecimentos pelo apoio prestado nos estudos de caracterização das células em termos de expressão dos marcadores por citometria de fluxo.

Ao Mestre João Casalta, pela ajuda na análise estatística do meu projecto. Pela disponibilidade, carinho e amizade.

Às Mestres Ana Brito, Salomé Pires, Catarina Mamede e Rita Gomes e ao Mestre Fernando Mendes pela forma calorosa como me acolheram e pela disponibilidade que sempre demonstraram.

À Cláudia Caridade pela simpatia e disponibilidade diária.

Ao Pedro Santos por todos os momentos em que me fez sorrir, por todas as conversas e por toda a amizade. À Marta Braga por todas as horas partilhadas na câmara de fluxo e pela amizade que travamos ao longo deste ano.

Ao Marcos, por toda a amizade, simpatia e disponibilidade que demonstrou ao longo deste tempo.

Aos meus colegas e amigos Rita Silva e Miguel Rocha que, tal como eu, estão a desenvolver projectos no serviço, e que tornaram os dias mais agradáveis, repletos de boa-díspoição e camaradagem.

Às minhas amigas Mónica Mendes, Lílana Pedrosa e Vanessa Silva, por todos os momentos, por toda a união e por toda a amizade. Pela proximidade e carinho que permitiram que os meus dias fossem mais leves e felizes.

Às minhas amigas Raquel Trindade, Cláudia Gonçalves, Carla Guerra e Cíntia Horta, pela amizade, apoio e pelos bons momentos, que foram muitos, e que me acompanharão para sempre.

À Ana Taboada por todo o amor, amizade e apoio incondicional. Por ter acreditado, por me fazer acreditar, por me encher o coração e a vida de um néctar que se chama felicidade.

Ao Carlos Mota, por toda a amizade e apoio, por todos os momentos e desvaneios, por toda a partilha e compreensão. Por ser quem é, e por me dar a felicidade de ser meu amigo.

Ao Jorge Silva, simplesmente por ter existido.

A todos os que de alguma maneira contribuíram para aquilo que sou e para a realização deste projecto e que embora não nomeados, jamais serão esquecidos.

À Isa, a razão de eu ser quem sou. Ao Ni, por tudo e por mais alguma coisa.

A toda a minha família, por todo o apoio e carinho. Em especial, aos meus pais por tudo o que fizeram por mim, por todo o carinho e por terem sempre acreditado em mim. E, ao meu irmão, por ser o melhor do mundo.

E por último, agradeço ao meu Mestre Tulku Lobsang pela palavra, pelo sorriso e pela liberdade.

Resumo

O cancro do endométrio é uma das patologias malignas mais comuns no mundo sendo a sétima causa de morte no sexo feminino na Europa Ocidental. A existência de populações celulares com propriedades de células estaminais que são resistentes às terapias convencionais, como por exemplo a quimioterapia, representam um problema para a cura deste tipo de cancro.

O objectivo deste estudo foi isolar e identificar células com propriedades de células estaminais do cancro do endométrio, avaliar a sua importância na resposta à quimioterapia, no metabolismo glicolítico tumoral e potencial replicativo com ^{18}F -FDG e ^{18}F -FCHO, respectivamente, e finalmente determinar o seu comportamento *in vivo*.

Neste trabalho submeteu-se a linha de adenocarcinoma do endométrio ECC-1 ao protocolo de formação de esferas. Tendo sido, posteriormente, o seu fenótipo caracterizado por citometria de fluxo e confirmando o seu potencial tumorigénico *in vivo*.

A citotoxicidade da carboplatina, da ciclofosfamida, do paclitaxel e da doxorubicina foram avaliadas, bem como a expressão da proteína p53 por *western blot*. Realizaram-se ainda estudos de captação com ^{18}F -FDG e ^{18}F -FCHO.

Desenvolveu-se um modelo animal ortotópico, em que se injectaram células ECC-1 e ECC-1-G3 na trompa de Ratos RNU's com aproximadamente 10 semanas de vida.

A linha celular estudada forma esferas e as células ECC-1-G3 têm potencial tumorigénico, assim como a linha basal, ECC-1. Relativamente ao fenótipo avaliado por citometria de fluxo pode dizer-se que o fenótipo descrito na literatura como identificador destas células, CD44+/CD24-, nem sempre se verifica havendo uma propensão para ambos serem positivos.

Nos estudos de citotoxicidade, verificou-se uma resposta diferencial entre os vários fármacos testados na linha ECC-1. A doxorubicina foi o único fármaco testado nas linhas ECC-1, ECC-1-G3 e ECC-1-ES3 e a resposta a este nas 3 populações celulares apresenta diferenças interessantes, principalmente às 72 horas. A expressão de p53 mostrou-se diferencial para as

populações celulares ECC-1, ECC-1-ES3 e ECC-1-G3, sendo maior em G3 e menor em ES3. O metabolismo glicolítico foi avaliado nestas células tendo-se verificado baixos coeficientes de captação. Já os estudos de captação efectuados com ^{18}F -FCHO, ainda que preliminares, revelam uma maior predominância nas células ECC-1-G3.

No que respeita ao modelo animal, verificou-se que o modelo proposto, ainda que preliminar, funciona, tendo-se obtido tumor no endométrio com alguma invasão pélvica e do peritoneu.

Para os dois modelos *in vivo*, analisaram-se ainda as células tumorais por citometria de fluxo, tendo em vista verificar a presença de marcadores descritos como *stem*, e verificou-se uma maior positividade para os tumores de ECC-1-G3 em relação aos de ECC-1.

Este projecto visou comparar a linha basal, ECC-1, com as populações de esferas que dela provêm, tendo-se provado uma resposta diferencial *in vitro* e *in vivo*. Considera-se que os resultados obtidos conduzem ao início de uma linha de investigação que poderá ter bastante impacto num futuro próximo na melhor avaliação do prognóstico e na definição de protocolos tratamento do cancro do endométrio mais orientados em termos de expressão molecular.

Abstract

The endometrial cancer is one of the most common malignancies in the world and the seventh leading cause of death in women in Western Europe. The existence of cell populations with the properties of stem cells which are resistant to conventional therapies such as chemotherapy represent a problem for the cure of this kind of cancer.

The aim of this study was to isolate and identify cells with stem cell properties in endometrial cancer, to determine their importance in response to chemotherapy, in tumor glycolytic metabolism and replicative potential, with ^{18}F -FDG and ^{18}F -FCHO respectively, and ultimately determine their behavior *in vivo*.

In this study, underwent endometrial adenocarcinoma cell line, ECC-1, to the sphere formation assay. Subsequently their phenotype were characterized by flow cytometry and confirming their tumorigenic potential *in vivo*.

The cytotoxic effect of carboplatin, cyclophosphamide, paclitaxel and doxorubicin were evaluated as well as p53 expression, by western blot technique. There were also uptake studies with ^{18}F -FDG and ^{18}F -FCHO.

It was developed an orthotopic model. The cells ECC-1 and ECC-1-G3 were injected into the trumpet of RNU's rats with approximately 10 weeks old.

The cell line studied forms spheres and the cells ECC-1-G3 have tumorigenic potential such as the baseline, ECC-1. For the phenotype measured by flow cytometry can be said that the phenotype described in the literature as an identifier of these cells is not always present, CD44+/CD24-, with a propensity to be both positive.

In cytotoxicity studies, it was found a differential response between the various drugs tested in ECC-1 cell line. Doxorubicin was the drug tested in ECC-1, G3-1-ECC and ECC-1-MS3 cell populations and the response of these three cell populations shows interesting differences, especially at 72 hours. The expression of p53 was differential for the ECC-1 cell populations, MS3-1-ECC and ECC-1-G3, being higher in G3 and lower in MS3. The glycolytic metabolism was assessed in these cells and low rates of uptake has been found. Although the

uptake studies performed with ^{18}F -FCHO were preliminar, it was shown a greater preponderance in ECC-1 cell-G3.

In what concerns to the animal model, it was found that the proposed model works, and despite of preliminar, it was verified the existence of tumor in the endometrium with a pelvic and peritoneum invasion.

For the two in vivo models, the tumor cells were analyzed by flow cytometry in order to verify the presence of the marker described as cancer stem cells markers, and there was a higher positive tumors for ECC-1-G3 as compared to the ECC-1.

This project aimed to compare the baseline, ECC-1, with the population of spheres that results from it, having proved a differential response *in vitro* and *in vivo*. It is understood that the results suggest the beginning of a line of research, that may have a major impact in the evaluation of prognosis and future protocols treatment for endometrial cancer.

*Lista de
Abreviaturas*

¹⁸F-FCHO	<i>(¹⁸F)fluoromethyl-dimethyl-2-hydroxyethylammonium</i>
¹⁸F-FDG	<i>2-desoxi-2-(¹⁸F)fluoro-D-glicose</i>
^{99m}Tc	tecnécio-99-metastável
^{99m}Tc-MIBI	^{99m} Tc-2-metoxibutilo-isonitrilo
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
An-V	anexina V
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	adenosina trifosfato
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
CO₂	dióxido de carbono
CSC	<i>cancer stem cell</i>
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F12</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
ECC-1-G	esferas em cultura aderente
ECC-1-MS	esferas em suspensão
ECF	<i>elemental chlorine free</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetria
FMUC	Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
FSC	<i>forward scatter</i>
G-6-PD	<i>glicose-6-fosfato desidrogenase</i>

GLUT	transportadores de glicose
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HER-2/neu	Gene do <i>human epidermal growth factor receptor-2</i>
HPNCC	<i>hereditary non-polyposis colorectal cancer</i>
IC50	<i>half maximal inhibitory concentration</i>
K-ras	<i>kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
MIF	média de intensidades de fluorescência
mRNA	ácido ribonucleic (RNA) mensageiro
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NF-KB	<i>nuclear factor kappa beta</i>
NOD/SCID	<i>non-obese/severe-combined imunodeficientes</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
P53	proteína p53
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PET	<i>positron emission thomography</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	<i>difluoreto de polivinilideno</i>
RE α	receptor de estrogénios alfa
RE β	receptor de estrogénios beta
RE	receptor de estrogénios
RIPA	tampão de radioimunoprecipitação
RP	receptor de progesterona
RPMI	<i>Rooswell Park Memorial Institute Medium</i>
SDS	<i>dodecil sulfato de sódio</i>
SPSS	<i>statistical package for the social science software</i>
SSC	<i>side scatter</i>

TBST-T	<i>Tris-Buffered Saline Tween</i>
THY1	<i>CD90 (Cluster of Differentiation 90)</i>
β – catenina	<i>cadherin-associated</i>

*Índice
de Figuras*

Figura 1.1 – Células Estaminais. Em relação ao potencial de diferenciação, as células estaminais podem ser caracterizadas como totipotentes – um óvulo fertilizado e blastómeros iniciais, capazes de originar qualquer tipo de célula de um órgão ou placenta; pluripotentes – células embrionárias capazes de dar origem a qualquer tipo de célula de um órgão, mas não a placenta; multipotentes- células da ectoderme, endoderme, mesoderme; e unipotentes – células capazes de dar origem a um único tipo de célula de um tecido ¹⁸	15
Figura 1.2 – Processos cíclicos do endométrio humano. Regeneração, proliferação, , diferenciação e regressão do endométrio ao longo do período de vida fértil da mulher. Estes processos poderão estar relacionados com a presença de células estaminais somáticas em determinadas fracções no epitélio e no estroma endometriais ²⁴	18
Figura 1.3 – O Ciclo celular é o conjunto de processos pelos quais a célula passa entre duas divisões celulares. Consiste na interfase (I) e na fase mitótica (M), que inclui a mitose e a divisão celular (citocinese) ²⁹	21
Figura 3.1 – Esquema representativo dos quatro campos do hemocitómetro (câmara de Neubauer) utilizados na determinação da viabilidade celular.....	36
Figura 3.2 – Equipamento <i>LigandTracer</i> , utilizado para a realização de estudos de captação. .	46
Figura 4.1 – Imagens de culturas celulares obtidas após realização do protocolo de formação de esferas. (A) ECC-1 ampliação 40 x; (B) ECC-1-ES1 ampliação 40x; (C)ECC-1-ES2 ampliação 40x; (D) ECC-1-ES3 ampliação 40x; (E) ECC-1-G1 ampliação 40x; (F) ECC-1-G2; (G) ECC-1-G3...	57
Figura 4.2 – Densidade de esferas ao longo das três gerações.	58
Figura 4.3 – Tempo de duplicação celular das linhas celulares ECC-1 e ECC-1-G3, expresso em horas. Os resultados expressam a média de nove experiências independentes e erro padrão associado (n=9).	59
Figura 4.4 – Expressão do marcador molecular de superfície CD24 nas populações celulares ECC-1(n=13), ECC-1-G1(n=3), ECC-1-G3(n=5), ECC-1-ES1(n=8) e ECC-1-ES3(n=10). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas em relação à linha celular original ECC-1 e estão assinaladas com *. Considerou-se um nível de significância de 0,05, sendo * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. As comparações múltiplas foram realizadas entre as condições e a linha celular ECC-1. Os resultados representam a média pelo menos três experiências independentes.	59
Figura 4.5 – Expressão do marcador molecular de superfície CD44 nas populações celulares ECC-1(n=13), ECC-1-G1(n=3), ECC-1-G3(n=5), ECC-1-ES1(n=8) e ECC-1-ES3(n=10). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas em relação ao controlo e estão assinaladas com *. Considerou-se um nível de significância de 0,05, sendo * $p< 0,05$; ** $p<0,01$;	

*** $p < 0,001$. As comparações múltiplas foram realizadas entre as condições e a linha celular ECC-1. Os resultados representam a média pelo menos 3 experiências independentes..... 60

Figura 4.6 – Expressão do marcador molecular de superfície CD133 nas populações celulares ECC-1(n=13), ECC-1-G1(n=3), ECC-1-G3(n=5), ECC-1-ES1(n=8) e ECC-1-ES3(n=10). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas em relação ao controlo e estão assinaladas com *. Considerou-se um nível de significância de 0,05, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. As comparações múltiplas foram realizadas entre as condições e a linha celular ECC-1. Os resultados representam a média pelo menos 3 experiências independentes..... 61

Figura 4.7 – Percentagem de proliferação para as 3 máximas concentrações testadas (5; 7 e 7,66 mM) para as 24, 48 e 72 horas de incubação com ciclofosfamida. Os resultados expressam a média de 5 experiências independentes e respectivo erro padrão (n=5). 62

Figura 4.8 – (A) Percentagem de proliferação para as três máximas concentrações testadas (200; 250 e 500 μ M) para as 24, 48 horas de incubação com carboplatina. (B) Curva de dose resposta para a incubação de 72 horas com carboplatina. Os resultados expressam a média de no mínimo três experiências independentes realizadas em duplicado e erro padrão correspondente(n=6). 62

Figura 4.9 – Curvas de dose resposta da linha celular ECC-1 após de 24 e 48 horas de incubação com paclitaxel/taxol. A análise estatística pelo teste Anova revelou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as duas curvas, cujo valor de $p=0,0009$, considerando-se um nível de significância de 0,05. Os resultados expressam a média de no mínimo quatro experiências independentes e erro padrão(n=4) 63

Figura 4.10 – Curvas de dose resposta da linha celular ECC-1 após de 24, 48 e 72 horas de incubação com doxorubicina. Os resultados expressam a média de no mínimo 8 experiências independentes realizadas em duplicado e respectivo erro padrão (n=16) 64

Figura 4.11 – Curvas de dose resposta da população ECC-1-G3 após de 24, 48 e 72 horas de incubação com doxorubicina. Os resultados expressam a média de no mínimo 8 experiências independentes realizadas em duplicado e respectivo erro padrão(n=16). 64

Figura 4.12 – IC50 para os diferentes tempo de incubação (24, 48 e 72 horas) com doxorubicina para as linhas celulares ECC-1 e ECC-1-G3. Considerou-se um nível de significância de 0,05, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Os resultados expressam uma média de no mínimo 8 experiências independentes realizadas em duplicado e respectivo erro padrão (n=16)..... 65

Figura 4.13 – Curvas de dose resposta para a população celular ECC-1-ES3 para a incubação de 24, 48 e 72 horas com Doxorubicina. Os resultados expressam a média de no mínimo duas experiências independentes e respectivo erro padrão (n=2). 66

Figura 4.14 – Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo com a marcação de anexina das populações celulares ECC-1 ECC-1-G3 após 24, 48 e 72 horas de incubação com 300 nM de Doxorubicina. Neste gráfico comparam-se as células vivas e portanto anexina negativas.	67
Figura 4.15 – Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo com a marcação de Anexina das populações celulares ECC-1 e ECC-1-G3 após 24, 48 e 72 horas de incubação com 300 nM de doxorubicina. Neste gráfico comparam-se as razões células em apoptose/ células vivas para cada linha celular.	68
Figura 4.16 – Curvas do estudo comparativo da percentagem de captação de ¹⁸ F-FDG e de ¹⁸ F-FCHO na linha celular ECC-1. Os resultados expressam a média de no mínimo três experiências independentes e respectivo erro padrão (n=6 para 18F-FDG e n=3 para 18F-FCHO).	69
Figura 4.17 – Curvas do estudo comparativo da percentagem de captação de 18F-FDG das populações celulares ECC-1 e ECC-1 ES3. Os resultados expressam a média de no mínimo 3 experiências independentes e respectivo erro padrão (n=6 para as duas populações).	70
Figura 4.18 – Curvas do estudo comparativo da percentagem de captação de 18F-FDG das populações celulares ECC-1 e ECC-1 G3 efectuado no equipamento <i>LigandTracer</i> . Os resultados expressam a média de 4quatro experiências independentes e erro padrão associado (n=4). ..	71
Figura 4.19 – Curvas do estudo comparativo da percentagem de captação de 18F-CHO das populações celualres ECC-1(n=2) e ECC-1 G3(n=1) efectuado no equipamento <i>LigandTracer</i> . Os resultados apresentam uma média de duas experiencias independentes para as ECC-1) e respectivo erro padrão.....	71
Figura 4.20 – Razão entre a expressão da proteína p53 para o controlo e cada condição (ECC-1-ES3 e ECC-1-G3). Os resultados resultam da média de no mínimo 3 experiencias independentes e respectivo erro padrão.....	72
Figura 4.21 – Razão entre a expressão da proteína p53 para o controlo e cada condição. As condições são: 24, 48 e 72 horas de incubação com doxorubicina para as populações celulares ECC-1 e ECC-1-G3. Os resultados resultam da média de no mínimo 2 experiencias independentes e respectivo erro padrão.....	73
Figura 4.22 – Curvas que expressam o volume tumoral dos xenotransplantes de ECC-1(n=1 e ECC-1-G3(n=5) em função do tempo. Os resultados apresentam uma média de 5 experiências independentes para as ECC-1-G3.....	74
Figura 4.23 – Ratinho balb/c nu/nu injectado células ECC-1,com tumor no dorso, flanco direito, de células ECC-1.	74
Figura 4.24 – Análise fenotípica de tumores resultantes do modelo heterotópico de cancro do endométrio com células tumorais das populações celulares ECC-1 (n=1) e ECC-1-G3 (n=5). Os	

resultados apresentam uma média de 5 experiências independentes para as ECC-1-G3 e erro padrão associado.	75
Figura 4.25 – Registo fotográfico durante remoção do tumor resultante do modelo ortotópico de ECC-1. Tumor de grandes dimensões (A) em que havia alteração do fígado e intestino. (B) Tumor de grandes dimensões quem que havia completa alteração dos órgãos genitais.....	76
Figura 4.26 – Registo fotográfico durante remoção do tumor resultante do modelo ortotópico de ECC-1 (A) e de ECC-1-G3 (B).	77
Figura 4.27 – Análise fenotípica de tumores resultantes do modelo ortotópico de cancro do endométrio com células tumorais das linhas celulares ECC-1(n=3) e ECC-1-G3 (n=2). Os resultados apresentam uma média mínima de 2 experiências independentes e erro padrão associado.....	78
Figura 4.28 – Imagem estática obtida após injeção de ^{99m} Tc-MIBI em ratos fêmea injectados com ECC-1(à esquerda) e ECC-1-G3(à direita).	79

*Índice
de Tabelas*

Tabela 1.1. – Tabela FIGO 2009, prognóstico do cancro do endométrio ⁹	11
Tabela 3.1 – Fármacos utilizados nos estudos de citotoxicidade.	40
Tabela 4.1 – Valores de p para a análise estatística (teste Anova) efectuada entre os diferentes tempos de incubação para as linhas celulares ECC-1 e ECC-1-G3.	65
Tabela 4.2 – IC50 de Ciclofosfamida, carboplatina, paclitaxel/taxol após 24, 48 e 72 horas de incubação na linha celular ECC-1 e IC50 de Doxorubicina após 24, 48 e 72 horas de incubação nas linhas celulares ECC-1 e ECC-1-G3.	65
Tabela 4.3 – IC50 de doxorubicina após 24, 48 e 72 horas de incubação na população celular ECC-1-ES3.	66
Tabela 4.4 – Razão da expressão das MIF dos marcadores moleculares de superfície CD24, CD44 e CD133 das células de tumor de modelo heterotópico marcadas em relação ao controlo (branco).....	75
Tabela 4.5 – Razão da expressão das MIF dos marcadores moleculares de superfície CD24, CD44 e CD133 das células de tumor de modelo ortotópico marcadas em relação ao controlo (branco).....	78
Tabela A – Anexo: Registo do historial de cada animal utilizado para o modelo ortotópico do endométrio.....	111

Índice

I.	Introdução	1
1.1.	Cancro do Endométrio	3
1.2.	Classificação histológica.....	6
1.3.	Patologia	9
1.4.	Factores de Prognóstico	10
1.5.	Metastização.....	13
1.6.	Células Estaminais Tumorais.....	14
1.6.1.	Evidência da presença de Células Estaminais no Carcinoma do Endométrio ...	17
1.7.	Quimioterapia.....	21
1.7.1.	Fármacos utilizados na quimioterapia do Cancro do Endométrio	22
1.8.	Multirresistência	24
II.	Objectivos.....	29
III.	Material	33
	e Métodos	33
3.1.	Cultura de Células.....	35
3.1.1	Viabilidade Celular.....	35
3.2.	Protocolo de formação de Esferas.....	36
3.3.	Quantificação da densidade de esferas.....	37
3.4.	Tempo de duplicação celular	38
3.5.	Análise fenotípica por citometria de fluxo	38
3.6.	Estudos de Citotoxicidade	40
3.6.1.	Avaliação da proliferação celular pelo ensaio do MTT	40
3.6.2.	Avaliação da proliferação celular pelo <i>AlamarBlue</i>	42
3.6.3.	Avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo	43
3.7.	Estudos de Captação.....	44
3.7.1.	Estudos de Captação recorrendo ao <i>LigandTracer</i>	45
3.8.	Western Blot.....	47
3.9.	Estudos <i>in Vivo</i>	49
3.9.1.	Modelo heterotópico do endométrio	49
3.9.2.	Modelo Ortotópico de Endométrio.....	50
3.9.2.1.	Estudos Imagiológicos – ^{99m} Tc-MIBI.....	51
3.10.	Estudos <i>ex vivo</i>	52
3.10.1.	Análise Fenotípica dos tumores por Citometria de Fluxo	53

3.11.	Análise Estatística	53
IV.	Resultados	55
4.1.	Protocolo de formação de esferas.....	57
4.2.	Densidade de esferas.....	57
4.3.	Tempo de duplicação celular	58
4.4.	Análise fenotípica por citometria de fluxo	59
4.5.	Estudos de citotoxicidade	61
4.5.1.	Avaliação da proliferação celular pelo ensaio do MTT	61
4.5.2.	Avaliação da proliferação celular pelo ensaio do Alamar Blue	66
4.5.3.	Avaliação da viabilidade por citometria de fluxo	67
4.6.	Estudos de captação	69
4.7.	Estudos de captação recorrendo do <i>LigandTracer</i>	70
4.8.	Western	72
4.9.	Modelos animais.....	74
4.9.1.	Modelo heterotópico do endométrio	74
4.9.1.1.	Análise fenotípica dos tumores por citometria de fluxo	75
4.9.2.	Modelo ortotópico do endométrio	76
4.9.2.1.	Análise fenotípica dos tumores por citimetria de fluxo	77
4.9.2.2.	Estudos Imagiológicos – ^{99m} Tc-MIBI.....	78
V.	Discussão	81
VI.	Conclusão	95
	e Perspectivas.....	95
	Futuras	95
VII.	Bibliografia.....	99
VIII.	Anexo.....	109

I. Introdução

1.1. Cancro do Endométrio

O endométrio é constituído por tecidos muito dinâmicos durante a idade reprodutiva da mulher, encontrando-se em constante mudança como resposta aos diferentes estímulos hormonais, em que o principal objectivo é a implantação do embrião e aporte nutricional durante a gravidez¹.

As principais hormonas envolvidas neste processo são os estrogénios e a progesterona. Os estrogénios estimulam a proliferação do endométrio, ao passo que a progesterona, produzida maioritariamente pelo corpo amarelo, inibe a proliferação endometrial que entra em fase secretora. Posteriormente, é crucial a estimulação estrogénica, pois é esta que permite a reciclagem deste órgão, preparando-o novamente para o período fértil que se segue².

Em determinadas etapas da vida, nomeadamente nos períodos de pré-menopausa, em que a mulher é sujeita a grandes flutuações hormonais, surgem excessos de estimulação estrogénica que podem culminar no aparecimento de uma hiperplasia endometrial. Na generalidade, esta aparece mais em mulheres obesas. Este acontecimento pensa-se que se deve à conversão no tecido adiposo de androgénios em estrogénios por uma enzima denominada aromatase. Esta estimulação estrogénica, que tem como resultado um endométrio altamente proliferativo, pode originar uma neoplasia que pode não só invadir os tecidos vizinho como também metastizar³.

O Cancro do endométrio é a neoplasia genital feminina maligna mais comum nos países desenvolvidos, e a sétima causa de morte do sexo feminino na Europa ocidental. Todos os anos surgem aproximadamente 7406 novos casos no Reino Unido, 88068 na União Europeia e 40102 na América do Norte. Mais de 90% dos casos ocorrem em mulheres com mais de 50 anos, sendo de facto a idade média de incidência de aproximadamente 63 anos. Surge,

portanto, no final da idade reprodutiva da mulher e nos anos que se seguem, próximo da menopausa. Apenas em 5% dos casos, a idade das doentes é inferior a 40 anos e entre 20 a 25% dos casos diagnosticados precedem a menopausa. No Reino Unido, a incidência em mulheres mais velhas, entre os 60 a 79 anos, aumentou mais de 40% entre 1993 e 2007 e é este o panorama geral do resto dos países europeus^{1,4}.

No que respeita a factores de risco, sabe-se que a idade, a obesidade, o aumento da concentração de estrogénios no plasma (endógenos ou exógenos), ovários poliquísticos, cancro da mama (devido à hormonoterapia) e a hiperplasia do endométrio são apontados como factores de risco para o aparecimento deste carcinoma.

Sabe-se que todos os processos que envolvam o aumento de estrogénios no organismo ou que contribuam para irregularidades dos ciclos menstruais são processos que influenciam o desenvolvimento deste tipo de cancro, nomeadamente, a ocorrência de uma menarca precoce ou uma menopausa tardia. A nuliparidade e a infertilidade também parecem estar correlacionadas com a doença, uma vez que a incidência é superior em mulheres que nunca engravidaram.

O aumento do uso da terapêutica hormonal de substituição com base em estrogénios, coincidiu com o aumento deste tipo de cancro. Vários estudos revelaram que o risco de uma mulher que se submeteu esta terapêutica é cerca de 4,5 vezes superior. Em relação à terapia combinada, usando estrogénios e progesterona, considerou-se que não há aumento significativo do número de casos de cancro, o que revela que esta é preferível à terapêutica apenas com base em estrogénios.

A obesidade é um dos principais factores de risco no que respeita ao cancro do endométrio. Pensa-se que tal se deva à capacidade que o tecido adiposo tem de produzir andrógénios. Estas moléculas são convertidas em estrogénios por uma enzima denominada aromatase. Em mulheres obesas, é comum registarem-se, precisamente, elevados níveis de estrogénios. Quanto maior a massa de tecido adiposo, maior a produção de andrógénios e

consequentemente mais elevados são os níveis de estrogénios no plasma, o que conduzirá a uma maior estimulação do endométrio. Deste modo, torna-se evidente que uma dieta saudável sem ingestão de bebidas alcoólicas e predominantemente rica em vitamina C e beta-carotenos seja absolutamente recomendável, bem como a prática de exercício físico.

Pensa-se que a toma de contraceptivos orais pode ser um factor protector do aparecimento do cancro do endométrio, estando, mais protegidas as mulheres que tomam contraceptivos há mais tempo.

Alguns estudos referem o tabaco como um possível protector, uma vez que mulheres fumadoras têm menor probabilidade de contrair a doença. É de ter em conta que estes dados apenas assumem relevância em mulheres obesas.

A diabetes tipo II e a hipertensão arterial estão também associadas ao cancro do endométrio. É de ter em conta que maioritariamente estas patologias estão relacionadas com a obesidade. As mulheres diabéticas não dependentes de insulina apresentam regularmente hiperinsulinémia. Este estado está directamente correlacionado com um estado hiperestrogénico, incluindo um aumento na produção de esteróides e na estimulação da produção de estradiol.

A associação entre hipertensão arterial e o desenvolvimento de cancro do endométrio não é clara. Na realidade, por estar associada a pacientes com obesidade esta patologia passa também a fazer parte dos factores de risco, embora isoladamente não seja um forte indicador de predisposição.

Tem sido estabelecido que o risco de incidência do cancro do endométrio é maior em indivíduos em que têm um historial familiar da doença. Mulheres cuja história familiar tenha indícios de síndrome HNPCC (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*) também têm maior predisposição ao desenvolvimento da neoplasia em questão^{1,3,5}.

1.2. Classificação histológica

A classificação actual dos carcinomas do endométrio da Organização Mundial de Saúde (OMS) divide estes tumores de acordo com as características histológicas que descrevem a morfologia destas células.

O adenocarcinoma endometrióide é o protótipo de um adenocarcinoma do endométrio contendo a arquitectura básica na disposição das glândulas endometriais de complexidade variável, com revestimento estratificado, colunar e de células epiteliais. Uma menor diferenciação é caracterizada por um aumento na proporção do tumor que é composto por massas sólidas de células epiteliais. As papilas intraglandulares que são formadas exclusivamente por células neoplásicas sem um estroma de suporte e um crescimento cribiforme, é comum em tumores com células bem diferenciadas, que se encontram confinadas ao endométrio. As glândulas do adenocarcinoma são formadas por células cilíndricas com bordo apical, resultando num delineado suave, com um contorno luminal redondo ou oval. Quanto menor for o grau de diferenciação do tumor, maior a preponderância entre o tumor sólido e a formação glandular. Um pormenor importante é que cerca de 60% dos adenocarcinomas endometrióide contêm mutações no gene supressor tumoral PTEN.

O adenocarcinoma secretor é uma variante incomum deste carcinoma que tem glândulas tubulares bem formadas e delineadas por um epitélio colunar com vacuolização subnuclear e em alguns casos supranuclear. Esta mudança por vezes demonstra a resposta à exposição de progesterona, quer em período de ovulação quer em situações de terapêutica hormonal com base em progesterona⁵.

O adenocarcinoma vilo-glandular é um outro subtipo de adenocarcinoma endometrióide e caracteriza-se pela formação de papilas compridas, finas, núcleos fibrovasculares ocasionalmente ramificados, revestidos por células colunares de bordo apical

estreito e geralmente com núcleos pequenos. A disposição das células neoplásicas que fazem a conexão entre os diferentes tecidos é análoga à das células de um adenocarcinoma típico.

Os adenocarcinomas com focos de diferenciação escamosa representam cerca de 20% dos casos de cancro do endométrio. Esta característica é normalmente bastante fácil de se detectar caracterizando-se por “camadas” de queratina, queratinização celular isolada ou evidência de pontes intracelulares. Contudo, para se conseguir fazer uma melhor distinção entre focos de diferenciação escamosa de focos com porções sólidas pouco diferenciadas surgiram mais características a ter em conta, como por exemplo a presença de membranas celulares distintas com um citoplasma eosinofílico mais abundante que nas restantes células do tumor⁶.

Os adenocarcinomas mucinosos podem ser de aparência mais tubular ou cribriforme, porém, o mais frequente é que tenham uma arquitectura papilar. O epitélio de revestimento é constituído por múltiplas camadas de células colunares e com uma quantidade intracitoplasmática variável de mucina a preencher a porção apical das suas células, à semelhança do tipo de epitélio endocervical.

Em algumas situações, o adenocarcinoma endometrióide pode conter células com características de células caliciformes com vacúolos distendidos, discretos e apicais. Na generalidade, a mucina intracitoplasmática é fácil de identificar, ainda assim, em casos mais complicados, a reacção com *mucicarmine*, um corante azul alsaciano, com células neoplásicas pode confirmar a sua presença. O estroma pode não ser de um tipo endometrial que à partida se torne evidente e muitas vezes contém células fusiformes e veias finas. Este tipo histológico é relativamente raro com uma idade média de diagnóstico de aproximadamente 60 anos e normalmente com um bom prognóstico⁷.

O adenocarcinoma seroso caracteriza-se por uma forte e complexa ramificação papilar formada por núcleos fibrovasculares, revestidos por uma ou mais camadas de células cúbicas com uma elevado grau nuclear e bordos apicais bem desenvolvidos. De uma maneira

geral, os núcleos fibrovasculares são de carácter agressivo e hialinizados, podendo também, mas mais ocasionalmente, ser finos e delicados. É frequente a presença de destacamentos de tufos de células epiteliais e corpos pseudomatosos. A forma superficial do tumor é formada pelas papilas que são irregulares e dilatadas, ou em forma de glândulas constituídas por células com atipia, o que normalmente constitui o aspecto mais típico deste tipo de neoplasma. O citoplasma é de uma forma mais geral eosinófilo e muito granulado com uma larga gama de nucléolos e figuras mitóticas aberrantes. Este tipo de carcinoma, algumas vezes, tem origem em pólipos ou em mutações nomeadamente na sobreexpressão de p53. É um carcinoma bastante agressivo que frequentemente se encontra já metastizado no momento da cirurgia. O adenocarcinoma de células claras (*clear cell*) do endométrio é reconhecido pelo citoplasma claro das suas células em crescimento. O padrão sólido consiste em massas de células grandes com forma poligonal, com um citoplasma pouco eosinófilo e com membranas celulares distintas. Em relação ao padrão glandular, este é remanescente de glândulas tubulares do adenocarcinoma endometrióide enquanto o padrão tubular é constituído por glândulas esféricas dilatadas. O padrão papilar em termos arquitectónicos é muito semelhante ao do carcinoma seroso, embora genericamente menor, possuindo ramificações dos núcleos fibrovasculares e frequentemente hialinizado. É ainda de referir que os últimos três padrões são normalmente revestidos por células com uma aparência em forma de mácula que é o resultado do desenvolvimento individual do ápex, projectando-se ao longo da superfície. Cerca de 4% dos adenocarcinomas endometrióide são de células claras e têm uma idade média de aparecimento de 68 anos, como aliás, o carcinoma seroso.

Sabe-se que à medida que o tumor perde a sua diferenciação a probabilidade de sobrevivência diminui. Por outro lado aumenta a possibilidade de invasão do miométrio.

A invasão do miométrio está directamente ligada com o grau de malignidade do tumor. A profundidade de penetração do tumor está relacionada com outros factores como o estadio/grau do tumor, sendo o prognóstico pior quando a indiferenciação é crescente^{5,6,7}.

1.3. Patologia

Bockhman, em 1983, sugeriu que existiam duas formas patogénicas distintas para o desenvolvimento do adenocarcinoma do endométrio. A primeira abarca mulheres obesas, com hiperlipidémia e sinais de hiperestrogenismo. Estas características são acompanhadas por hemorragias, infertilidade, menopausa tardia, hiperplasia do estroma do ovário e do endométrio. A segunda forma patológica, caracteriza-se em geral pela inexistência destes sinais. A estas formas, dá-se o nome de tipo I e tipo II, respectivamente⁷.

O adenocarcinoma do endométrio do tipo I é a forma mais comum, sendo responsável por 75 a 85% dos casos de cancro do endométrio existentes. É um tipo de cancro bem diferenciado, cujas células se apresentam com receptores para estrogénios, em que há invasão superficial do miométrio e é preferencialmente do tipo endometrióide. Ocorre mais frequentemente em mulheres mais jovens, obesas e com antecedentes de estimulação estrogénica isolada e prolongada (endógena ou exógena) em que há registo de hiperplasia endometrial. Normalmente, a resposta à terapêutica com base em progesterona é eficaz, apresentando prognósticos favoráveis. As alterações genéticas mais frequentes neste tipo de cancro são a deleção no PTEN e alterações no K-ras, assim como na proteína β -catenina e instabilidade de microssatélites⁶.

No que respeita ao adenocarcinoma do endométrio do tipo II, é um tipo de cancro pouco diferenciado e não endometrióide (predominantemente serosos, de células claras e carcinosarcomatosas), independente da estimulação estrogénica e coexiste com o endométrio

atrófico. É uma forma altamente invasiva, associada a metástases ganglionares, menos sensível à terapêutica com progesterona devido à baixa confluência de receptores hormonais sendo normalmente de prognóstico menos promissor. A sua causa depreende-se com mutações genéticas, nomeadamente, na p53 e amplificações dos oncogenes bcl-2 e HER-2/neu. Estes adenocarcinomas têm maior incidência nas formas hereditárias, em mulheres em período de pós menopausa, idosas e magras.

É do consenso geral entre patologistas que o adenocarcinoma do endométrio tem uma grande variedade de subtipos histológicos, definidos pelas células constituintes, em que cada um destes subtipos pode ser agrupado no tipo patológico I ou II. A maioria dos adenocarcinomas endometrióides, com ou sem diferenciação escamosa, os adenocarcinomas mucinosos e os adenocarcinomas vilo-glandulares são do tipo I. Os carcinomas serosos, de células claras e alguns adenocarcinomas endometrióide pouco diferenciados encontram-se no tipo II ^{5,7}.

1.4. Factores de Prognóstico

No cancro do endométrio são considerados factores prognósticos, o estadio em que a patologia se encontra, o grau e tipo histológico em causa, se existe ou não invasão do miométrio e linfovascular, a idade e a ocorrência de metástases ganglionares.

O estadio em que se encontra o tumor, de acordo com os parâmetros da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO, 2009) é o factor prognóstico mais importante no cancro do endométrio e está especificado na Tabela 1.1.

O tipo celular é também, por muitos autores, apontado como um factor de prognóstico importante. Os tumores do tipo I representam cerca de 80% dos carcinomas do

endométrio, são tipicamente do tipo endometrióide e estão associados à estimulação estrogénica geralmente associado à hiperplasia do endométrio e de uma maneira geral têm um prognóstico bastante favorável. Os tumores do tipo II representam apenas 10% do total de cancros do endométrio. Estes tumores podem desenvolver-se a partir do endométrio atrofico, pólipos ou de uma lesão pré-cancerígena (carcinoma intraepitelial do endométrio); têm carácter muito agressivo com invasão linfovascular e do miométrio, acarretando assim fraco prognóstico estando normalmente associados a mutações na p53 e ausência de receptores de estrogénios o que poderá indicar uma possível desdiferenciação do carcinoma endometriode precursor. Estes factos podem explicar alguns dos comportamentos de alguns tumores do tipo endometriode que, embora ainda não tenham mudado o seu fenótipo, se comportam como os do tipo seroso e células claras^{5,8,9}.

Tabela 1.1. – Tabela FIGO 2009, prognóstico do cancro do endométrio⁹.

Estadio I	
IA	Invasão da metade interna do miométrio
IB	Invasão da metade externa do miométrio
Estadio II	Invasão do estroma cervical sem invasão extrauterina*
Estadio III	
IIIA	Invasão da serosa uterina e/ou anexos**
IIIB	Invasão da vagina e/ou dos paramétrios
IIIC	Metástases em gânglios pélvicos e/ou paraaórticos
IIIC1	Gânglios pélvicos invadidos
IIIC2	Gânglios para aórticos invadidos com ou sem invasão dos pélvicos
Estadio IV	
IVA	Invasão da mucosa da bexiga e/ou do recto
IVB	Metástases à distância incluindo intra-abdominais e/ou gânglios inguinais

* A extensão exclusiva à mucosa endocervical deverá ser considerada como estadio I.

** A citologia peritoneal positiva deverá ser anotada mas não altera o estadio.

Os carcinomas de células escamosas e os de células transitórias são tumores raros e o prognóstico que lhes está normalmente associado depende muito do estadió em que se encontra.

De acordo com os vários estudos, a idade assume-se como um factor prognóstico forte, sendo de facto a incidência deste tipo de cancro maior em mulheres num período de pós-menopausa com idades superiores a 50 anos. Parte-se do princípio geral que os tumores, que são diploides, são menos agressivos que os que se encontram num estado de aneuploidia. Estudos feitos neste âmbito demonstraram que para o carcinoma do tipo endometrióide, as mulheres portadoras de tumores diploides tinham uma taxa de sobrevivência de 93%, ao passo que quando o tipo de tumor é aneuploide, a taxa de sobrevivência passaria a 74%^{5,6}.

Aproximadamente 40 a 80% dos tumores expressam os dois tipos de receptores hormonais, sendo os de estrogénios mais frequentes, enquanto os tumores que não expressam nenhum dos dois, representam apenas 10 a 36% dos casos. Os tumores do tipo I normalmente expressam receptores de estrogénio (RE) e de progesterona. Nos carcinomas do tipo II, a expressão destes receptores é bastante mais baixa e a recorrência também é bastante maior, mesmo tratando-se de tumores em estadió I. Estudos recentes identificaram isoformas dos receptores de estrogénios e encontraram algumas correlações entre a expressão das diferentes isoformas e a neoplasia em questão. Na verdade, sabe-se que a relação entre RE β /RE α aumenta de forma significativa quando se está na presença de um endométrio neoplásico, comparativamente com um endométrio normal. Sendo de igual forma, maior na hiperplasia com presença de atipia. Deste modo, é sugerido que o RE β terá eventualmente um papel importante na progressão do cancro e na consequente invasão do miométrio. De modo semelhante, a isoforma β dos receptores de progesterona (RP) parece ter influência na progressão deste carcinoma^{5,6}.

As mutações na p53 estão directamente relacionadas com o desenvolvimento do tumor. Em particular, nos tumores de tipo I, estas ocorrem num momento mais tardio e em

baixas percentagens (20%) sendo gradualmente mais frequentes à medida que se aproxima o grau 3. Por outro lado, a mutação da p53, nos carcinomas do tipo seroso ocorre bastante cedo com uma taxa de aproximadamente 100%. Pensa-se, mas ainda de forma enublada, que a p53 seja um indicador de sobrevivência. A sua sobreexpressão tem significado especialmente como um marcador^{5,8,9}.

A Bcl-2 está normalmente expresso no endométrio numa forma hormonal dependente, com um expoente na fase proliferativa. A sua expressão é detectada usualmente na hiperplasia, contudo, diminui quando se desenvolve um carcinoma, o que parece um pouco contraditório. Ainda assim, pensa-se que a perda de bcl-2 é indicador de um pior prognóstico⁸.

1.5. Metastização

As metástases são conjuntos de células tumorais que se destacam e migram do tumor primitivo, para outros locais do corpo, onde dão origem a tumores secundários, podendo ter características idênticas ou mais agressivas em relação às do tumor primário. Metástase é sinónimo de malignidade e representa um tumor num estágio mais avançado.

O carácter invasivo das neoplasias malignas condiciona a disseminação através dos vasos sanguíneos, linfáticos e invasão das cavidades corporais, originando deste modo o aparecimento de focos secundários. De um modo geral quanto mais agressiva, de crescimento mais rápido e maior for a neoplasia primitiva, maior a probabilidade de sofrer metastização ou até de se encontrar já metastizada no momento de diagnóstico⁹.

No que respeita ao cancro do endométrio a metastização pode surgir por invasão directa do miométrio, da serosa uterina, do colo do útero, das trompas, da vagina e, eventualmente, por invasão dos paramétrios. Pode ocorrer também a metastização transtubar que consiste no transporte das células cancerígenas através das trompas, que podem atingir a

cavidade abdominal. A metastização linfática é também um tipo de metastização muito frequente no cancro do endométrio uma vez que o endométrio tem uma rede linfática exuberante e complexa o que permite uma disseminação fácil e extensa por esta via. No que respeita à metastização vascular, que é mais rara e normalmente mais tardia, é responsável pelo aparecimento de metástases pulmonares, hepáticas, ósseas e cerebrais. Em relação às metástases vaginais estas podem surgir por disseminação linfática ou vascular, sendo frequentes mesmo em tumores limitados ao corpo uterino^{9,10,11,12,13,14}.

1.6. Células Estaminais Tumerais

As células estaminais, são células que têm uma capacidade ilimitada de proliferação, auto-renovação e plasticidade, podendo dividir-se quer assimétrica quer simetricamente. Estas células têm sido alvo de estudo, tendo em vista o conhecimento mais aprofundado das suas características e assim poder explorar as suas potencialidades promissoras, nomeadamente, no que diz respeito à terapêutica contra o cancro¹⁵.

As neoplasias são constituídas por populações heterogêneas de células com características biológicas diferentes, bem como um potencial de auto-renovação. Muitos estudos comprovaram que a maioria das terapias convencionais têm efeitos limitados, nomeadamente a quimioterapia. Estes resultados conduziram à suspeita da existência de uma população de células responsáveis pela manutenção do desenvolvimento do tumor, o seu crescimento, a capacidade de metastização e a recorrência. Esta população, devido às semelhanças evidentes com as células estaminais embrionárias são denominadas como células estaminais do cancro (CSCs, do inglês *Cancer Stem Cells*)¹⁶. Estas células têm características que as tornam únicas, no que respeita a esta patologia, como por exemplo a autorrenovação, a heterogeneidade, o potencial de diferenciação multidireccional e a resistência à apoptose. O

conceito das CSCs assume que estas têm como progenitor células estaminais, cuja transformação em CSCs se deve a um excesso de acumulação de mutações genéticas (mutações em oncogenes, em genes supressores tumorais e em genes envolvidos na reparação genética “miss match repair genes”) assim como em alterações epigénicas como anormal metilação de DNA e modificações nas histonas¹⁷.

A capacidade de auto-renovação que caracteriza as células estaminais tem por base a actividade aumentada da telomerase que permite a manutenção do tamanho dos telómeros a cada divisão. As células estaminais podem ser de vários tipos. As totipotentes, característica dos gâmetas humanos fecundados, têm a capacidade para originar todos os sistemas do organismo. Seguem-se as células estaminais pluripotentes, ou também muito vulgarmente denominadas por células estaminais embrionárias, precisamente porque são as células que existem no embrião e que possuem a capacidade de se diferenciar e originar qualquer tecido e/ou órgão. As células multipotentes são as que fazem parte das três camadas embrionárias que compõem o blastocisto, a endoderme, a mesoderme e a ectoderme. E por fim, temos as células unipotentes que apenas têm a capacidade de dar origem a um tipo de tecido¹⁸.

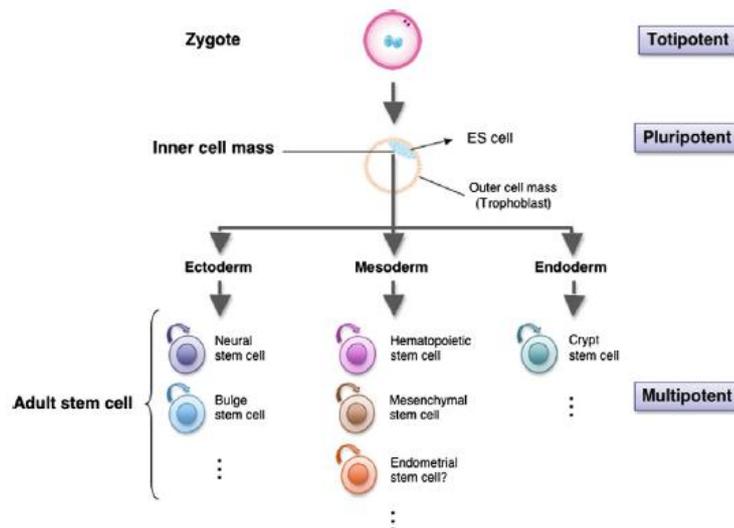


Figura 1.1 – Células Estaminais. Em relação ao potencial de diferenciação, as células estaminais podem ser caracterizadas como totipotentes – um óvulo fertilizado e blastómeros iniciais, capazes de originar qualquer tipo de célula de um órgão ou placenta; pluripotentes – células embrionárias capazes de dar origem a qualquer tipo de célula de um órgão, mas não a placenta; multipotentes- células da ectoderme, endoderme, mesoderme; e unipotentes – células capazes de dar origem a um único tipo de célula de um tecido¹⁸.

Rudolf Virchow e *Julios Conhein*^{19,20} descreveram pela primeira vez a semelhança entre as CSC e as células estaminais. *Virchow* alegou que o cancro surge a partir da activação do estado de quiescência de células em tecido maduro, células essas que são restos de células embrionárias. A sua hipótese sustentava-se pela evidente semelhança entre as células embrionárias e as células cancerígenas do ponto de vista histológico. Todavia, *Conhein* indicou que essas mesmas células se perdiam durante a organogénese, tendo sido apenas possível uma identificação das CSCs em vários tipos de tumores com a evolução das técnicas de biologia molecular, vários anos depois¹⁵.

Foi confirmado, ainda durante a década de 1960 a existência de CSCs, através de experiências pioneiras realizadas em células neoplásicas malignas de doentes. Estas foram transplantadas em outras partes do corpo de animais e curiosamente, muito poucas formaram tumor indicando, por si só, algum tipo de selecção.

Em 1967, *Fialkow et al.* mostraram que algumas células de leucemia apresentavam a proteína glicose 6-fosfato desidrogenase (G-6-PD) na sua superfície membranar e inferiram, através da técnica de citometria de fluxo, que estas células constituíam o principal factor de malignidade. Em 1997, *Bonnet and Dick* descreveram uma subpopulação de células imaturas e que se caracterizavam pela expressão de marcadores específicos, CD34+ e o CD38- em doente com leucemia mieloide aguda. Os estudos feitos por estes autores revelaram que a menor subpopulação de CD34+/CD38- era capaz de iniciar desenvolvimento tumoral, ou seja, possuía características colonogénicas. A descoberta desta razão, CD34+/CD38-, foi a primeira prova, sustentada de que as CSCs existiam em doenças hemapatoieticas malignas e marcou o início de uma extensa busca destas células em tumores sólidos²¹.

A leucemia mieloide aguda foi a primeira patologia deste foro onde surgiram as primeiras evidências da presença de CSCs quando se realizou um transplante de células de leucemia para ratinho e se verificou que uma pequena percentagem formou colónias e induziu leucemia em ratinhos imunodeprimidos¹⁸.

Existem dois modelos que pretendem explicar a existência destas células. O modelo clonal postula que as células tumorais que têm a capacidade de se dividir mais rapidamente são selecionadas e se expandem formando uma população dominante que confere ao tumor alto potencial de regeneração. O segundo modelo defende que as CSCs emergem devido à ocorrência de mutações que lhes conferem um carácter mais agressivo de autorrenovação. Este modelo defende ainda que as CSC são diferentes das células que lhes dão origem e não têm que necessariamente resultar de uma transformação de células estaminais normais mas sim de células diferenciadas que adquirem a capacidade de autorrenovação²².

Alguns estudos feitos nesta área demonstraram que estas células estavam presentes em alguns tumores sólidos. Para se proceder à sua identificação utilizam-se marcadores de superfície membranar de células estaminais que por norma são o CD133, o CD24, o CD44, o THY1 e o ABCB5^{18,15}.

O primeiro tumor sólido maligno em que se identificaram CSCs foi a neoplasia maligna da mama, tendo sido descrita como CD44⁺/CD24⁻. *In vitro* o CD44 já foi identificado no carcinoma do cólon, mama e próstata. Posteriormente, o CD133 foi encontrado como potencial marcador de CSC no carcinoma cólon, ovário, próstata, pâncreas e em diferentes tipos de tumores cerebrais como, por exemplo, o glioblastoma e o meduloblastoma²³.

1.6.1. Evidência da presença de Células Estaminais no Carcinoma do Endométrio

O endométrio é um tecido muito dinâmico que ao longo da vida reprodutiva da mulher sofre mais de 400 ciclos de regeneração, diferenciação e hemorragia. De uma maneira geral, acredita-se que existe uma pequena população de células na camada basal do endométrio que rapidamente se expande e prolifera de modo a regenerar o endométrio. Está comprovado clinicamente que o endométrio pode perfeitamente regenerar-se sozinho e suportar uma gravidez mesmo após algumas intervenções cirúrgicas³.

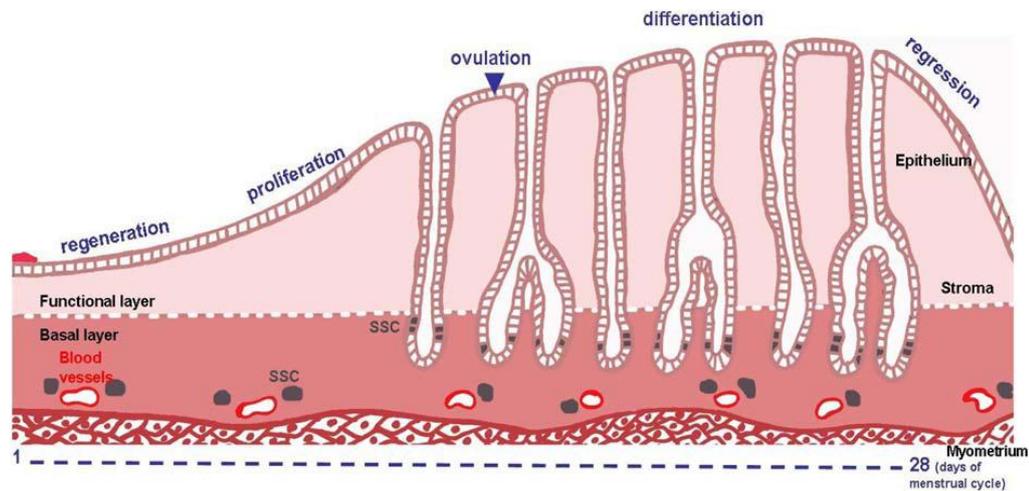


Figura 1.2 – Processos cíclicos do endométrio humano. Regeneração, proliferação, diferenciação e regressão do endométrio ao longo do período de vida fértil da mulher. Estes processos poderão estar relacionados com a presença de células estaminais somáticas em determinadas frações no epitélio e no estroma endometriais²⁴.

Dados recentes levantam a possibilidade desta capacidade altamente regenerativa ter origem em células estaminais. Na verdade, e graças aos avanços tecnológicos foram identificadas células estaminais em vários órgãos, nomeadamente no endométrio. As células identificadas consistiam numa pequena população que tinha a capacidade de formar colónias mesmo quando transplantadas em outros órgãos¹⁸.

O carcinoma do endométrio caracteriza-se por uma proliferação anormal das células epiteliais resultando numa elevada relação epitélio/estroma. Considerou-se, então possível que as células estaminais, identificadas no endométrio normal, ou as células progenitoras possam ser os principais focos de carcinogénese nesse tecido que ao adquirirem mutações genéticas se transformaram em CSCs tornando-se nas principais responsáveis pelo início, manutenção e progressão do carcinoma. A base que suportou esta teoria é a de que os eventos de carcinogénese são adquiridos ao longo de muitos anos, então acredita-se que

apenas as células estaminais/progenitoras têm tempo de vida suficiente para acumular o dano necessário para que se possa iniciar um tumor maligno, transformando-se em CSCs^{18,25}.

A evidência da presença destas células malignas foi já confirmada no adenocarcinoma seroso do ovário, uma outra patologia ginecológica. Neste contexto, é importante determinar se o carcinoma do endométrio é de facto estabelecido e mantido por estas células. Apenas deste modo se podem desenvolver novos fármacos que permitam outras soluções de tratamento mais eficazes. A primeira evidência da presença de CSCs no endométrio foi quando células da linha EMTOKA formaram colónias esféricas em suspensão *in vitro*. Recentemente, foi demonstrado que células de carcinoma do endométrio e mesmo células obtidas de hiperplasia do endométrio tinham a capacidade de formar colónias com uma frequência muito semelhante à já observada no cancro da mama, no retinoblastoma, mieloma e em alguns tumores cerebrais. Como aquelas células não eram diferentes das células epiteliais endometriais normais, foi sugerida, a possível existência de uma pequena população de CSC^{24,25}.

O CD133 é uma glicoproteína que é expressa normalmente nas células estaminais hematopoiéticas que se encontram no sangue, medula óssea e no sangue do cordão umbilical. A sua expressão é actualmente associada a CSC isoladas a partir de células do cancro da próstata, do pulmão, do cérebro e do ovário e de células de leucemia linfoblástica aguda infantil. Foram ainda identificadas células com potencial tumorigénico que expressavam CD133+^{18,25,26}.

O CD133 foi ainda identificado em células epiteliais luminais e glandulares no tecido endometrial normal. É actualmente um dos marcadores de referência de células estaminais do endométrio normal. Estudos comparativos, comprovaram que células do endométrio que expressavam o CD133 tinham características de células estaminais, e que apresentavam entre outras coisas, uma fracção de proliferação muito maior. Verificou-se ainda que as células

CD133+ apresentavam uma maior resistência aos efeitos citotóxicos do paclitaxel e da cisplatina, mas não da doxorubicina, o que pode indicar que este fármaco seja uma boa aposta para o tratamento do cancro do endométrio. Como a forma de cancro do endométrio mais comum é dependente de estrogénios considerou-se prudente averiguar o efeito dos mesmos em células que expressavam o CD133. Verificando-se que a hormona ovárica tem um efeito estimulante, enquanto nas células em que o CD133 não era expresso, o efeito é muito menor. Este facto pode também dever-se a que, em regra geral, a população de células do endométrio que possuem CD133 também tem normalmente uma maior expressão de receptores de estrogénios^{25,26,27}.

Até ao momento em relação à população de células estaminais tumorais do endométrio e em relação à sua identificação por expressão do CD133 apenas se tem especulado. Os estudos feitos, embora não sendo conclusivos, indicam que o CD133 pode ser um importante marcador destas células. A injeção subcutânea de ratinhos NOD/SCID com uma amostra que continha células tumorais de endométrio com e sem CD133 foi tumorigénica e estes tumores tinham uma grande percentagem de CD133 sugerindo que as células com este marcador quando transplantadas têm um maior potencial de sobrevivência. Ainda assim, fazendo-se o mesmo ensaio mas com amostras de células, em que todas expressam ou não CD133 verificou-se que não havia qualquer foco de tumorigénese indicando que embora os tumores tenham na sua constituição células maioritariamente que expressam o CD133, as duas fracções são importantes para a tumorigénese. No que respeita ao grau do tumor não há correlação com a expressão do CD133, havendo apenas relação deste marcador com o subtipo, neste caso o endometrióide. Nesse tipo de patologia alguns estudos apontam que quando o CD133 não é muito expresso o tumor não está em estado muito avançado e que também não há metástases nos gânglios linfáticos^{25, 26}.

A investigação nesta área é sem dúvida promissora, e a identificação do CD133+ e de outros marcadores destas células é essencial para que se possa evoluir ao nível terapêutico,

nomeadamente, em relação à multiresistência aos fármacos usados em quimioterapia convencional, à gravidade do cancro e por exemplo, na metastização.

1.7. Quimioterapia

O principal objectivo da quimioterapia é eliminar as células tumorais. Ao longo dos anos, o tratamento de quimioterapia tem tido várias propostas como por exemplo a combinação de vários fármacos, a imunoterapia e radioterapia.

A maioria dos citostáticos usados em quimioterapia têm um mecanismo de acção que tem como alvo preferencial as células que se dividem muito rapidamente. A alta capacidade proliferativa é uma das características das células tumorais, e é esta característica que torna a quimioterapia uma arma importante no combate ao cancro. Na verdade, o tratamento reduz o número de células cancerosas a um valor mínimo e, em certos casos, pode mesmo resultar no desaparecimento do tumor²⁸

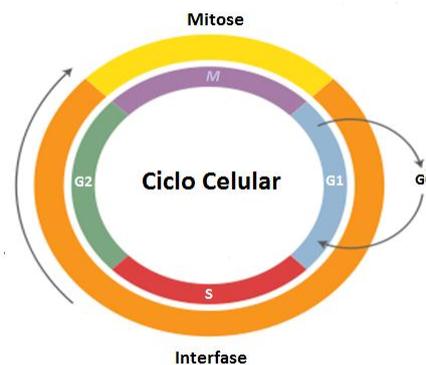


Figura 1.3 – O Ciclo celular é o conjunto de processos pelos quais a célula passa entre duas divisões celulares. Consiste na interfase (I) e na fase mitótica (M), que inclui a mitose e a divisão celular (citocinese)²⁹.

O ciclo celular é um processo que cada célula enfrenta quando tem de se dividir e compreende várias fases: G1, S, G2 e M. As fases G1 e G2, são fases de paragem onde se delibera se o ciclo pode ou não continuar em frente, a fase S é a fase de replicação do DNA, um período de síntese. E por fim, a fase M ou fase Mitótica é a fase que diz respeito à divisão propriamente dita em que uma célula mãe dá origem a duas células filhas, geneticamente iguais³⁰.

1.7.1. Fármacos utilizados na quimioterapia do Cancro do Endométrio

A **cisplatina** foi o primeiro composto derivado do platinum que mostrou ter efeitos anti-tumorais e actualmente é utilizado por rotina na prática clínica. A **carboplatina** faz parte da segunda geração de derivados do platinum e embora menos citotóxica e com menor potencial mutagénico, esta é, a par da cisplatina, amplamente utilizada. Os seus efeitos no carcinoma do ovário, testículo e cabeça e pescoço são de boa resposta anti-neoplásica. Vários estudos foram já efectuados para determinar o mecanismo de acção destes dois fármacos. No entanto, a dúvida sobre se o mecanismo é o mesmo permanece, apesar de se saber que ambas se ligam ao DNA através de processos muito semelhantes. A taxa de resistência a estes fármacos é elevada, ainda assim é menor com a carboplatina^{31,32}.

A **doxorubicina** é um antibiótico antraciclínico isolado a partir de culturas de *Streptomyces peucetius*. As células cancerígenas tratadas com doxorubicina exibem alterações nas suas características morfológicas associadas à apoptose.

Este citotóxico é muitas vezes utilizado para tratar neoplasias como a leucemia, cancro da mama, tumores do ovário, do pulmão, da próstata, do colo do útero, da bexiga e sarcoma de Ewing's^{32,33}.

O **paclitaxel** é um citostático que actua no ciclo celular, impedindo a mitose, estimula a apoptose e aumenta a radiosensibilidade das células. Actualmente é um fármaco muito

utilizado para terapia combinada pois além da sua propriedade de citostático tem ainda outras potencialidades, já referidas, que permitem sensibilizar as células e de algum modo potenciar o efeito, nomeadamente o efeito citotóxico, de outros fármacos^{32,34}.

No que respeita às neoplasias uterinas malignas, a maioria dos doentes apresenta um prognóstico razoável como resposta aos tratamentos de primeira linha, cirurgia e radioterapia, sendo a quimioterapia predominantemente aplicada em estágios de recorrência ou de doença avançada. O uso do tratamento de quimioterapia tem objectivo paliativo e um fundamento de tentar oferecer melhor qualidade de vida, do que propriamente a cura ou o aumento da sobrevivida. Por outro lado, o excesso de toxicidade no organismo também não é algo que se encare como benéfico daí a procura de terapêuticas alternativas³⁵.

A quimioterapia com base em antraciclinas, compostos derivados do *platinum* e taxanos produz respostas em 20% dos doentes que são tratados pela primeira vez. A quimioterapia combinada, em geral produz melhores índices de resposta, destacando-se como a melhor das combinações o uso de doxorubicina com a cisplatina. Outros estudos demonstram ainda que o uso de paclitacel em conjunto com derivados do platinum também têm resultados animadores. Ainda assim, o prognóstico continua a ser pobre, com sobrevivências médias muito baixas quando se fala de recorrência ou patologia metastática^{36, 37}.

A doxorubicina e a cisplatina são os fármacos de quimioterapia mais utilizados com um índice de resposta que ronda os 24 a 28% e 21 a 25% respectivamente. Seguindo-se a epirrubina e a carboplatina que têm o mesmo tipo de actividade que as duas primeiras com índices de resposta a ordem dos 26% e 17 a 33% respectivamente. Outros fármacos que apresentam um índice de resposta que ronda os 20% são a ciclofosfamida, a ifosfamida, topotecan, paclitaxel e o doctaxel. Ainda assim a maioria das respostas são parciais e com um

curto tempo de duração. O paclitaxel é o único que tem índices de resposta de 20% quando já houve tratamento prévio com citostáticos⁵.

No que respeita à terapia combinada, estudos clínicos permitiram detectar um índice de resposta de 34% para a terapia combinada de doxorrubicina e ciclofosfamida. Em relação à combinação entre doxorrubicina e cisplatina, obtiveram-se índices um pouco mais elevados, 42%, percebendo-se que a doxorrubicina actua melhor combinada com estes fármacos que isoladamente. As combinações cisplatina – doxorrubicina e epirrubicina-ciclofosfamida, na presença ou ausência de progesterona, têm sido largamente aplicadas no tratamento de cancro do endométrio quer em estadios avançados, quer em recorrência. Da análise feita entre a intensidade da dose de quimioterapia e a resposta em cancro do endométrio avançado, percebeu-se que a ciclofosfamida é relativamente inactiva quando usada em combinação com outros, e que pode ser omitida⁵.

No contexto do cancro do endométrio, a quimioterapia é quase sempre a última escolha e em muitos casos não é de todo sinónimo de cura quer devido à fraca resposta ao tratamento quer ao estadio da doença, que muitas vezes é já demasiado avançado.

1.8. Multirresistência

O desenvolvimento de multirresistência à quimioterapia foi uma das maiores mudanças no tratamento do cancro. A quimioterapia é um dos tratamentos mais utilizados no cancro, embora usada em doentes já com doença avançada ou até mesmo com metastização. Infelizmente, a multirresistência a este tratamento é algo que atinge já um número significativo de doentes que por o seu tumor não apresentar resposta aos agentes terapêuticos, ficam numa situação ainda mais delicada.

As células podem ter uma resistência inerente ou adquirida. Ainda assim esta resistência pode existir para qualquer tipo de droga e é desencadeada por vários mecanismos, os quais podem actuar individual ou sinergicamente³⁸.

Para além de outros factores como a forma de administração de fármaco, a sua biodistribuição, o metabolismo e a excreção é a membrana celular que constitui o primeiro obstáculo. Os agentes terapêuticos passam por inúmeras reacções, com diferentes moléculas resultando numa complexa biodistribuição. Os compostos em causa entram nas células por difusão facilitada ou por transporte activo, sendo para estes casos de elevada importância a presença de transportadores membranares, normalmente designados como proteínas de influxo, isto porque promovem o influxo de droga para o meio intracelular³⁹.

Por outro lado, este influxo pode ser contrabalançado por uma outra classe de proteínas dependentes de ATP e que têm como função principal o efluxo, isto é, expelir o agente terapêutico do interior para o exterior da célula ou organelo. Dentro dos transportadores de efluxo mais conhecidos, existem os transportadores ABC que não são os únicos, mas são, sem dúvida, os mais estudados na literatura³⁹.

As células multirresistentes têm ainda alterações no metabolismo, nomeadamente o metabolismo lipídico, que induz modificações biofísicas na bicamada provocando consequentemente modificações no influxo dos fármacos^{40,41}.

Sabe-se ainda que a forma como os fármacos são apreendidos no citoplasma também constitui uma das características dos mecanismos de multirresistência. Foram identificadas anomalias na função dos lisossomas, nas proteínas de transporte intracelular e na secreção, por exemplo no caso da cisplatina. Foi demonstrado que a cisplatina após entrar na célula é encapsulada dentro de um lisossoma, passando pelo complexo de Golgi até sofrer efluxo para o exterior da célula⁴².

Muitos dos agentes de quimioterapia têm como mecanismo de acção primordial a danificação do DNA. Muitas vezes, estes têm o seu trabalho dificultado graças aos mecanismos

de reparação que as células possuem, impedindo assim, que a célula entre em estado de senescência e que venha a morrer por apoptose, necrose ou autofagia. A quebra das vias apoptóticas constitui o principal obstáculo ao sucesso da quimioterapia⁴².

A morte celular pode evoluir de várias maneiras, podendo ser apoptótica e não apoptótica. A cascata apoptótica pode ser por sua vez iniciada pela libertação do citocromo c ou pela activação dos receptores de morte em resposta a determinados ligandos. A activação destas vias culmina na activação de proteases cisteínicas, caspases que promovem a apoptose. A resistência à quimioterapia ocorre primeiramente na via mitocondrial regulada pelos genes da família Bcl-2. Alterações nestes genes que estejam directamente envolvidos no mecanismo em causa, ajudam a dificultar a eficácia do tratamento de quimioterapia^{39,42}.

O microambiente que envolve o tumor, para além de influenciar a metastização, propiciando-a, também afecta muitas vezes a resposta do mesmo às terapias aplicadas. Uma vascularização anormal, bem como uma pressão elevada do fluido intersticial, pode impedir a entrada de macromoléculas no tumor, não sendo os fármacos de quimioterapia excepção⁴². Muitos tumores sólidos têm regiões onde os metabolitos e o oxigénio têm muita dificuldade em chegar, como as zonas hipóxicas, que por norma se tornam muito ácidas por causa do excesso da produção de ácido láctico e CO₂. Uma vez alterado o pH do meio muitos agentes tendem a ficar inactivos por não oxidação, que é em muitos casos necessária. Deste modo, entende-se que o microambiente envolvente não só pode desencadear ou propiciar a multiresistência como também amplificar e intensificar a mesma⁴².

A presença de células estaminais tumorais nos vários tipos de cancro está directamente relacionada com a dificuldade de tratamento da doença, uma vez que estas se mostram resistentes ao tratamento convencional. Na verdade, estas células possuem os mecanismos de multiresistência bem expressos. As células estaminais tumorais podem facilmente ser distinguidas das ditas normais com base em marcadores que estas possuem na

sua superfície membranar. Transportadores da família ABC foram já bem caracterizados, quer em células estaminais normais quer nas tumorais, nomeadamente os da subfamília ABCB1 e ABCG2. Para além deste, foi também detectado o ABCA3 em células estaminais tumorais de neuroblastoma juntamente com o ABCG2. Este localiza-se nas membranas dos lisossomas e no retículo endoplasmático, o que sugere que tem um papel importante na forma de apreensão do fármaco e depois no seu efluxo⁴⁰.

No contexto do cancro do endométrio, em que a quimioterapia é um tratamento que é sobretudo paliativo, em que há casos de fraca resposta tumoral a alguns dos fármacos de uso clínico e, em que a presença de células estaminais deixou de ser uma sugestão, sendo agora uma evidência, o estudo destes mecanismos de resistência pode ajudar a desenvolver terapias mais direccionadas que permitam dar mais um passo em frente nesta luta que tende em não ter fim.

II. Objetivos

A existência de populações celulares com propriedades de células estaminais que são resistentes às terapias convencionais, como por exemplo a quimioterapia, tem sido cada vez mais apontada como um entrave à resposta terapêutica de vários tipos de cancro, entre eles, o cancro do endométrio.

Neste projecto utilizou-se a linha celular de adenocarcinoma do endométrio ECC-1 com o objectivo de identificar células com propriedades de células estaminais de modo a contribuir para a sua caracterização molecular nomeadamente, considerando os marcadores CD24, CD44 e CD133.

Constituiu ainda objectivo deste trabalho avaliar a importância destas células na resposta à quimioterapia, assim como avaliar o metabolismo glicolítico tumoral e potencial replicativo das células envolvidas, através de estudos de dose-resposta a fármacos e estudos de captação com ^{18}F -FDG e com ^{18}F -FCHO.

Pretendeu-se ainda estudar o comportamento destas células *in vivo*. Para isso desenvolveu-se um modelo animal ortotópico de cancro do endométrio de modo a avaliar o comportamento diferencial dos tipos celulares originais e das células com propriedades estaminais assim como a expressão tumoral dos marcadores CD24, CD44 e CD133. Utilizou-se ainda um modelo animal heterotópico tendo em vista aferir o potencial tumorigénico das populações estudadas.

III. Material e Métodos

3.1. Cultura de Células

A linha celular utilizada neste trabalho foi a linha celular humana de adenocarcinoma do endométrio obtida na *American Type Culture Collection* (ATCC). A propagação desta linha celular aderente executou-se de acordo com as recomendações do fornecedor. Deste modo as células foram mantidas a 37°C em atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de CO₂ em incubadora *Binder*[®]. Para a manutenção celular utilizou-se o meio de cultura *Rooswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 (Sigma R-4130, EUA) suplementado com 5% de soro bovino fetal (FBS, do inglês, *Fetal Bovine Serum*: Sigma F- 7524, EUA), 400mM de piruvato de sódio (GIBCO 11360, UK) e 1% de antibiótico (GIBCO 15240, UK).

Uma vez que a linha celular utilizada é mantida em condições aderentes, para a realização dos estudos foi necessário destacar as células dos frascos e preparar suspensões celulares. Para isso, descarta-se o meio e lava-se a cultura celular com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Saline*) e incuba-se com 2ml de uma solução tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco 25200, UK), durante aproximadamente 15 minutos a 37°C, para que ocorra a separação celular. De seguida, para inactivar a tripsina, adicionam-se 6ml de meio de cultura com FBS, de modo a obter suspensões celulares.

3.1.1 Viabilidade Celular

Antes da realização de qualquer experiência é crucial verificar-se a viabilidade celular tendo em vista o objectivo do estudo. O método utilizado para a determinação da viabilidade celular foi o método de exclusão do azul tripano que se baseia na entrada do azul tripano nas células que possuem a membrana celular destruída corando-as de azul. Assim, as células inviáveis aparecem a azul e as viáveis mantêm-se brancas ou brilhantes. A contagem das

células realiza-se utilizando a câmara de *Neubauer* e o microscópio invertido (Nikon, Eclipse TS 100) com ampliação de 100x.

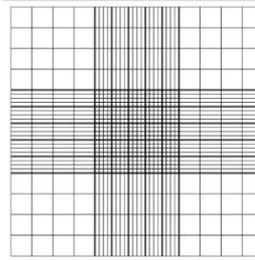


Figura 3.1 – Esquema representativo dos quatro campos do hemocitómetro (câmara de Neubauer) utilizados na determinação da viabilidade celular⁴³.

Volumes iguais de suspensão celular e de solução de azul de tripano 0,02% em PBS foram homogeneizados e transferidos para o hemocitómetro. Ao microscópio, as células foram contadas nos quatro quadrantes dos cantos do hemocitómetro. A percentagem de células viáveis é determinada pela fórmula:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{células vivas}}{\text{células vivas} + \text{células mortas}} \times 100$$

3.2. Protocolo de formação de Esferas

O ensaio de formação de esferas, colónias de células esféricas em suspensão, foi realizado com ligeiras modificações ao descrito por Ponti (2005)⁴⁴. A linha celular ECC-1 foi cultivada em condições não aderentes em frascos de cultura de baixa aderência (TC-flasche, Sarstedt, E.U.A.) revestidos com poli-hema (Sigma, P3932, EUA) em meio de cultura DMEM-F12 (D8900, Sigma, E.U.A.) sem FBS durante 8 dias sendo suplementadas de dois em dois dias com 10ng/ml de factor de crescimento fibroblástico básico (bFGF, do inglês *basic Fibroblast Growth Factor*; Sigma, F0291, E.U.A.) e 10ng/ml de factor de crescimento endotelial (EGF, do

inglês *Endothelial Growth Factor*; E9644, Sigma, EUA). As esferas obtidas após este tratamento foram designadas por ECC-1-ES1.

Após este procedimento as ECC-1-ES1 obtidas foram lavadas com PBS e cultivadas em condições de cultura *standard*, como descrito anteriormente, no meio de cultura recomendado para cada linha celular, suplementado com 5% de FBS. Quando as culturas atingiram 85 a 90% de confluência as células foram submetidas novamente ao protocolo de formação de esferas de forma a obter ECC-1-ES2. O procedimento foi repetido de modo a obter ECC-1-ES3. Também estas culturas foram transferidas para condições de cultura *standard* tendo sido designadas por ECC-1-G3. As culturas celulares G3 obtidas foram usadas para estudos subsequentes por um máximo de 10 passagens.

3.3. Quantificação da densidade de esferas

Para conhecer o rendimento de formação de esferas de geração para geração procedeu-se à quantificação das mesmas. Deste modo, prepararam-se suspensões celulares de 5×10^5 células por ml de ECC-1, ECC-1-G1 e ECC-1-G2 as quais se plaquearam em placas de 6 poços (Costar, 3548, E.U.A.). Submeteram-se essas células ao protocolo de formação de esferas, descrito no ponto 2, originando as linhas celulares ECC-1-ES1, ECC1-ES2 e ECC1-ES3, respectivamente. No final do protocolo fotografaram-se as esferas no microscópio Motic AE31 através do sistema Motic Images Advanced 3.2, com a ampliação de 40x, em 15 campos por poço. As imagens foram posteriormente analisadas recorrendo à ferramenta informática *ImageJ*, nas quais se delinearão as áreas de interesse em cada imagem, obtendo-se assim uma área total em pixels que corresponderá à nossa região de interesse, a qual foi comparada entre as diferentes gerações.

3.4. Tempo de duplicação celular

O tempo de duplicação de uma linha celular é muito variável e é um dado importante quando o foco de estudo são células oncológicas, em que uma das principais características é a elevada velocidade de replicação. Através do tempo de duplicação (do inglês *Doubling Time*) podem comparar-se agressividades tumorais, bem como diferentes taxas de proliferação entre diferentes linhas em diferentes condições. Para a determinação do tempo de duplicação celular prepararam-se suspensões com 5×10^5 células por ml e plaquearam-se em frascos de 25cm^3 . Após 48 horas procede-se à contagem do número total de células que existe no mesmo frasco e através da fórmula:

$$\text{Tempo de duplicação} = \text{Tempo de Incubação} \times \left[\ln(2) / \ln \left(\frac{\text{número de células final}}{\text{número de células inicial}} \right) \right]$$

Calculou-se o tempo de duplicação em horas.

3.5. Análise fenotípica por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar células ou outras partículas biológicas microscópicas suspensas em meio líquido. Este método permite analisar simultaneamente, e num curto período de tempo, múltiplas características físicas e químicas de células em suspensão através de um aparelho de detecção óptico-electrónico. Neste aparelho, um feixe de luz de um único comprimento de onda é direccionado para o meio líquido em fluxo. Vários detectores são apontados ao local onde o fluxo passa através do feixe de luz; um na linha do feixe de luz (FSC, do inglês *Forward Scatter*) e vários perpendiculares a este (SSC, do inglês *Side Scatter*), além de um ou mais detectores fluorescentes. Cada partícula suspensa que passa através do feixe dispersa a luz de uma forma específica e os corantes químicos fluorescentes encontrados na partícula ou a ela ligados

podem ser excitados emitindo luz de menor frequência (ou maior comprimento de onda) do que o da fonte de luz. Esta combinação de luz dispersa e fluorescente é melhorada pelos detectores e, por análise das flutuações de brilho de cada detector (uma para cada pico de emissão fluorescente), é possível explorar vários tipos de informação sobre a estrutura física e bioquímica de cada partícula individual. O FSC correlaciona-se com o volume celular e o SSC depende da complexidade da partícula (por exemplo a forma do núcleo, a quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e a rugosidade da membrana).

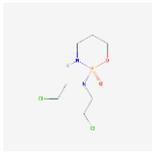
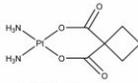
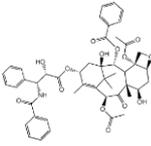
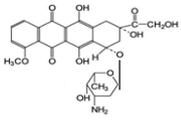
Esta técnica foi utilizada para avaliar a expressão dos marcadores moleculares de superfície nomeadamente o CD24, o CD44, e o CD133 na linha celular ECC-1 assim como nas esferas obtidas, designadas por ECC-1-ES1 e ECC-1-ES3, e nas culturas aderentes a partir das esferas, ECC-1-G1 e ECC-1-G3. Para a marcação utilizaram-se cerca de 10^6 células de cada cultura celular. As células foram lavadas com PBS, com centrifugação a 1500rpm e suspensas em 100 μ L do mesmo tampão. Posteriormente adicionaram-se os anticorpos de acordo com as recomendações do fabricante: 2,5 μ l de anti-CD24 marcado com ficoeritrina-cianino 5.1 (PC5; Beckman Coulter PNIM2645, EUA), 1 μ l de anti-CD44 marcado com *pacific blue* (PB; Biolergend, 103020, EUA) e 10 μ l de CD133 marcado com aloficocianina (APC; Mitenyl Biotec 293C3-APC, EUA) e incubou-se durante 10 minutos no escuro. Posteriormente, foi efectuada a análise em citómetro FACS-Canto II (BD, San José, C.A., E.U.A.) com o *software* FACSDiva (BD, San José, C.A., E.U.A.). Os resultados foram analisados com o Software Infinicyt 1.5 (Cytogonos, Espanha) de acordo com as suas médias de intensidade de fluorescência (MIF).

3.6. Estudos de Citotoxicidade

Para avaliar os efeitos dos citostáticos utilizados na quimioterapia na linha celular de adenocarcinoma do endométrio, incubou-se a cultura celular com diferentes concentrações dos fármacos carboplatina, doxorrubicina, ciclofosfamida e paclitaxel.

Os fármacos utilizados em todos os estudos foram amavelmente cedidos pela Farmácia Hospitalar do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra - Hospitais da Universidade de Coimbra.

Tabela 3.1 – Fármacos utilizados nos estudos de citotoxicidade.

	Ciclofosfamida	Carboplatina	Paclitaxel	Doxorrubicina
Nome Comercial	Endoxan Baxter	Carboplatina Teva	Paclitaxel Actavis	Doxorrubicina Accord
Princípio Activo	Ciclofosfamida	Carboplatina	Taxol	Cloridrato de doxorrubicina
Fórmula Química	$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$	$C_6H_{14}N_2O_4P$	$C_{47}H_{51}NO_{14}$	$C_{27}H_{29}NO_{11}$
Estrutura Química				
Formulação/ Concentração	Pó para perfusão 2 g	Solução injectável 10 mg/ml	6 mg/ml	Solução injectável 2 mg/ml
Massa Molecular	261,8 g/mol	373,25 g/mol	853,83 g/mol	543,46 g/mol

3.6.1. Avaliação da proliferação celular pelo ensaio do MTT

Para avaliar o efeito dos fármacos doxorrubicina, paclitaxel, ciclofosfamida e carboplatina na proliferação das culturas celulares foi realizado o ensaio do MTT (*3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)2,5-diphenyltetrazolium bromide*). Este composto é reduzido por células metabolicamente activas devido à acção das enzimas desidrogenases, principalmente através

da acção do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, a succinato desidrogenase ou succinato-coenzima Q redutase. As desidrogenases têm a capacidade de clivar os anéis de tetrazólio do MTT e formar cristais de formazan de cor azul escura que podem ser posteriormente solubilizados e quantificados por meios espectrofotométricos. Assim, este método constitui uma forma de avaliar a proliferação celular a partir da actividade mitocondrial. Desta forma, a quantidade de cristais de formazan obtidos é directamente proporcional à quantidade de células viáveis.

Prepararam-se suspensões celulares das linhas celulares ECC-1 e ECC-1-G3 com 4×10^5 células/ml que se distribuíram equitativamente em placas de 48 poços (Costar, 3548, E.U.A.). As células foram incubadas durante a noite de forma a permitir a sua adesão. Posteriormente, os fármacos foram administrados com diferentes concentrações de forma a obter as curvas dose-resposta: carboplatina entre $1 \mu\text{M}$ e $500 \mu\text{M}$, paclitaxel entre 50pM e $40 \mu\text{M}$, ciclofosfamida 500nM e $7,7 \text{mM}$ e doxorubicina entre 50pM e $37 \mu\text{M}$. No caso da linha celular ECC-1-G3 apenas se avaliou a citotoxicidade com a doxorubicina. A avaliação foi realizada após 24, 48 e 72 horas de incubação. Foram realizados controlos em todos os ensaios.

Para a avaliação da proliferação celular o meio das culturas celulares foi aspirado e procedeu-se a uma lavagem com PBS. Posteriormente, em cada poço, colocaram-se $100 \mu\text{l}$ de uma solução de MTT ($0,5 \text{mg}/\mu\text{l}$; Sigma M2128) em PBS, pH 7,4, e incubou-se no escuro a 37°C durante cerca de 1 hora e meia. Para permitir a solubilização dos cristais de formazan acrescentou-se a cada poço $100 \mu\text{l}$ de uma solução $0,04 \text{M}$ de ácido clorídrico em isopropanol e deixaram-se as placas em agitação durante 10 minutos.

O conteúdo das placas foi transferido para placas de 96 poços (Sarstedt, E.U.A.), e a absorvância a 570nm e a 620nm foi avaliada usando o espectrofotómetro ELISA (Biotek® *Synergy HT*). Para a avaliação da citotoxicidade foi usada a diferença entre a absorvância a 570nm e a absorvância a 620nm . Os resultados foram expressos como a percentagem de inibição

nas culturas submetidas ao tratamento correlacionadas com as culturas controlo. Este procedimento permitiu estabelecer curvas de dose-resposta e determinar a concentração dos fármacos que inibe a proliferação das culturas em 50% (IC50). Os resultados obtidos foram analisados e processados no programa OriginPro 8.0.

3.6.2. Avaliação da proliferação celular pelo *AlamarBlue*

Para avaliar o efeito dos fármacos na proliferação de células tumorais com características estaminais, ECC-1-ES3 obtidas pelo protocolo de formação de esferas, foi realizado o ensaio *AlamarBlue*[®]. A formação de esferas ocorre em cultura em suspensão, sendo essa a razão de se usar este ensaio. Neste ensaio é usada a resazurina que é um corante indicador de reacções de oxidação-redução da actividade metabólica celular. A conversão da forma oxidada para a forma reduzida é acompanhada pela alteração da cor da azul para o rosa e pode ser quantificada por espectrofotometria.

Para isso as esferas foram gentilmente separadas com recurso a uma solução de tryple de modo a obter uma suspensão celular com aproximadamente 4×10^5 células/ml, que se distribuiu equitativamente em placas de 48 poços (Costar, 3548, E.U.A.). O fármaco administrado a estas células foi a doxorubicina em concentrações que variaram entre 50pM e 37µM. A avaliação foi realizada após 24 48 e 72 horas de incubação. Foram realizados controlos em todos os ensaios.

Para a avaliação da proliferação celular foi adicionado a cada poço o reagente *AlamarBlue*[®] de modo a obter uma concentração de 10% e incubou-se no escuro a 37°C até se verificar uma alteração significativa da cor do corante.

O conteúdo das placas foi transferido para placas de 96 poços (Sarstedt, E.U.A.), e a absorvância foi quantificada a 570nm e a 600nm. Este procedimento permitiu estabelecer curvas de dose-resposta e determinar a concentração dos fármacos que inibe a proliferação

das culturas em 50% (IC50). Os resultados obtidos foram analisados e processados no programa OriginPro 8.0.

3.6.3. Avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi também utilizada para avaliar o efeito da doxorrubicina ao nível da viabilidade celular. Recorreu-se à marcação Anexina-V (An-V; FITC Annexin V Apoptosis Detection kit I, BD Pharmingen, E.U.A.). A An-V permite identificar as células que se encontram em apoptose, pois esta proteína liga-se especificamente à fosfatidilserina, um fosfolípido da bicamada lipídica que, nas células em apoptose, se desloca do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. Desta forma, podemos inferir que as células que marcam anexina estão em morte por apoptose.

A avaliação foi realizada na linha celular ECC-1 e ECC-1-G3, tratadas com a concentração de 300nM de doxorrubicina. Para a marcação com Anexina utilizaram-se suspensões celulares com 10^6 células. As células foram lavadas com PBS, centrifugadas a 473G durante 5 minutos e, posteriormente, suspensas em 100 μ l de tampão de ligação, ao qual se adicionou 2,5 μ L An-V-FITC (ligada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína). Após incubação durante 15 minutos, no escuro, foi efectuada a análise em citómetro FACS-Canto II (BD, San José, C.A., E.U.A.) com o *software* FACSDiva (BD, San José, C.A., E.U.A.). Os resultados foram analisados com o Software Infinicyt 1.5 (Cytogonos, Espanha).

3.7. Estudos de Captação

O análogo da glicose ^{18}F -FDG (^{18}F -Fluorodesoxiglicose) é um radiofármaco usado em Tomografia por Emissão de Positrões (PET do inglês Positron emission tomography), uma metodologia de imagem molecular não invasiva capaz de traduzir in vivo os processos bioquímicos e fisiológicos dos tecidos normais e patológicos. O ^{18}F -FDG entra nas células normais e malignas através dos transportadores de glicose (GLUT) utilizando para tal os mesmos mecanismos de transporte da glucose. Fica retido intracelularmente devido à sua inexistência de isomerase do ciclo glicolítico após ser fosforilado pela hexocinase, é acumulado na célula sob a forma ^{18}F -FDG-6-fosfato. A maior taxa de glicólise nas células tumorais aumenta a captação de ^{18}F -FDG relativamente às células normais, sendo este o motivo pelo qual este radiofármaco é largamente usado em oncologia⁴⁶.

A colina quando entra nas células é fosforilada permanecendo no seu interior e sendo utilizada na síntese de fosfolípidos na forma, por exemplo de fosfatidilcolina o fosfolípido mais comum da membrana plasmática. Estudos feitos têm vindo a demonstrar que as células malignas têm elevados níveis de colina e uma regulação positiva na actividade da colinacina. Este resultado vai de encontro ao facto de a célula tumoral ter um índice de proliferação alterado. A utilização do ^{18}F -FCHO em PET tem sido crescente, sendo a sua justificação de utilização a proliferação celular aumentada da célula oncológica⁴⁷.

Neste trabalho, o ^{18}F -FDG e o ^{18}F -FCHO foram utilizados para a avaliação da sua captação pelas células ECC-1, ECC-1-ES3, de modo a estabelecer possíveis diferenças de captação.

Para a realização dos estudos de captação foi necessário preparar uma suspensão celular com 2×10^6 células. Estas suspensões foram deixadas a repousar em incubadora regulada para 95% de O_2 e 5% de CO_2 a 37°C durante 60 minutos em frascos de cultura de 25cm^2 de modo a permitir recuperação do possível stresse induzido pela acção da tripsina.

Posteriormente, foi adicionado o radiofármaco numa actividade igual a 0,925MBq/ml. Desde os primeiro 5 minutos após a adição do radiofármaco e ao longo de 120 minutos seguintes, foram retiradas alíquotas de 200µl da suspensão celular para microtubos de eppendorf® que continham PBS gelado, de modo a reduzir o metabolismo celular. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000rpm durante 60 segundos (Costar Mini Centrifuge, E.U.A.) para se poder separar o pellet e o sobrenadante, tendo o último sido recolhido para um tubo de RIA (Sarstedt 86.1509, Alemanha) devidamente identificado. Seguiu-se de uma lavagem do pellet com 500µl de PBS gelado, repetindo-se o procedimento de separação do sobrenadante para obter a completa rentabilização do mesmo. Os sobrenadantes, resultantes das centrifugações, foram recolhidos para os tubos de RIA os pellets permaneceram nos respectivos microtubos de eppendorf® devidamente identificados. Com este procedimento foi possível calcular a captação do ¹⁸F-FDG e ¹⁸F-FCHO para cada tempo pela contagem de ambas as fracções (pellets e sobrenadantes) no calibrador de dose (Capintec Inc., Modelo CRC – 15W) em contagens por minuto (CPM). A percentagem de captação do radiofármaco em questão, foi calculada utilizando a equação:

$$\%Capt\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o} = \frac{CPM_{pellet}}{CPM_{pellet} + CPM_{sobrenadante}} \times 100$$

3.7.1. Estudos de Captação recorrendo ao *LigandTracer*

Tendo em vista aferir os resultados dos estudos de captação obtidos pela metodologia anterior, uma vez que as células da linha celular ECC-1 aderem com muita facilidade ao frasco de cultura, realizaram-se estudos de captação recorrendo a um equipamento tecnológico, o *LigandTracer*.

O *LigandTracer* é um instrumento de tecnologia avançada que visa detectar a interação de moléculas com determinadas proteínas que existem nas células. Isto é tornado possível através da inclusão de uma área activa (local onde as células são plaqueadas) e um na região de referência *situ*, na placa. A placa é então colocada sobre um suporte inclinado. A radioactividade que marca a molécula de interesse é adicionada ao meio de cultura que por acção da gravidade se encontra na parte mais inferior da placa. Em cada rotação as células entram em contacto com o meio de cultura onde se encontra o radiofármaco. O detector encontra-se na parte superior, colimada, para ler apenas a parte da placa que esta livre de líquido e onde se encontram as células, tendo em vista quantificar a captação que as células fazem do radiofármaco a cada rotação.



Figura 3.2 – Equipamento *LigandTracer*, utilizado para a realização de estudos de captação.

Para a realização deste estudo foram utilizadas as células das linhas celulares ECC-1 e ECC-1-G3 que foram plaqueadas em placas de Petri, com tempo suficiente para que possam aderir, numa concentração de 1 milhão de células em 2 ml. Aquando do início do estudo foi adicionado ao meio actividade (^{18}F -FDG/ ^{18}F -FCHO) numa concentração de $25\mu\text{Ci/ml}$ decorrendo o estudo sem interrupção durante 120 minutos.

O processamento dos dados foi feito recorrendo ao programa *TraceDrawer*. Para a análise dos resultados foi ainda necessário proceder-se a uma calibração, que consistiu em

colocar 50 μ Ci de radiofármaco num algodão e adquirir dados durante 30 minutos. Com os valores dessa calibração pode-se fazer uma normalização dos resultados obtidos com as células o que permitiu obter-se a percentagem de captação.

3.8. Western Blot

A proteína p53 é uma proteína citoplasmática de 53kDa que se sabe estar ausente ou alterada em inúmeros tumores. A sua função está relacionada com a integridade do genoma, podendo influenciar a progressão do ciclo celular ou induzir apoptose quando ocorrem danos no processo replicativo. Nas células estaminais tumorais foi referida a expressão constitutiva da proteína p53 não sendo alterada mesmo na presença de danos oxidativos⁴⁸.

Para verificar a expressão da proteína p53 nas diferentes linhas celulares recorreu-se à técnica de *Western Blot*, que permite detectar proteínas específicas numa determinada amostra de homogeneizado de tecido ou extracto celular.

Esta técnica separa as proteínas da amostra por electroforese em gel, que pode ser feita através do seu ponto isoeléctrico, peso molecular, carga eléctrica ou uma combinação destes factores. Quando uma diferença de potencial é aplicada ao longo do gel, as proteínas migram ao longo deste a diferentes velocidades. As proteínas de menores dimensões migram mais rápido através do gel, apresentando-se desta forma no fundo do gel, enquanto as proteínas de dimensões maiores migram mais lentamente ficando no topo do gel. As proteínas são então transferidas para uma membrana de nitrocelulose ou difluoreto de polivinilideno (PVDF), onde são analisadas e detectadas, utilizando anticorpos específicos para a proteína alvo. O *Western Blot* raramente apresenta falsos positivos.

Foram preparados extractos celulares das células ECC-1, ECC-1-G3, ECC-1-ES3 e também de ECC-1 e ECC-1-G3 incubadas com doxorubicina com a concentração de 300nM durante 24, 48 e 72 horas.

Para a obtenção dos extractos totais de proteína, as células foram cultivadas até obter culturas com 80 a 90% de confluência. Aquando da obtenção desta condição, descartou-se o meio celular dos frascos de cultura e lavou-se gentilmente com PBS por três vezes. Adicionaram-se 500µl de solução RIPA (tampão de radioimunoprecipitação) suplementado com *Complete Mini (Complete, Mini, EASYpack, 30 Tab, Roche, Canadá)*, ao frasco de cultura. Com a ajuda de um raspador soltaram-se as células da superfície do frasco e colocou-se o conteúdo num microtubo *eppendorf*[®]. Após agitação em vórtex, as amostras foram submetidas a sonicação com uma amplitude de 15 durante três vezes durante 15 segundos cada. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 14000G (4°C) e os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos *eppendorf*[®] que foram guardados a -80°C.

Para a determinação da proteína usou-se o método de BCA (*BCATM protein assay kit [Pierce]*). As amostras foram descongelada e homogeneizadas por vórtex e desnaturadas a 95°C durante 5 minutos, após solubilização em solução desnaturante (Tris 100mM, glicina 100mM, SDS 4%, ureia 8mM, azul bromofenol 0,01%).

Para a realização da electroforese polimerizaram-se géis de 10% de acrilamida que foram colocados no sistema de corrida com tampão apropriado (Tris 25mM, 192mM glicerin e SDS 0,1%) e procedeu-se à disposição das amostras e do padrão de pesos moleculares (*Precision PlusStandards, Dual Color, Bio-Rad*[®], EUA). Depois de terminada a corrida (potencial constante de 150V), os géis foram colocados em contacto directo com membranas de PVDF (membrana de fluoreto de polivinilideno; Bio-Rad, EUA) previamente activadas em metanol. O sistema de transferência foi preparado e a reacção ocorreu a um potencial de 100V, em tampão CAPS 100mM, de pH 11 (*N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid*) (Sigma). Terminada a transferência, as membranas foram imediatamente bloqueadas com solução de TBST-BSA 4% (*Tris-Buffered Saline Tween-20*), à temperatura ambiente. Cerca de 1 hora depois, incubaram-se as membranas, durante a noite, a 4°C sob agitação constante, com os

anticorpos primários. No dia seguinte, efectuaram-se lavagens, com TBS-T e incubaram-se as membranas com o anticorpo secundário apropriado, sob agitação constante e à temperatura ambiente, durante cerca de 1 hora. Depois deste período de tempo, as lavagens foram repetidas, como mencionado anteriormente. As membranas foram, depois, incubadas com substrato enzimático (*ECF Western Blotting Reagent Pack*, Amersham Biosciences, Reino Unido) durante aproximadamente 2 minutos e reveladas por leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000, Suécia).

3.9. Estudos *in Vivo*

3.9.1. Modelo heterotópico do endométrio

Para estes estudos foram usados ratinhos fêmea *Balb/c nu nu* com 6-8 semanas de vida, com um peso de cerca 18-22g. Esta espécie foi fornecida por *Charles River Laboratories* sendo que as condições de alojamento dos animais ocorreram de acordo com a legislação em vigor na União Europeia e foram aprovados pela Comissão de Ética da FMUC.

Esta estirpe foi escolhida tendo em conta que estes animais permitem o desenvolvimento de xenotransplantes uma vez que são animais atímicos e, portanto, deficientes em células T. Os xenotransplantes foram obtidos através de injeção de 10×10^6 células na região dorsal direita das linhas celulares ECC-1 e ECC-1-G3.

A escolha desta zona, resultou de várias particularidades da mesma, que se traduzem em vantagens para o desenvolvimento dos xenotransplantes sendo uma boa área para expansão, por apresentar boa vascularização, permite o desenvolvimento rápido do xenotransplante e é uma zona na qual a monitorização é bastante simples e acessível.

Após a administração das células tumorais no dorso, os ratinhos foram monitorizados regularmente tendo sido medido o tumor à medida que ia crescendo. O volume tumoral foi avaliado de acordo com a seguinte expressão:

$$V = \frac{L \times S^2}{2}$$

com L correspondendo ao diâmetro maior do tumor e S ao diâmetro menor.

Estes animais foram sacrificados entre 30 e 32 dias após a injeção das células e os seus tumores foram retirados afim de se fazer estudos histológicos e citométricos.

3.9.2. Modelo Ortotópico de Endométrio

Para o desenvolvimento do modelo ortotópico de cancro do endométrio foram utilizados ratos RNU, uma estirpe caracterizada pela sua deficiência em células T, o que lhe confere imunossupressão. Esta característica é fundamental no desenvolvimento tumores humanos em animais, já que possibilita a implantação de células tumorais humanas como é o caso das ECC1 (ATCC) utilizadas neste trabalho.

Assim, para o desenvolvimento do modelo foram utilizados ratos fêmea com cerca de 8-10 semanas com um peso médio de 200g. Para o procedimento os animais foram anestesiados com uma solução de ketamina (100mg/Kg) e clorpromazina (5mg/Kg) previamente preparada juntando 10ml de ketamina (Ketalar®, Espanha) e 3ml de clorpromazina (Largactil®, Espanha), administrado no dorso, por via subcutânea.

Após anestesia os animais foram colocados em decúbito dorsal para que fosse possível a realização de uma incisão de cerca de 2 cm na parte inferior do abdómen de modo a abordar a região pélvica. Com a incisão foi possível localizar os órgão genitais, nomeadamente a trompa e ovário esquerdo e útero. Desta forma, e após identificação de todas as estruturas anatómicas, foi possível a inoculação intrauterina das células previamente preparadas e

contadas como descrito no ponto 3.1.1. A inoculação foi efectuada recorrendo a uma agulha 25G.

Alguns dos animais utilizados para o desenvolvimento deste modelo foram laqueados na zona inferior do útero para evitar a extravasão das células inoculadas para a vagina. Após a conclusão do procedimento a incisão foi fechada com pontos simples e os animais foram mantidos a temperatura constante até recuperarem da anestesia. Todos os animais foram monitorizados periodicamente tendo sido avaliado o seu peso.

Os animais foram ainda avaliados por laparotomia tendo em vista averiguar a existência de tumor.

3.9.2.1. Estudos Imagiológicos – ^{99m}Tc -MIBI

Cerca de 8 semanas após a injeção das células de acordo com o modelo ortotópico, descrito no tópico 10.2, foram realizadas imagens com o radiofármaco ^{99m}Tc -MIBI (^{99m}Tc -Metoxisobutilisonitrilo) tendo em vista avaliar a presença de tumor e/ou, metástases.

A medicina nuclear, através da administração de radiofármacos com diferentes afinidades bioquímicas, permite a avaliação de diferentes vias metabólicas *in vivo*. Associadamente, como as concentrações molares usadas são muito baixas, da ordem dos 10^{-9} a 10^{-12} M, não se verificam efeitos farmacológicos, pelo que a informação obtida é sobre o estado fisiológico do órgão-alvo.

O MIBI, derivado dos isonitrilos, está comercialmente disponível, o 2-metoxibutilisonitrilo (Cardiolite®, Bristol-Myers and Squibb). Esta formulação farmacêutica foi marcada com ^{99m}Tc , formando-se o complexo ^{99m}Tc -MIBI. Este traçador é um catião monovalente e lipofílico cuja captação é realizada por difusão passiva, assim como pela diferença de potencial eléctrico através da membrana mitocondrial. Tendo por base estes mecanismos, a sua

captação é maior nos tecidos ou órgãos ricos em mitocôndrias, pelo que está indicado para a detecção de patologia proliferativa, nomeadamente oncológica.

Após a anestesia e imediatamente após a injeção de 25,9 a 37 MBq ^{99m}Tc -MIBI na veia dorsal da cauda iniciou-se a aquisição dinâmica utilizando a câmara-gama (GE MILENIUM). Esta aquisição dinâmica foi realizada para matriz de 128x128 pixels, com um zoom de 2, durante 10 minutos, 30 segundos cada *frame*.

Seguidamente, adquiriram-se imagens estáticas para matrizes de 256x256 elementos de resolução, com duração individual de 2 minutos, e igualmente com *zoom* 2, aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração do ^{99m}Tc -MIBI. As imagens então adquiridas foram transferidas para uma estação de trabalho XELERIS, onde foram analisadas.

3.10. Estudos *ex vivo*

Os animais foram avaliados ao longo do tempo sacrificados dependente do tipo de modelo tumoral. No que respeita ao modelo heterotópico esta deliberação foi feita com base no tamanho do tumor, tendo-se definido um limite 15mm³. No caso do modelo ortotópico a decisão foi tomada de acordo a existência ou não de alterações nas regiões de interesse, a zona pélvia, tendo os animais sido monitorizados quer por imagem quer por laparotomia, conforme descrito no ponto 10.2.

Os tumores excisados tanto do modelo heterotópico como do modelo ortotópico foram separados para a realização de estudos de citometria de fluxo e análise por morfologia histológica noutra parte, tendo esta sido colocada em solução de formalina a 10%

3.10.1. Análise Fenotípica dos tumores por Citometria de Fluxo

A análise fenotípica das células do tumor por citometria de fluxo requer que se faça um tratamento prévio ao tumor depois de ser excisado. Após a excisão, o tumor foi fragmentado e colocado numa solução com colagenase IV (Gibco 17104-019) em tampão HEPES (5mg/mL) a 37°C, e submetido a agitação suave durante 10 minutos para ocorrer a sua desagregação. O homogeneizado obtido foi filtrado através de um filtro de 70µm, centrifugado à temperatura de 19°C e retirado o sobrenadante. Posteriormente, o *pellet* obtido foi ressuspenso em 5mL de meio de cultura.

A marcação das células provenientes do processamento do tumor é igual à já descrita no ponto 5. Procedeu-se ainda à marcação destas células com An-V, recorrendo ao procedimento descrito no ponto 6.3, tendo em vista aferir a viabilidade da amostra. Os tumores avaliados foram os resultantes do modelo ortotópico e heretópico das duas linhas celulares testadas, ECC-1 e ECC-1-G3.

3.11. Análise Estatística

Para aumentar o rigor da interpretação dos resultados obtidos através dos procedimentos anteriormente descritos, fez-se a análise estatística dos mesmos. Para tal, utilizou-se uma aplicação de tratamento estatístico de dados, o IBM SPSS® (Statistical Package for Social Sciences), versão 19.

Na análise descritiva foram determinadas medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio padrão e amplitude inter-quartil) para as variáveis quantitativas.

A normalidade da distribuição destas variáveis foi avaliada com recurso ao teste de Shapiro-Wilk. No caso de normalidade das distribuições subjacentes foram utilizados testes

paramétricos para realizar comparações. No caso oposto foram utilizados testes não paramétricos. A comparação de variáveis quantitativas entre dois grupos foi realizada com recurso aos testes t-student (paramétrico) e de Mann-Whitney (não paramétrico). A comparação de variáveis quantitativas em mais de dois grupos foi obtida com recurso ao teste ANOVA de um factor, com análise post-hoc utilizando o teste de Tuckey (testes paramétricos) e ao teste de Kruskal-Wallis, com comparações múltiplas realizadas com recurso ao teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni.

Foi considerado um nível de significância de 5% ($p=0,05$).

IV. Resultados¹

¹ Os resultados aqui apresentados foram obtidos em co-autoria com a Mestre Maria João Carvalho.

4.1. Protocolo de formação de esferas

Como resultado da realização do protocolo de formação de esferas, ao longo de três gerações foi possível obter as esferas ECC-1-ES1, ECC-1-ES2 e ECC-1-ES3. Quando estas colónias esféricas em suspensão foram colocadas em condições de cultura celular aderente obtiveram-se as linhas celulares ECC-1-G1, ECC-1-G2 e ECC-1-G3, respectivamente. Na Figura 4.1 apresentam-se imagens de algumas das gerações da cultura.

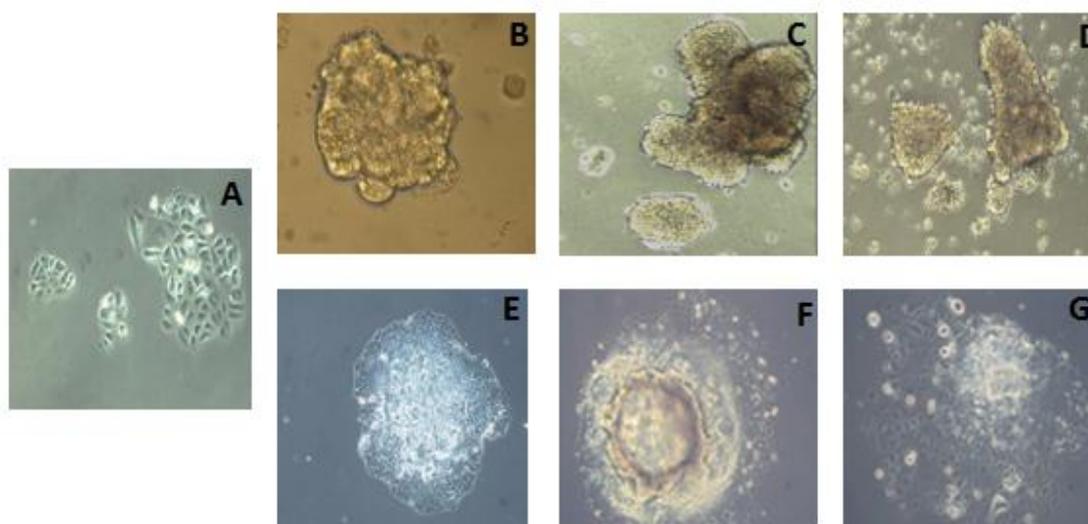


Figura 4.1 – Imagens de culturas celulares obtidas após realização do protocolo de formação de esferas. (A) ECC-1 ampliação 40 x; (B) ECC-1-ES1 ampliação 40x; (C) ECC-1-ES2 ampliação 40x; (D) ECC-1-ES3 ampliação 40x; (E) ECC-1-G1 ampliação 40x; (F) ECC-1-G2; (G) ECC-1-G3.

4.2. Densidade de esferas

A quantificação da densidade de esferas obtidas nas diferentes gerações fez-se por área de *pixels* no campo óptico. Na figura 4.2 estão apresentados os resultados da densidade média de esferas das várias gerações. Para as ECC-1-ES1 a área média foi de 846417 ± 33652 *pixels*, para as ECC-1-ES2 foi de 634127 ± 20851 *pixels* e para as ECC-1-ES3 foi de 393519 ± 15025 *pixels*.

pixels, considerando a média de 15 campos ópticos com ampliação de 40x por poço. Verificou-se portanto que com o aumento das gerações há uma tendência para a diminuição da área total contabilizada por poço. A análise estatística comprovou a existência de diferenças significativas no caso das populações ECC-1-ES1 e ECC-1-ES3, com um valor de $p=0,006$.

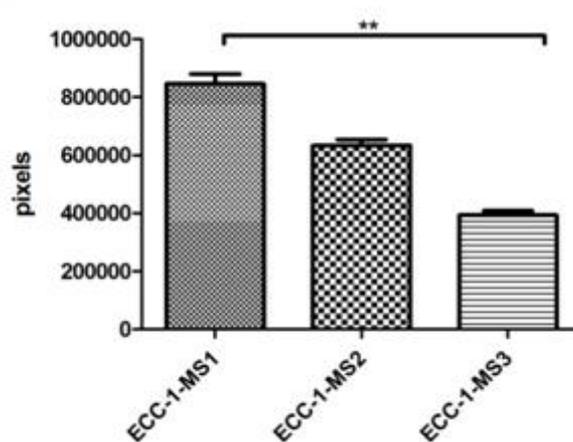


Figura 4.2 – Densidade de esferas ao longo das três gerações. Os resultados expressam a média e o erro padrão de três experiências independentes realizadas em duplicado ($n=6$). As diferenças significativas estão assinaladas com *. Considerou-se um nível de significância de 0,05, sendo * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

4.3. Tempo de duplicação celular

O tempo de duplicação celular verificou-se ser semelhante para as linhas ECC-1 e ECC-1-G3 sendo de aproximadamente 30 e 32 horas, respectivamente, não havendo entre eles diferença estatística.

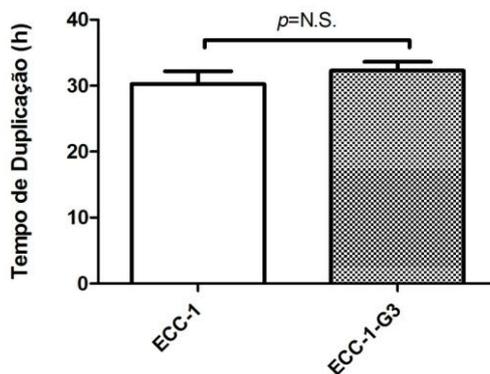


Figura 4.3 – Tempo de duplicação celular das linhas celulares ECC-1 e ECC-1-G3, expresso em horas. Os resultados expressam a média de nove experiências independentes e erro padrão associado (n=9).

4.4. Análise fenotípica por citometria de fluxo

Os marcadores moleculares de superfície CD24, CD44 e CD133 têm sido descritos como marcadores de *stem cells* de vários tipos de tumores e por esse motivo foi avaliada a sua expressão. Nas figuras 4.4, 4.5 e 4.6 é possível verificar os resultados desta análise que estão expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF).

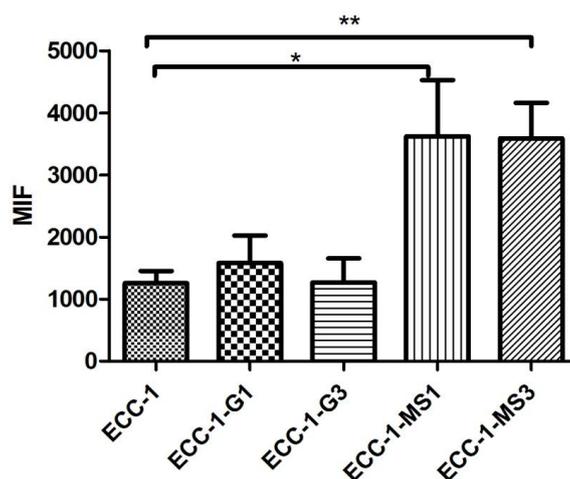


Figura 4.4 – Expressão do marcador molecular de superfície CD24 nas populações celulares ECC-1(n=13), ECC-1-G1(n=3), ECC-1-G3(n=5), ECC-1-ES1(n=8) e ECC-1-ES3(n=10). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas em relação à linha celular original ECC-1 e estão assinaladas com *. Considerou-se um nível de significância de 0,05, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. As comparações múltiplas foram realizadas entre as condições e a linha celular ECC-1. Os resultados representam a média pelo menos três experiências independentes.

A análise do marcador CD24, como se pode verificar na figura 4.4, mostrou a existência de diferenças na sua expressão para as várias populações analisadas ($p=0,048$). Assim, verificou-se um aumento de expressão nas populações de esferas ECC-1-ES1 (MIF 3625 ± 900) e ECC-1-ES3 (3588 ± 572) em relação à linha celular ECC-1 (1583 ± 440) com significado estatístico, ES1: $p=0,015$ e ES3: $p=0,003$. No entanto, para populações celulares ECC-1-G1 (1583 ± 440) e ECC-1-G3 (1267 ± 391), de fenótipo aderente, não se verificaram diferenças em relação à linha celular que lhes deu origem.

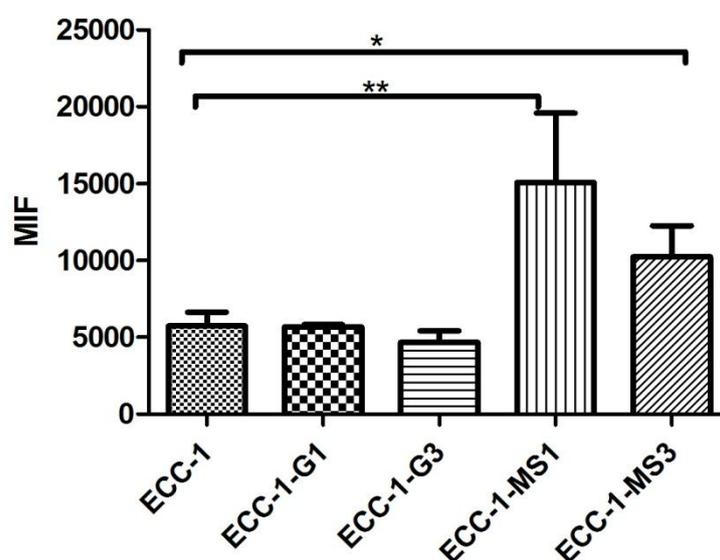


Figura 4.5 – Expressão do marcador molecular de superfície CD44 nas populações celulares ECC-1(n=13), ECC-1-G1(n=3), ECC-1-G3(n=5), ECC-1-ES1(n=8) e ECC-1-ES3(n=10). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas em relação ao controlo e estão assinaladas com *. Considerou-se um nível de significância de 0,05, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. As comparações múltiplas foram realizadas entre as condições e a linha celular ECC-1. Os resultados representam a média pelo menos 3 experiências independentes.

A expressão do marcador CD44 corresponde às seguintes MIF: para ECC-1 5744 ± 900 , para ECC-1-G1 5682 ± 139 , para ECC-1-G3 4685 ± 736 , para as ECC-1-ES1 15069 ± 4525 e para as ECC-1-ES3 10230 ± 2032 . Também para este marcador se verificou um aumento de expressão nas populações de esferas, quer para ES1 ($p=0,008$), quer para ES3 ($p=0,028$).

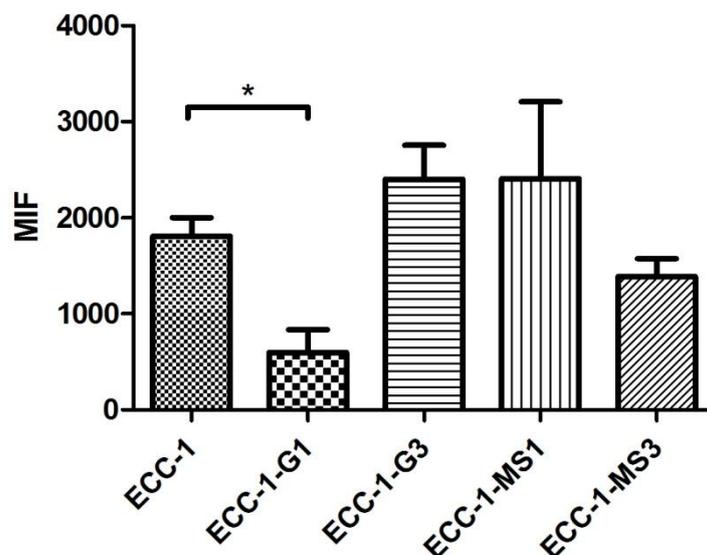


Figura 4.6 – Expressão do marcador molecular de superfície CD133 nas populações celulares ECC-1(n=13), ECC-1-G1(n=3), ECC-1-G3(n=5), ECC-1-ES1(n=8) e ECC-1-ES3(n=10). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas em relação ao controlo e estão assinaladas com *. Considerou-se um nível de significância de 0,05, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. As comparações múltiplas foram realizadas entre as condições e a linha celular ECC-1. Os resultados representam a média pelo menos 3 experiências independentes

O marcador CD133 apresenta para as populações celulares ECC-1 uma MIF de 1808 ± 194 , para as ECC-1-G1 de 599 ± 237 , para as ECC-1-G3 de 2401 ± 355 , para as ECC-1-ES1 de 2407 ± 802 e para as ECC-1-ES3 de 1389 ± 186 . Para este marcador molecular de superfície também se verificaram diferenças entre as populações ($p=0,013$), no entanto, ao contrário de CD24 e CD44, as alterações verificaram-se apenas para a população ECC-1-G1 ($p=0,043$).

4.5. Estudos de citotoxicidade

4.5.1. Avaliação da proliferação celular pelo ensaio do MTT

A linha celular ECC-1 não revelou resposta anti-proliferativa à ciclofosfamida para os vários tempos de incubação (24, 48 e 72 horas), sendo o seu IC50 superior à concentração máxima estudada, $7,6 \mu\text{M}$, como se pode verificar no gráfico da figura 4.7.

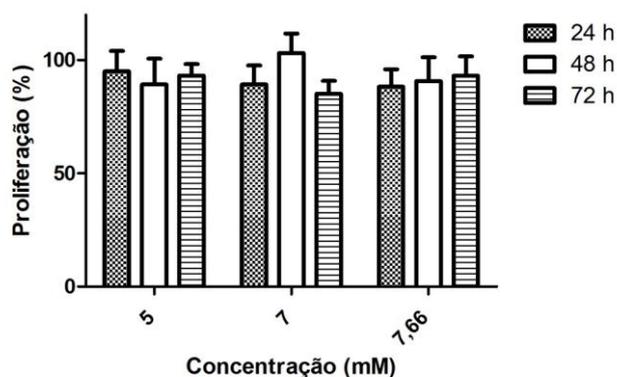


Figura 4.7 – Percentagem de proliferação para as 3 máximas concentrações testadas (5; 7 e 7,66 mM) para as 24, 48 e 72 horas de incubação com ciclofosfamida. Os resultados expressam a média de 5 experiências independentes e respectivo erro padrão (n=5).

No que respeita à carboplatina verificou-se que há uma resposta dependente do tempo tendo-se determinado o IC50 para as 72h, que corresponde a 365 μ M. Para os outros tempos de incubação, 24 e 48 horas, não foi possível atingir o IC50 uma vez que este se encontra acima da máxima concentração estudada (500 μ M) para ambos os casos. Na figura 4.8 apresentam-se os gráficos que correspondem às curvas de dose-resposta das ECC-1 à carboplatina.

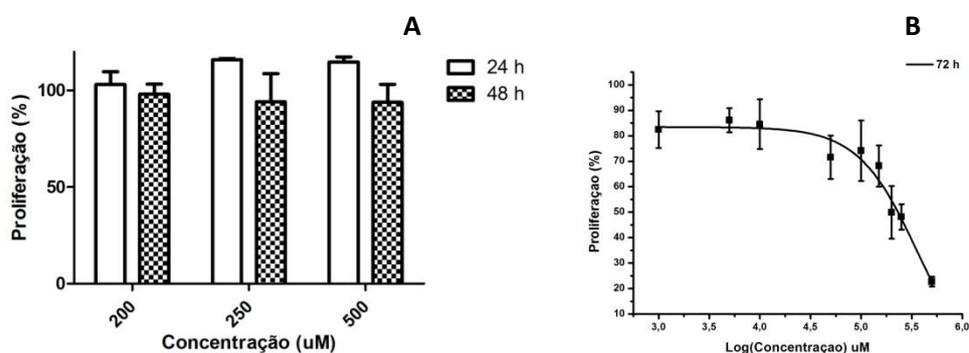


Figura 4.8 – (A) Percentagem de proliferação para as três máximas concentrações testadas (200; 250 e 500 μ M) para as 24, 48 horas de incubação com carboplatina. (B) Curva de dose resposta para a incubação de 72 horas com carboplatina. Os resultados expressam a média de no mínimo três experiências independentes realizadas em duplicado e erro padrão correspondente(n=6).

Estabeleceram-se curvas de dose-resposta para o paclitaxel, tendo-se determinado o IC50 para as 24 horas, 1,2 μ M, e para as 48 horas, 2,14 nM. Para este fármaco verificou-se uma resposta dependente do tempo e concentrações testadas. Para as 72 horas de incubação não foi possível a determinação do IC50 pois este corresponde a uma concentração inferior à mínima testada, 0,05 nM. A análise estatística realizada revelou a existência de diferenças significativas entre os valores dos IC50 das 24 e 48 horas ($p=0,0009$).

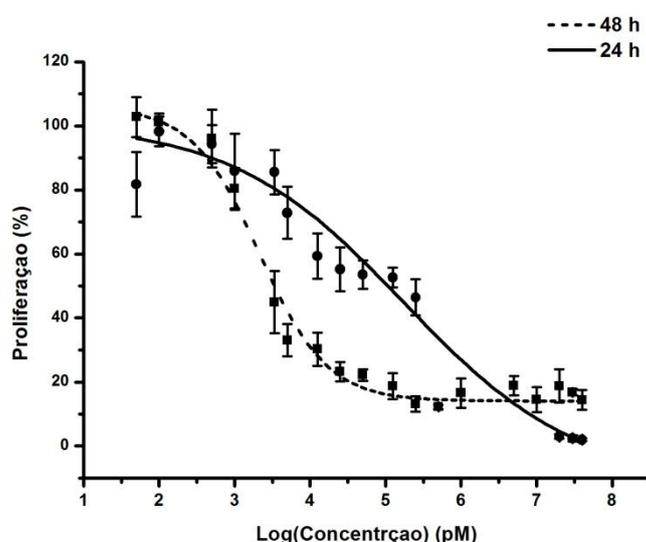


Figura 4.9 – Curvas de dose resposta da linha celular ECC-1 após de 24 e 48 horas de incubação com paclitaxel/taxol. A análise estatística pelo teste Anova revelou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as duas curvas, cujo valor de $p=0,0009$, considerando-se um nível de significância de 0,05. Os resultados expressam a média de no mínimo quatro experiências independentes e erro padrão($n=4$).

A doxorubicina foi testada nas populações celulares ECC-1 e ECC-1-G3. As ECC-1 apresentaram IC50 de 7,3 μ M, 287 nM e 47 nM para as 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Em relação às ECC-1-G3 os IC50 determinados para a doxorubicina foram 3,38 μ M, 995 nM e 51 nM, para as 24, 48 e 72 horas.

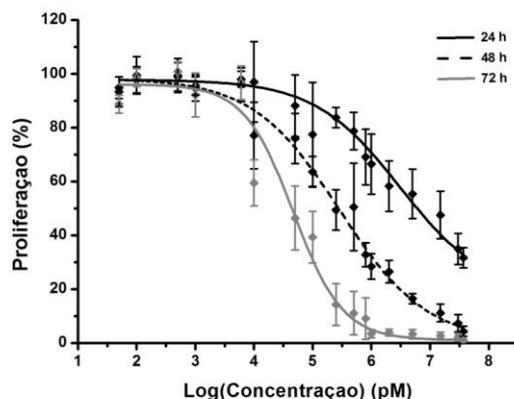


Figura 4.10 – Curvas de dose resposta da linha celular ECC-1 após de 24, 48 e 72 horas de incubação com doxorubicina. Os resultados expressam a média de no mínimo 8 experiências independentes realizadas em duplicado e respectivo erro padrão (n=16).

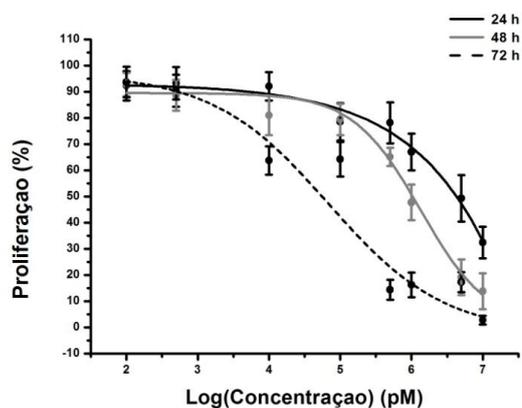


Figura 4.11 – Curvas de dose resposta da população ECC-1-G3 após de 24, 48 e 72 horas de incubação com doxorubicina. Os resultados expressam a média de no mínimo 8 experiências independentes realizadas em duplicado e respectivo erro padrão(n=16).

A análise estatística realizada indicou diferenças significativas entre os vários tempos de incubação para cada condição, verificando-se a existência de uma resposta dependente do tempo e concentração para este fármaco. A significância estatística para cada comparação está representada na tabela 4.1.

No que respeita à comparação entre o mesmo tempo de incubação para as duas populações celulares, ECC-1 e ECC-1-G3, a análise estatística revelou diferenças significativas para os tempos 24 e 48 horas, cujos valores de $s\tilde{a}$ o, respectivamente, 0,02 e $> 0,00001$, indicando maior sensibilidade por parte da linha celular ECC-1 a este tratamento.

Tabela 4.1 – Valores de p para a análise estatística (teste Anova) efectuada entre os diferentes tempos de incubação para as linhas celulares ECC-1 e ECC-1-G3.

Tempo	ECC-1	ECC-1-G3
24 e 48 h	0,0001	$1,04 \times 10^{-10}$
24 e 72 h	0,0002	$3,76 \times 10^{-10}$
48 e 72 h	0,002	$3,65 \times 10^{-8}$

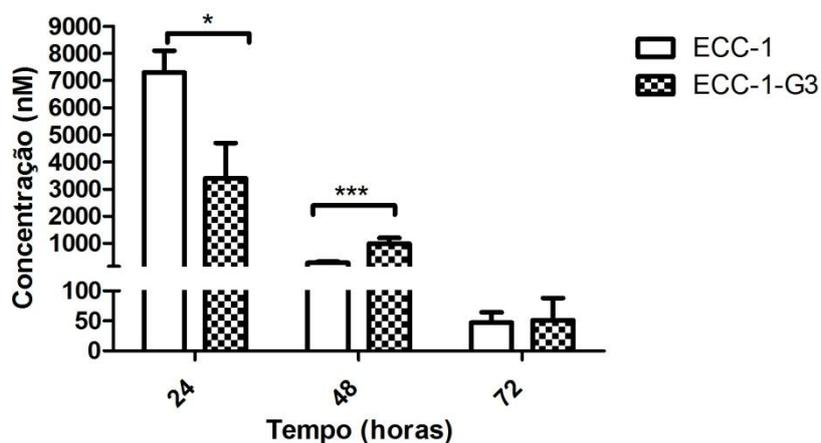


Figura 4.12 – IC50 para os diferentes tempo de incubação (24, 48 e 72 horas) com doxorrubicina para as linhas celulares ECC-1 e ECC-1-G3. Considerou-se um nível de significância de 0,05, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Os resultados expressam uma média de no mínimo 8 experiências independentes realizadas em duplicado e respectivo erro padrão (n=16).

Tabela 2.2 – IC50 de Ciclofosfamida, carboplatina, paclitaxel/taxol após 24, 48 e 72 horas de incubação na linha celular ECC-1 e IC50 de Doxorrubicina após 24, 48 e 72 horas de incubação nas linhas celulares ECC-1 e ECC-1-G3.

Linha celular	Tempo de Incubação	Ciclofosfamida (μM)	Carboplatina (μM)	Paclitaxel/Taxol (nM)	Intervalo de confiança (nM)	Doxorrubicina (nM)	Intervalo de confiança (nM)
ECC-1	24 h	$\ll 7,6$	$\ll 500$	1200 $R^2=0,97$	[913 ; 1400]	7300 $R^2=0,99$	[6500 ; 8100]
	48 h	$\ll 7,6$	$\ll 500$	2,14 $R^2=0,98$	[3,1 ; 1,5]	287,4 $R^2=0,99$	[246 ; 336]
	72 h	$\ll 7,6$	365 $R^2=0,97$	$\gg 0,05$	-	46,8 $R^2=0,99$	[34 ; 64]
ECC-1-G3	24 h	-	-	-	-	3400 $R^2=0,92$	[2700 ; 4700]
	48 h	-	-	-	-	995,3 $R^2=0,92$	[783 ; 1200]
	72 h	-	-	-	-	50,7 $R^2=0,94$	[29 ; 81]

4.5.2. Avaliação da proliferação celular pelo ensaio do Alamar Blue

O ensaio do *AlamarBlue*[®] foi realizado nas esferas ECC-1-ES3 após incubação com o fármaco doxorrubicina. Os IC50 determinados então para este fármaco foram 2,3 μ M, 509,9 nM e 434,7 nM para as 24, 48 e 72 horas respectivamente. A análise estatística realizada revelou a existência de diferenças significativas para os tempos 24 e 72 horas ($p=0,007$).

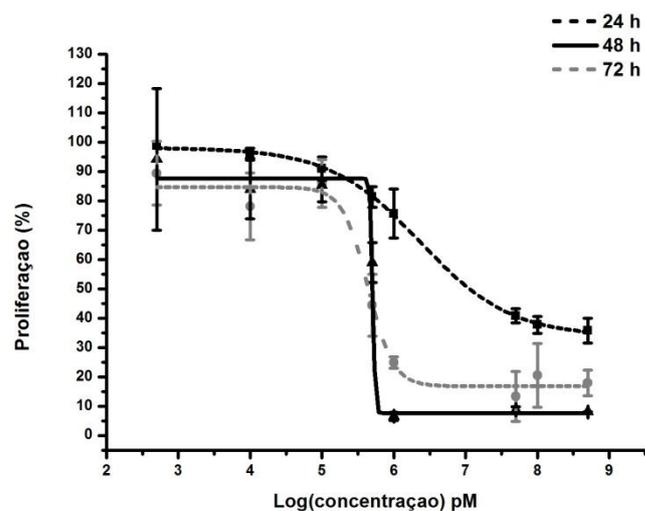


Figura 4.13 – Curvas de dose resposta para a população celular ECC-1-ES3 para a incubação de 24, 48 e 72 horas com Doxorrubicina. Os resultados expressam a média de no mínimo duas experiências independentes e respectivo erro padrão ($n=2$).

Tabela 4.3 – IC50 de doxorrubicina após 24, 48 e 72 horas de incubação na população celular ECC-1-ES3.

Linha celular	Tempo de Incubação	Doxorrubicina
ECC-1-ES3	24 h	2,3 μ M $R^2=0,99$
	48 h	509,9 nM $R^2=0,97$
	72 h	434 nM $R^2=0,99$

4.5.3. Avaliação da viabilidade por citometria de fluxo

A avaliação da viabilidade celular foi realizada nas populações celulares ECC-1 e ECC-1-G3 em diferentes tempos de incubação, uma vez mais 24, 48 e 72 horas. As figuras 4.14 e 4.15 mostram os resultados para esta análise preliminar.

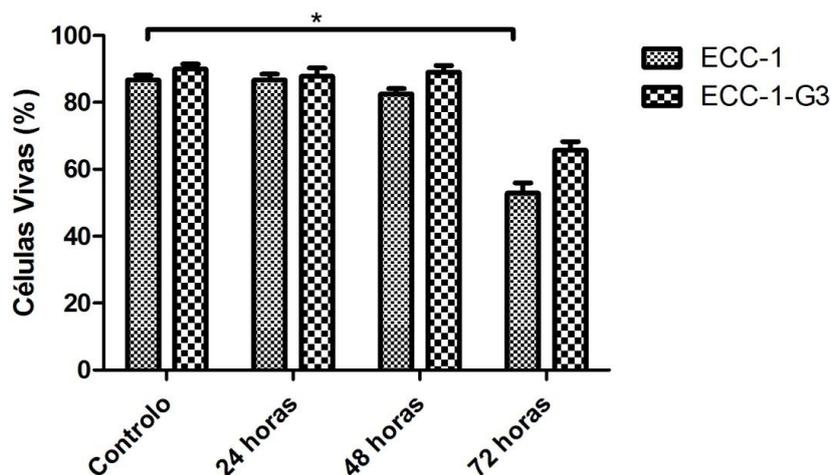


Figura 4.14 – Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo com a marcação de anexina das populações celulares ECC-1 ECC-1-G3 após 24, 48 e 72 horas de incubação com 300 nM de Doxorubicina. Neste gráfico comparam-se as células vivas e portanto anexina negativas.

Os resultados expressam a média de no mínimo 3 experiências independentes e respectivo erro padrão ($n=3$ para as duas populações). Considerou-se um nível de significância de 0,05, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A figura 4.14 apresenta os resultados da viabilidade celular para os diferentes tempos de incubação e para as populações celulares ECC-1 e ECC-1-G3. Conforme se pode verificar na mesma figura a viabilidade é sempre acima dos 80% nas duas linhas celulares, com exceção das 72 horas de incubação, em que há um decréscimo notório, sendo maior na linha celular ECC-1.

A análise estatística revelou a não existência de diferenças significativas entre as células vivas para os diferentes tempos de incubação nas duas populações celulares avaliadas.

No que respeita à linha celular ECC-1, verificou-se que existem diferenças significativas entre o controlo e as 72 horas de incubação ($p=0,029$). Em relação à população celular ECC-1-G3 não foram identificadas diferenças significativas.

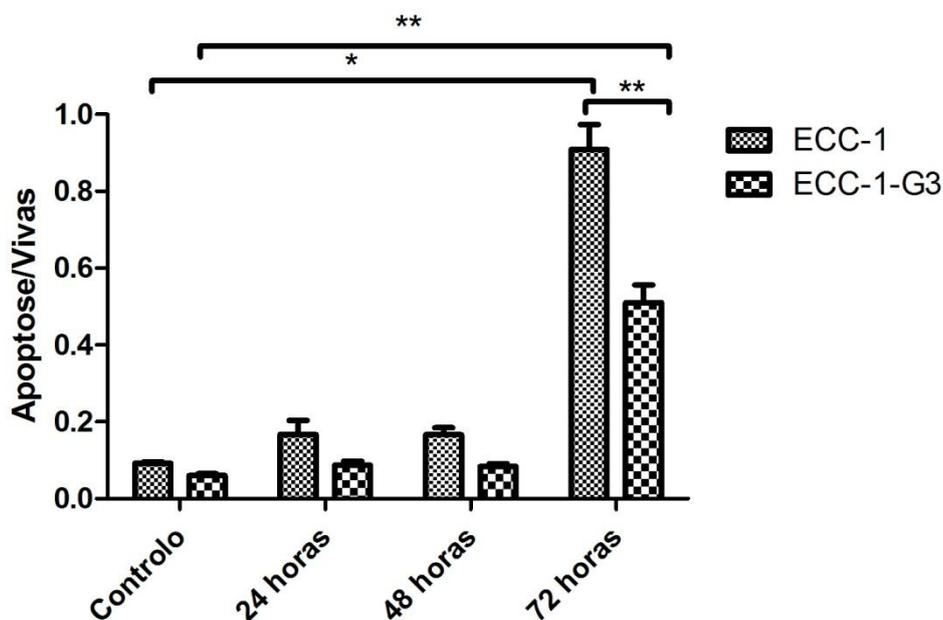


Figura 4.15 – Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo com a marcação de Anexina das populações celulares ECC-1 e ECC-1-G3 após 24, 48 e 72 horas de incubação com 300 nM de doxorubicina. Neste gráfico comparam-se as razões células em apoptose/ células vivas para cada linha celular. Os resultados expressam a média de no mínimo 3 experiências independentes e respectivo erro padrão ($n=3$ para as duas populações). Considerou-se um nível de significância de 0,05, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A figura 4.15 apresenta os resultados da morte por apoptose de cada população celular em relação à totalidade de células vivas para cada tempo considerado. Pode verificar-se que há um aumento da relação entre células em apoptose/células vivas ao longo do tempo em ambas as populações celulares estudadas, sendo esse aumento notório às 72 horas.

A análise estatística realizada revelou diferenças significativas entre as duas populações celulares apenas para as 72 horas de incubação ($p=0,004$) em que a razão células em apoptose/células vivas é de $0,9 \pm 0,07$ para as ECC-1 e de $0,5 \pm 0,04$ para as ECC-1-G3, indicando que para este tempo de incubação a linha celular ECC-1 é mais sensível. Verificaram-se, ainda, diferenças significativas entre as ECC-1 e o controlo às 72 horas de incubação ($p=0,026$) e entre as ECC-1-G3 e o controlo também para as 72 horas de incubação ($p=0,01$), revelando a dependência do tempo no efeito deste fármaco para as duas populações.

4.6. Estudos de captação

Com a utilização do radiofármaco ^{18}F -FDG, um análogo da glucose usado em estudos de medicina nuclear, conseguem-se identificar células tumorais pela maior captação de radiofármaco do que as células normais. Em relação à ^{18}F -FCHO, é um radiofármaco cada vez mais utilizado para evidenciar proliferação celular e, conseqüentemente, um potencial bom traçador para oncologia. O estudo foi realizado nas linhas celulares ECC-1 e ECC-1-G3.

Comparando os perfis de captação das células ECC-1 para os radiofármacos ^{18}F -FDG e ^{18}F -FCHO pode dizer-se que a captação de ^{18}F -FCHO é muito mais acentuada. A captação de ^{18}F -FDG é praticamente sempre constante e de aproximadamente 0,5%. No que respeita ao ^{18}F -FCHO, a curva de captação é crescente ao longo do tempo, tendo-se registado um valor máximo de captação para o tempo máximo estudado, os 120 minutos de 4%, como pode ser confirmado pela análise da figura 4.16.

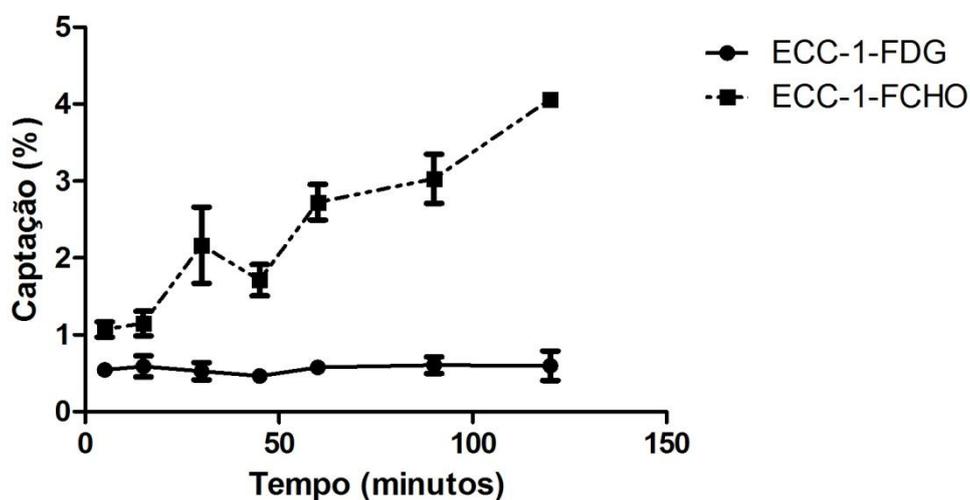


Figura 4.16 – Curvas do estudo comparativo da percentagem de captação de ^{18}F -FDG e de ^{18}F -FCHO na linha celular ECC-1. Os resultados expressam a média de no mínimo três experiências independentes e respectivo erro padrão (n=6 para ^{18}F -FDG e n=3 para ^{18}F -FCHO).

Foram ainda realizados estudos de captação de ^{18}F -FDG com as esferas, ECC-1-ES3. As curvas de captação podem ser observadas na figura 4.17. Os resultados revelam um perfil idêntico de captação para as ECC-1 e ECC-1-ES3, sendo também constante e igualmente baixo de aproximadamente 1%.

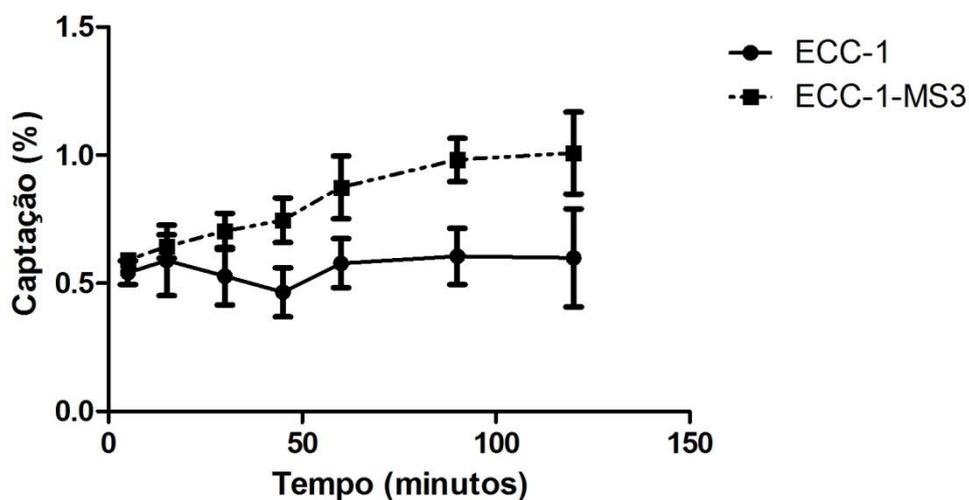


Figura 4.17 – Curvas do estudo comparativo da percentagem de captação de ^{18}F -FDG das populações celulares ECC-1 e ECC-1 ES3. Os resultados expressam a média de no mínimo 3 experiências independentes e respectivo erro padrão (n=6 para as duas populações).

4.7. Estudos de captação recorrendo do *LigandTracer*

Comparando os perfis de captação de ^{18}F -FDG da linha celular ECC-1 com a população celular ECC-1-G3 verifica-se que a captação é ligeiramente superior nas ECC-1 em relação às ECC-1-G3. Ainda assim as diferenças não se apresentam significativas, sendo as captações aproximadamente constantes com o valor médio de 1,2% na linha celular ECC-1 e 1,04% na população celular ECC-1-G3. Os resultados estatísticos relevaram a não existência de diferenças significativas para os diferentes tempos de captação analisados.

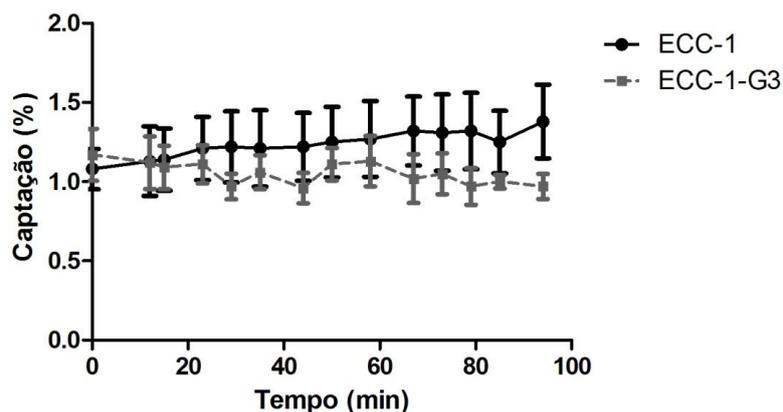


Figura 4.18 – Curvas do estudo comparativo da percentagem de capturação de ^{18}F -FDG das populações celulares ECC-1 e ECC-1 G3 efectuado no equipamento *LigandTracer*. Os resultados expressam a média de 4quatro experiências independentes e erro padrão associado (n=4).

Relativamente aos estudos feitos com o ^{18}F -FCHO a capturação deste radiofármaco pelas populações ECC-1 e ECC-1-G3 é crescente e sendo sempre superior nas ECC-1-G3. Podendo observar-se no gráfico da figura 4.19 que o máximo de capturação na população celular ECC-1-G3 é de 11,07% enquanto que na linha ECC-1 é de $5,93\pm 2,51$. Não foi possível realizar análise estatística entre as curvas de capturação destes dois fármacos uma vez que para a população celular ECC-1-G3 apenas foi possível realizar uma experiência.

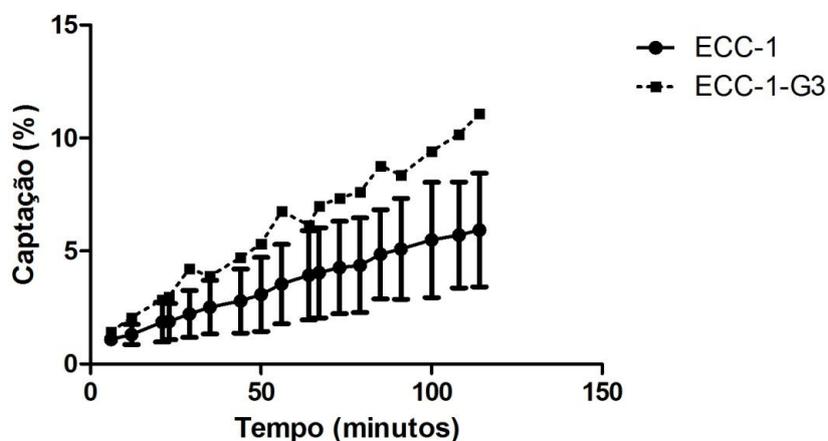


Figura 4.19 – Curvas do estudo comparativo da percentagem de capturação de ^{18}F -FCHO das populações celulares ECC-1 (n=2) e ECC-1 G3 (n=1) efectuado no equipamento *LigandTracer*. Os resultados apresentam uma média de duas experiências independentes para as ECC-1) e respectivo erro padrão.

Para a linha ECC-1 a análise estatística permitiu comparar a velocidade de captação, isto é, os declives das curvas de captação obtidas para os diferentes radiofármacos. Verificou-se a captação significativamente superior para o ^{18}F -FCHO, pelo teste de Anova cujo valor de p é de 0,00002.

4.8. Western

A avaliação da expressão da proteína p53 foi feita para as populações celulares ECC-1, ECC-1-ES3 e ECC-1-G3. Verificou-se uma maior expressão de p53 para a população celular ECC-1-G3, que quando comparada com o controlo (linha celular ECC-1) apresentava uma razão média de $2,36 \pm 0,7$. Por outro lado, a população celular ECC-1-ES3 apresenta uma expressão certa de 2 vezes inferior ao controlo apresentando como valor para a razão média de comparação $0,54 \pm 0,26$, como se pode observar na figura 4.20.

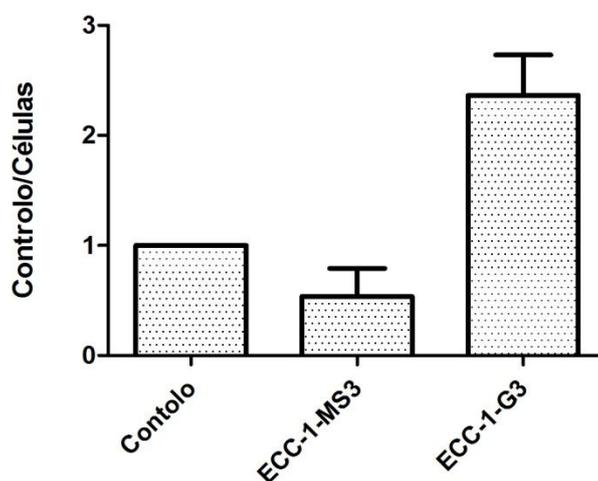


Figura 4.20 – Razão entre a expressão da proteína p53 para o controlo e cada condição (ECC-1-ES3 e ECC-1-G3). Os resultados resultam da média de no mínimo 3 experiências independentes e respectivo erro padrão.

Foi, ainda, estudada a expressão desta proteína nas populações celulares ECC-1 e ECC-1-G3 quando incubadas com doxorubicina. Como se pode verificar na figura 4.21 A expressão da p53 para a população celular ECC-1-G3 aumenta em relação ao controlo para os vários tempos de incubação. O valor da razão entre o controlo e cada condição é de: $2,60 \pm 0,71$; $3,23 \pm 1,93$ e $2,34 \pm 1,21$ para os tempos de incubação 24, 48 e 72 horas. Em relação à linha celular ECC-1, a expressão de p53 apenas é superior ao controlo para as 24 horas de incubação. O valor da razão entre o controlo e cada condição é de: $1,74 \pm 1,23$; $0,37 \pm 0,26$ e $0,63 \pm 0,44$ para os tempos de incubação 24, 48 e 72 horas.

Comparando as duas populações celulares pode verificar-se que a expressão de p53 é sempre superior para as 48 e 72 horas na população celular ECC-1-G3.

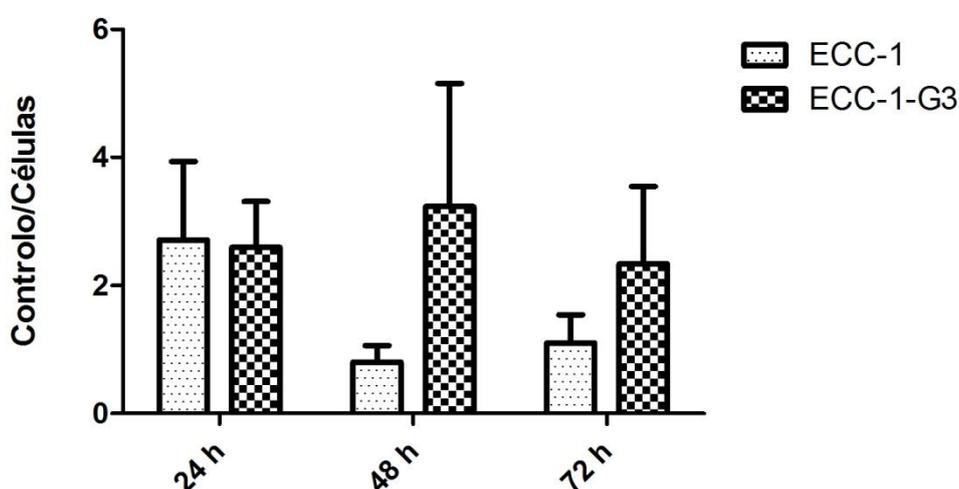


Figura 4.21 – Razão entre a expressão da proteína p53 para o controlo e cada condição. As condições são: 24, 48 e 72 horas de incubação com doxorubicina para as populações celulares ECC-1 e ECC-1-G3. Os resultados resultam da média de no mínimo 2 experiências independentes e respectivo erro padrão

4.9. Modelos animais

4.9.1. Modelo heterotópico do endométrio

O desenvolvimento de xenotransplantes foi avaliado ao longo de aproximadamente 30 dias. A evolução do crescimento tumoral esta descrita na figura 4.22.

Conforme é evidente pela análise gráfica, os tumores que resultam de uma injeção de células da população celular celular ECC-G3 apresentam uma taxa de crescimento muito superior aos de injectados com ECC-1, para tempos de medição iguais.

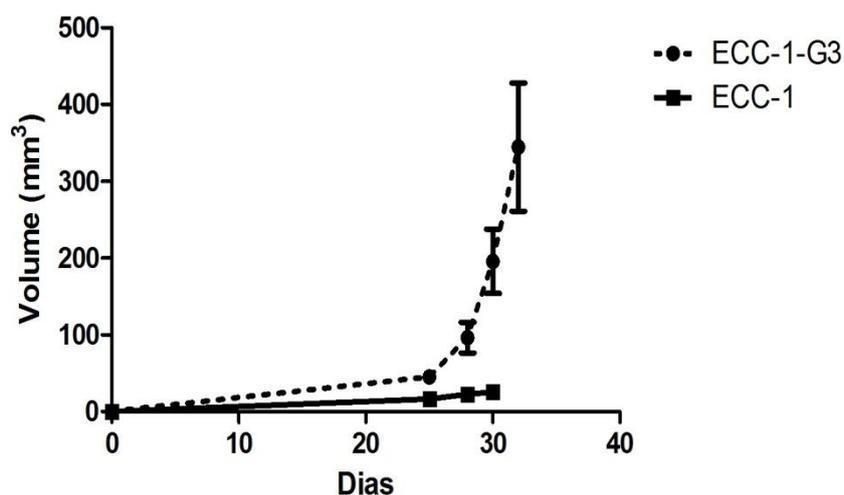


Figura 4.22 – Curvas que expressam o volume tumoral dos xenotransplantes de ECC-1(n=1 e ECC-1-G3(n=5) em função do tempo. Os resultados apresentam uma média de 5 experiências independentes para as ECC-1-G3.



Figura 4.23 – Ratinho balb/c nu/nu injectado células ECC-1, com tumor no dorso, flanco direito, de células ECC-1.

4.9.1.1. Análise fenotípica dos tumores por citometria de fluxo

Os tumores resultantes do modelo heterotópico de ECC-1, apresentam um aumento ligeiro da expressão da MIF para o marcadores CD24 comparativamente com o seu controlo (representado como branco na figura 4.24). No caso dos marcadores CD44 e CD133, a expressão da MIF tem um aumento considerável, de mais de 50%, em relação ao controlo. Deste modo, consideram-se positivas as expressões dos marcadores CD44 e CD133 para a linha celular ECC-1.

Em relação ao mesmo modelo desenvolvido com ECC-1-G3, os tumores apresentam um aumento das MIF em mais de 50% em relação ao controlo para todos os marcadores estudados, como se pode comprovar pela figura 4.24. Neste caso consideram-se os 3 marcadores como positivos. Na tabela 4.4 Está representada a relação entre as MIF das células marcadas e do controlo (branco) para cada condição.

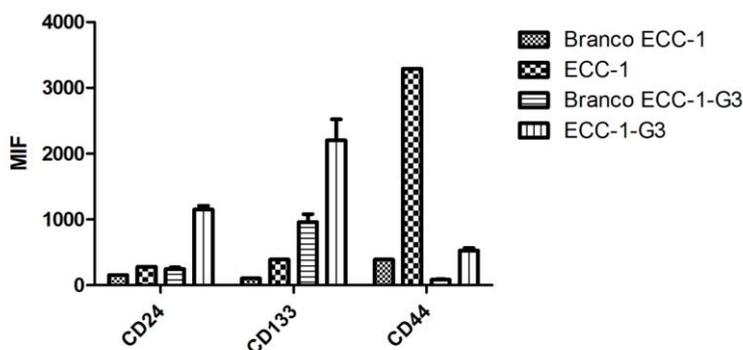


Figura 4.24 – Análise fenotípica de tumores resultantes do modelo heterotópico de cancro do endométrio com células tumorais das populações celulares ECC-1 (n=1) e ECC-1-G3 (n=5). Os resultados apresentam uma média de 5 experiências independentes para as ECC-1-G3 e erro padrão associado.

Tabela 4.4 – Razão da expressão das MIF dos marcadores moleculares de superfície CD24, CD44 e CD133 das células de tumor de modelo heterotópico marcadas em relação ao controlo (branco).

	ECC-1	ECC-1-G3
CD24	1,79	4,65
CD133	3,70	2,29
CD44	8,37	6,32

4.9.2. Modelo ortotópico do endométrio

Os animais injectados com as células tumorais foram periodicamente avaliados, através da observação e verificação de alguns parâmetros., para isso e tendo em cota a localização do local de injeção que por técnicas não invasivas constitui uma impossibilidade relativamente à monitorização optou-se por verificar a existência de tumor recorrendo à realização de uma incisão semelhante realizada aquando da injeção das células. Quando tais alterações foram verificadas, estes ratos foram sacrificados, os órgãos e o tumor recolhidos para análise histológica e no caso do tumor, também para análise fenotípica por citometria de fluxo. Do grupo de ratos injectados com ECC-1 destacaram-se cinco com alterações patológicas na zona pélvica. Destes, 2 apresentavam ainda invasão intraperitoneal e tumores de grandes dimensões, e dispersos por toda a zona pélvica.

Sendo que num dos casos o baço e o intestino sugerem a presença macroscópica de metastização, tendo sido enviado para estudo anatomo-patológico.

É ainda de referir que o desenvolvimento dos tumores não foi constante. Regra geral, o seu desenvolvimento deu-se no último mês contabilizado, isto é, quando feita uma laparotomia um mês antes da detecção dos tumores, a zona pélvica estava sem qualquer alteração.

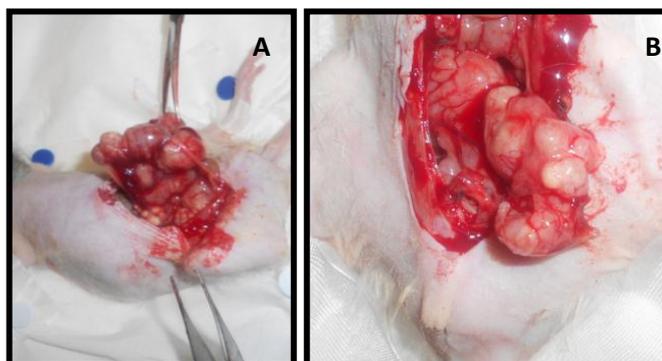


Figura 4.25 – Registo fotográfico durante remoção do tumor resultante do modelo ortotópico de ECC-1. Tumor de grandes dimensões (A) em que havia alteração do fígado e intestino. (B) Tumor de grandes dimensões quem que havia completa alteração dos órgãos genitais.

Em relação aos ratos injectados com ECC-1-G3, 2 deles apresentaram alterações na zona pélvica e no restante não houve qualquer evidência de anomalias. Um dos animais apresentava alteração das trompas e no outro houve disseminação peritoneal e o tumor uterino era de grandes dimensões como se pode constatar pela figura 4.25. Os órgãos recolhidos na necrópsia foram coração, pulmões, fígado e aparelho reprodutor juntamente com o tumor. Toda a informação de cada animal utilizado para este estudo está contida na tabela **A**, em anexo.

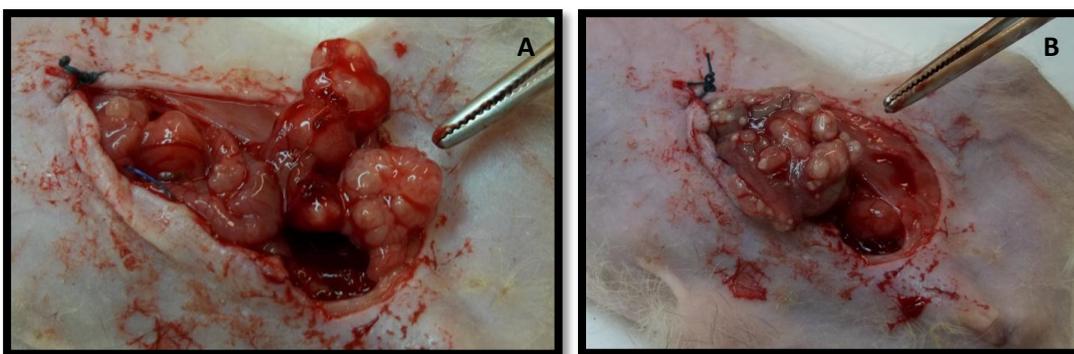


Figura 4.26 – Registo fotográfico durante remoção do tumor resultante do modelo ortotópico de ECC-1 (A) e de ECC-1-G3 (B).

4.9.2.1. Análise fenotípica dos tumores por citimetria de fluxo

Para o modelo ortotópico os marcadores CD24 e CD133 apresentam menor MIF para os tumores dos ratos injectados com ECC-1 quando comparados com o controlo. Para estes tumores considerou-se que a expressão de todos os marcadores era negativa. O marcador CD44 por apresentar uma relação de MIF superior a 2, como está representado na tabela 4.5, é considerado positivo.

Em relação os tumores dos animais injectados com ECC-1-G3, verificou-se para todos os marcadores um aumento da MIF em 50% em relação ao controlo. Assim, considerou-se que para os tumores de ECC-1-G3 os marcadores em estudo são positivos. Na figura 4.27 estão representados os controlos e as células marcadas para os dois tipos celulares e na tabela 4.5 está representada a relação entre as células marcadas e o controlo.

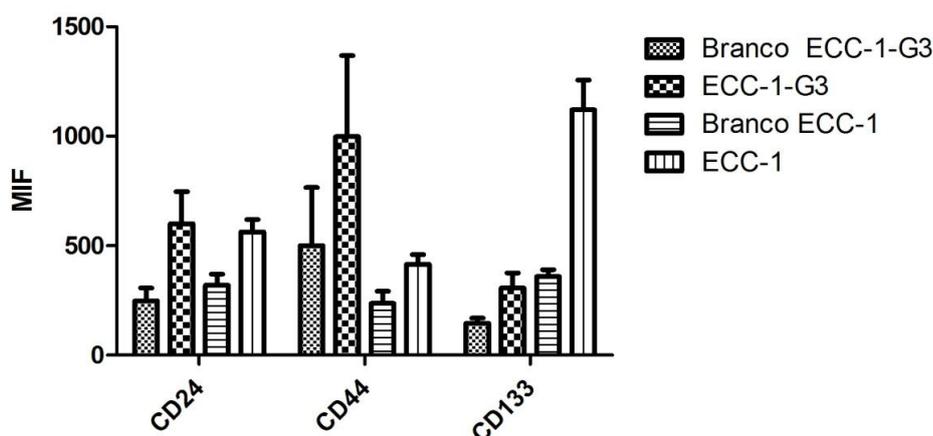


Figura 4.27– Análise fenotípica de tumores resultantes do modelo ortotópico de cancro do endométrio com células tumorais das linhas celulares ECC-1(n=3) e ECC-1-G3 (n=2). Os resultados apresentam uma média mínima de 2 experiências independentes e erro padrão associado

Tabela 4.5 – Razão da expressão das MIF dos marcadores moleculares de superfície CD24, CD44 e CD133 das células de tumor de modelo ortotópico marcadas em relação ao controlo (branco).

	ECC-1	ECC-1-G3
CD24	1,76	2,42
CD133	1,76	2,00
CD44	3,11	2,12

4.9.2.2. Estudos Imagiológicos – ^{99m}Tc -MIBI

As imagens adquiridas através da câmara de raios gama, imediatamente após a injeção do ^{99m}Tc -MIBI, e visualizadas na estação de trabalho eNTEGRA, após normalização

para uma escala de cores apropriada não permitiram verificar a existência de tumor ou metastização nos ratos submetidos a este procedimento. Na figura 4.28 podem ver-se as imagens adquiridas.

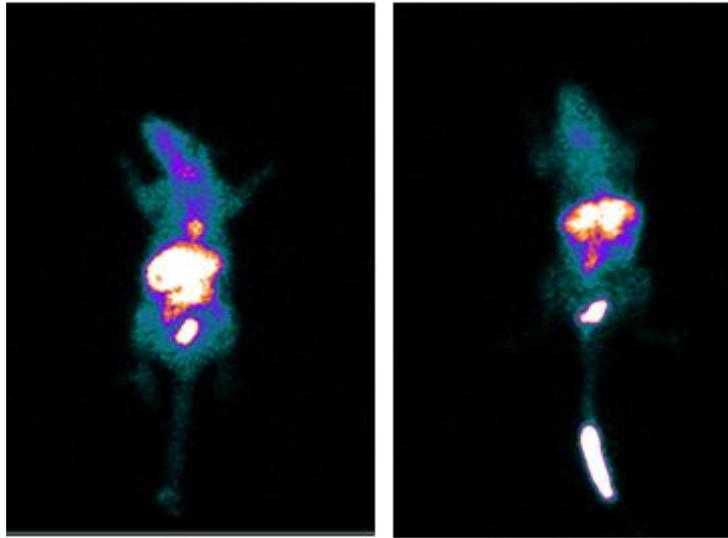


Figura 4.28 – Imagem estática obtida após injeção de ^{99m}Tc -MIBI em ratos fêmea injectados com ECC-1(à esquerda) e ECC-1-G3(à direita).

V. Discussão

O cancro do endométrio é uma das principais causas de morte nas mulheres, na Europa Ocidental. Assim, este trabalho de investigação visou contribuir para o estabelecimento de critérios de prognóstico e de protocolos tratamento do cancro do endométrio.

A formação e a progressão tumoral, a resistência às terapêuticas bem como a possibilidade de recidivas poderão ser explicadas pela presença de células estaminais que têm uma capacidade ilimitada de proliferação, auto-renovação e plasticidade, características que as tornam potenciais alvos terapêuticos^{17,49,50,15}. O cancro do endométrio caracteriza-se por uma proliferação anormal das células epiteliais resultando numa elevada relação epitélio/estroma. Considerou-se possível que as células estaminais, identificadas no endométrio normal, ou as células progenitoras possam ser os principais focos de carcinogénese nesse tecido que ao adquirirem mutações genéticas se transformaram em CSCs tornando-se nas principais responsáveis pelo início, manutenção e progressão do carcinoma^{18,25}.

Neste trabalho, para identificação deste tipo de células, modificou-se o protocolo de formação de esferas descrito por Ponti *et al*. O protocolo foi desenvolvido tendo em vista a formação de mamóferas e permitiu isolar e identificar células com propriedades de células estaminais.

Para aferir sobre a selectividade do protocolo aplicado procedeu-se à quantificação de esferas das várias gerações. Os resultados obtidos para esta quantificação permitiram apreciar uma diminuição significativa da densidade de esferas ao longo das gerações, de ECC-1-ES1 até ECC-1-ES3.

Foi descrito que a maioria das células tumorais morreria, quando colocadas em meio sem soro bovino fetal, sendo as sobreviventes as únicas capazes de se replicarem na presença de factores de crescimento. Deste modo, pode isolar-se de forma mais precisa uma

subpopulação celular com as propriedades de interesse, neste caso, as propriedades de células estaminais^{44,51}.

Assim, uma das causas que pode explicar a diminuição na densidade de esferas ao longo das várias gerações poderá ser a selecção, geração após geração, de uma subpopulação mais específica com propriedades estaminais.

Tendo como objectivo caracterizar o fenótipo molecular das células obtidas pelo protocolo de formação de esferas, descrito anteriormente, avaliou-se a análise fenotípica por citometria de fluxo. Os resultados obtidos em relação aos marcadores CD24 e CD44 revelaram uma maior expressão nas populações celulares ECC-1-ES1 e ECC-1ES3.

O fenótipo típico descrito na identificação de células com propriedades de células estaminais é CD44+/CD24^{-52,53}. Os resultados obtidos neste trabalho não estão de acordo com o que foi descrito. Al-Hajj *et al* isolaram e identificaram células com propriedades de células estaminais de cancro, cujo perfil fenotípico era CD44+/CD24⁻. Ainda assim, os mesmos autores verificaram que para a subpopulação isolada apenas 0,1 a 1,2% das células apresentavam potencial tumorigénico *in vivo*, revelando a heterogeneidade da amostra, sendo esta a principal razão apontada para que se verifique um potencial tumorigénico tão baixo⁵⁴. Alguns autores referem a obtenção de células com características de células estaminais que expressavam CD24 e outras que não expressavam este marcador. Quando tentaram a purificação da população não tiveram êxito e verificaram que as ambas as populações davam origem a células com e sem expressão de CD24, respectivamente^{55,56,57}. Portanto, os resultados obtidos para a fenotipagem destas células parecem indicar que talvez CD44+/CD24⁻ não seja um bom marcador para o endométrio, sugerindo ainda que a subpopulação de interesse seja uma minoria da população total isolada.

No que respeita ao CD133, verificou-se a existência de diferenças significativas entre as populações celulares ECC-1-G1 e ECC-1, sendo a expressão deste marcador menor na primeira população. Este marcador foi o primeiro marcador de células com propriedades de

células estaminais a ser identificado para as células com propriedades de células estaminais do endométrio^{53,58,27,25}. Em relação à expressão do CD133, o facto da expressão deste marcador estar mais aumentada na população ECC-1-G3 que na ECC-1-ES3 (figura. 4.6) poderá significar que o meio é um factor importante pois as ECC-1-G3 resultarem das células ECC-1-ES3 quando recolocadas em cultura aderente. Por outro lado, apesar de a diferença não ter sido significativa para a população celular ECC-1-ES1 e ECC-1-ES3, na primeira geração de esferas temos um aumento desta expressão que depois diminuiu em ES3. Estes dados podem apontar o CD133 como possível marcador de uma população progenitora já mais diferenciada na evolução da biologia tumoral.

A tumorigenicidade das células ECC-1 e ECC-1-G3 foi verificada, *in vivo*, quando injectadas em ratinhos Balb-c nu/nu. De acordo com Rutella *et al.* as células de carcinoma do endométrio, com expressão CD133+ *in vivo*, desenvolvem xenotransplantes²⁷. Todavia, os mesmos autores salientaram a importância de não se efectuar o *sorting*, especificando a população, evidenciando a importância de todas as células, mesmo as que seriam CD133-.

É importante referir que esta tumorigenicidade da população celular ECC-1-G3 foi não só verificada, como também revelou um desenvolvimento tumoral mais rápido que o modelo de xenotransplantes, em que se utilizaram células da linha celular ECC-1. Ainda em relação ao modelo animal heterotópico, é de referir que o perfil fenotípico dos tumores resultantes, também foi avaliado por citometria de fluxo, tendo-se observado uma maior positividade para os 3 marcadores para a linha celular ECC-1-G3. É importante referir que estes resultados se encontram concordantes com os resultados para os estudos *in vitro* realizados para as mesmas células, evidenciando uma vez mais que o fenótipo CD44+/CD24- talvez não seja um bom identificador de células com propriedades de células estaminais no cancro do endométrio.

Os estudos de citotoxicidade revelaram uma baixa sensibilidade ao tratamento com fármacos da linha celular ECC-1. De todos os fármacos testados apenas o paclitaxel e a doxorubicina responderam de forma favorável, isto é, no sentido de induzir morte celular.

Estas células revelaram-se insensíveis à ciclofosfamida e à carboplatina, sendo que para esta última, apenas se verificaram efeitos citotóxicos para as 72 horas e para concentrações de fármaco muito elevadas, de 365 μ M. É importante salientar que, para estes dois fármacos, as máximas concentrações testadas foram de 7,66 mM e 500 μ M, que são concentrações muito elevadas quando comparadas com as usadas na prática clínica.

A quimioterapia no cancro do endométrio não é uma terapia de primeira linha, como a cirurgia e a radioterapia; esse facto deve-se à baixa eficácia que os citostáticos apresentam, tendo resultados fracos quando aplicados em tratamento adjuvante e paliativo^{36,35}. O uso da doxorubicina como agente quimioterapêutico adjuvante, quer isolado quer em associação com a ciclofosfamida, tem-se mostrado ineficaz no tratamento do carcinoma do endométrio nos estadios I e II com factores de alto risco e na recorrência^{37,59}. Estudos clínicos revelaram que a combinação terapêutica que pareceu demonstrar melhor índice terapêutico foi a associação carboplatina com o paclitaxel, apresentando também menores índices de toxicidade que as terapias com doxorubicina^{60,61,62}.

Desta forma, os resultados obtidos para a citotoxicidade na linha celular ECC-1, de adenocarcinoma do endométrio, estão concordantes com o descrito na literatura, isto é, verifica-se uma fraca resposta à quimioterapia.

A doxorubicina foi testada em outras duas populações celulares, ECC-1-G3 e ECC-1-ES3. Os IC50 obtidos revelam uma tendência para a diminuição da sensibilidade à doxorubicina da população celular ECC-1-ES3 em relação às outras duas populações estudadas, apresentando esta população celular um IC50 às 72 horas de incubação aproximadamente quatro vezes maior que as populações ECC-1 e ECC-1-G3, conforme se pode analisar nas tabelas 4.2 e 4.3 do capítulo 4. Por outro lado, com o aumento do tempo de incubação os IC50 destas duas populações aproximam-se, sendo o IC50 de 47nM para as ECC-1 e de 51nM para as ECC-1-G3.

De acordo com a teoria das células com propriedades de células estaminais do cancro, estas células, para além de serem responsáveis pela manutenção do tumor e sua metastização, também são as responsáveis pela resistência ao tratamento e aparecimento de recidivas^{49,50,15}. Assim, os resultados estão de acordo com o que tem vindo a ser descrito na literatura, apontando as células com propriedades de células estaminais como principais responsáveis pela resistência ao tratamento quimioterapêutico.

Os estudos de viabilidade celular por citometria de fluxo indicaram que a sensibilidade das populações testadas, ECC-1 e ECC-1-G3, aumentava com o tempo de exposição à doxorrubina, sendo as duas populações mais sensíveis para as 72 horas de incubação. É importante ainda referir que, apenas para este tempo de incubação, se verificaram diferenças significativas entre as células vivas da linha celular ECC-1. A relação entre células em apoptose e células vivas também apresentou diferenças significativas para o tempo de incubação já referido entre as duas populações celulares, indicando que as células da linha celular ECC-1 morrem mais por apoptose sendo, por isso, maior a sua sensibilidade ao fármaco com o aumento do tempo de incubação.

Estes dados parecem corroborar que as células com propriedades estaminais são mais resistentes à apoptose⁶³. Bao S. *et al.* verificaram que células de glioma que tinham expressão positiva para o marcador CD133 apresentavam uma maior resistência à morte por apoptose⁶⁴. Ainda em células de glioma, com capacidade de formar esferas, foram identificados baixos níveis tanto de mRNA como de proteína caspase 8, uma importante proteína efectora da apoptose⁶⁵. Pensa-se que outras moléculas com papel importante na apoptose apresentarão uma expressão alterada nestas células, como por exemplo no sistema anti e pró-apoptótico da família Bcl-2, ou, então, existirá uma sobreexpressão de determinadas proteínas como as IAP ou até mesmo uma activação aberrante de NF-κB, que interfere nas vias de sinalização apoptóticas⁶⁶.

De acordo com os resultados da análise fenotípica *in vitro* efectuada por citometria de fluxo, as células ECC-1-G3 são as que mais expressam CD133; deste modo, podemos por a hipótese de as células ECC-1-G3 poderem possuir um mecanismo que lhes confere uma maior resistência à apoptose. No entanto, poderão ainda haver outros mecanismos de morte implicados neste processo, como é o caso da morte por necrose. Para além disso, a mesma avaliação após um período de incubação mais longo revelou as diferenças entre ECC1 e ECC-1-G3 na percentagem de células vivas.

Quanto à expressão de p53, ela foi superior nas células da população ECC-1-G3 e inferior nas células ECC-1-ES3 quando comparada com a expressão na linha celular ECC-1. Após incubação, durante 48 e 72 horas com doxorrubicina, verificou-se que a expressão de p53 é superior na população celular ECC-1-G3. Destes resultados pode ainda concluir-se que a linha celular ECC-1, quando incubada com doxorrubicina, para as 48 e 72 horas, apresenta sempre expressão inferior ao controlo, o que não se verifica para as 24 horas, evidenciando que o aumento do tempo de incubação diminui a expressão de p53 na linha celular ECC-1.

A p53 é uma proteína citoplasmática, que está relacionada com inúmeras funções biológicas como a regulação do ciclo celular, a replicação e reparação de danos do DNA, a proliferação, a apoptose, a inibição da angiogénese e a resposta ao stress celular. A sua acção pode ser directa ou indirecta activando outros genes e proteínas que irão desempenhar determinadas funções. A p53 pode actuar parando o ciclo celular na fase G1. Esta paragem permite a avaliação do DNA e a sua eventual reparação, pela activação de genes efectores que têm essa função. Sabe-se que a p53 pode actuar como activador transcripcional de diversos genes, como por exemplo o gene que codifica a proteína p21. Por sua vez, a proteína p21 é conhecida como um inactivador de cinases dependentes de ciclinas, proteínas importantes para a progressão do ciclo celular. Quando o dano no DNA não é possível de reparar e é prejudicial para a continuidade de célula, esta é encaminhada para a via de morte apoptótica^{48,67,68}.

A resistência de determinados cancros que expressam a proteína p53 *wild-tipe*, muitas vezes deve-se a efeitos indirectos, nomeadamente na alteração do gene da proteína p21 ou, até mesmo, na expressão do gene pró-apoptótico *bax*, impedindo que as células prossigam na via de morte por apoptose⁶⁹.

Tem sido reportado que a perda de expressão da p53 poderá estar relacionada com o aumento do marcador de superfície membranar CD44. Tem sido também documentado que o aumento da expressão da p53 faz diminuir o potencial de pluripotência das células^{70,71,72}. Estes dados justificam os resultados das células da população celular ECC-1-ES3, que expressam menos p53.

Os resultados obtidos para a expressão de p53 nas populações celulares ECC-1 e ECC-1-G3 para os vários tempos de incubação com doxorrubicina parecem estar concordantes com a avaliação da morte celular por apoptose para as mesmas condições nestas populações celulares. Assim, a morte por apoptose poderá ser mais frequente para as células da linha celular ECC-1 que para as células da população celular ECC-1-G3 pela diferença de expressão da proteína p53 que existe entre estas duas populações celulares, principalmente às 72 horas de incubação com doxorrubicina, e que parece dar preferência a outras vias, que não a apoptose. Por outro lado, a hipótese já colocada anteriormente da possibilidade de um desequilíbrio na expressão das proteínas pró e anti apoptóticas, *bax* e *bcl-2*, poderá explicar a menor propensão para as células ECC-1-G3 terem uma menor tendência a morrer por apoptose, apesar de expressarem mais proteína p53. No futuro, seria interessante avaliar e quantificar estas proteínas por forma clarificar o mecanismo apoptótico nestas populações celulares.

Neste trabalho foram, também, avaliados processos bioquímicos e fisiológicos das células tumorais, tal como a actividade glicolítica, com recurso a métodos de medicina nuclear, nomeadamente através da captação do radiofármaco ¹⁸F-FDG. As captações com este radiofármaco foram feitas nas linhas celulares ECC-1 e ECC-1-G3. Os resultados obtidos não

revelaram existências significativas nas captações entre as duas linhas celulares estudadas, sendo as percentagens de captação bastante baixas (aproximadamente 1% em ambas).

As células tumorais são habitualmente associadas a um metabolismo elevado e muito activas, nomeadamente ao nível da replicação tumoral, o que acarreta necessidades energéticas acrescidas quando comparadas com as células normais. Deste modo, a célula tumoral opta pela via glicolítica para a obtenção de energia de uma forma mais rápida. Ainda assim, a glicólise apenas permite o rendimento de 2 moléculas de ATP por cada ciclo, o que significa que para produzir grandes quantidades de energia a célula tumoral necessita de grandes níveis de glicose. É com base neste princípio que se utiliza o radiofármaco ^{18}F -FDG em medicina nuclear no âmbito do diagnóstico de tumores pela técnica de imagiologia PET^{46,73}.

Alguns estudos feitos alegam, no entanto, que o ^{18}F -FDG também se encontra relacionado com os mecanismos de resistência multifármacos, nomeadamente com a glicoproteína-P^{74,75,76}. A glicoproteína-P, é uma proteína transmembranar que se relaciona com a resistência multifármacos por ser uma proteína de efluxo, permitindo a extrusão de inúmeros fármacos para o exterior das células, como é o caso da doxorrubicina^{38,39,77}. Deste modo, pensa-se que o ^{18}F -FDG pode ser extrusado das células por este tipo proteínas ou, pelo menos, que estas sejam uma das proteínas que estejam envolvidas no seu efluxo. Deste modo, os resultados obtidos para as captações de ^{18}F -FDG parecem estar em concordância com os resultados dos estudos de citotoxicidade, podendo esta baixa captação de radiofármaco estar directamente relacionada com mecanismos de resistência destas células, nomeadamente sobreexpressão de glicoproteína P, que será avaliada nos próximos estudos.

Foram realizadas captações também com outro radiofármaco marcado com flúor, a ^{18}F -FCHO, tendo como objectivo a avaliação do metabolismo fosfolipídico e replicativo das células das linhas celulares ECC-1 e ECC-1-G3. Os resultados, ainda que preliminares, revelaram que as células ECC-1-G3 tinham uma maior captação que as ECC-1. No entanto, os resultados obtidos para o tempo de duplicação, também para estas duas linhas celulares, revelaram que

não existiam diferenças significativas, sendo por isso a sua velocidade de replicação muito semelhante.

A colina é um constituinte fundamental do principal fosfolípido membranar, a fosfatidilcolina. Assim, células que capturem mais colina serão células que teoricamente terão maior necessidade de sintetizar membrana celular e portanto, que se replicam mais^{78,47}.

Tendo em conta os resultados obtidos, pode inferir-se que embora os índices de duplicação celular sejam semelhantes, as células ECC-1-G3 poderão ter uma maior captação de colina por serem descendentes de células com propriedades estaminais, e portanto algum do seu metabolismo poderá ainda estar alterado nesse sentido, durante o processo de diferenciação a que estão sujeitas quando são colocadas em cultura aderente.

O desenvolvimento de um modelo ortotópico do endométrio constituiu um dos principais objectivos deste trabalho, tendo como meta a mimetização do ambiente nativo dos tumores do endométrio, bem como a sua metastização. O modelo é inédito e os resultados obtidos são preliminares; ainda assim, apresenta resultados interessantes.

A utilidade de um modelo animal está sempre dependente do quão perto se consegue mimetizar a patologia em estudo. O modelo ideal é aquele que permite o desenvolvimento de características histopatológicas semelhantes às dos tumores humanos. Apresentando o mesmo tipo de progressão do tumor ao longo dos mesmos estadios, e que cause efeitos sistémicos e fisiológicos idênticos⁷⁹. Injecções ortotópicas de células tumorais humanas em animais já foram testadas para diferentes tipos de cancro como, por exemplo, o cancro do cólon, do pulmão, do pâncreas, da bexiga, do estômago e da mama^{80,81,82}. Estes modelos permitiram o estudo do processo metastático, embora tenham a desvantagem do *follow-up in vivo* que é sempre mais complicado neste modelo, uma vez que não é possível a observação directa para averiguar o seu estado.

Doll *et al.*, estabeleceram um modelo para cancro do endométrio, em ratinhos Balb-c nu/nu com a linha celular de carcinoma endometrial humano HEC1A, tendo obtido resultados

relevantes, uma vez que verificaram metástases em gânglios linfáticos para-aórticos em 75% dos casos, reforçando a ideia que o modelo proposto representa um modelo de cancro do endométrio em estadio avançado⁸³. Mais recentemente, Cabrera et al, desenvolveram dois modelos em simultâneo de cancro do endométrio. Um, em que as células inoculadas eram resultantes da propagação *in vitro* de linhas celulares e o outro, em que se inoculavam amostras de tecido tumoral no útero dos animais. Também estes autores obtiveram resultados relevantes sugerindo que a inoculação intrauterina das células tumorais oferecia mais vantagens em relação ao modelo heterotópico uma vez que permite um avanço no estudo pré-clínico deste tipo de cancro, nas diversas fases de doença: desde o desenvolvimento na cavidade uterina, a infiltração no miométrio, a invasão vascular, a disseminação peritoneal e o eventual aparecimento de metáteses à distancia⁸⁴

A metastização extrauterina influencia as taxas de recorrência e sobrevivência. Após os cinco anos de detecção da doença estima-se que 50% das mulheres com doença extrauterina sobrevivam e tenham recidiva. Comparando com as mulheres em que não há invasão intraperitoneal, a taxa de sobrevivência é de 88% e a de recidiva é de 11%⁸⁵. O tamanho do tumor é descrito como um factor prognóstico independente e significativo para a metastização ganglionar e sobrevivência em mulheres com cancro do endométrio. Num estudo realizado em mulheres com cancro do endométrio em estadio I, detectaram-se metástases ganglionares em 4% das pacientes com tumores inferiores a 2 cm, em 15% em que os tumores eram de tamanho superior a 2 cm e em 35% em que os tumores ocupavam a totalidade do útero⁸⁶.

No modelo ortotópico desenvolvido neste trabalho, verificou-se a presença de tumor em alguns dos ratos injectados com as linhas celulares ECC-1 e ECC-1-G3 e, em alguns dos casos, os tumores tinham carácter invasivo, tendo metastizado para o peritoneu e órgãos adjacentes. Em dois dos ratos injectados com ECC-1 e em um dos ratos injectados com ECC-1-G3, verificou-se a existência de tumores de grandes dimensões com invasão intraperitoneal.

Deste modo, os resultados obtidos para o modelo ortotópico de cancro do endométrio proposto apresentam-se relevantes, demonstrando uma tendência a mimetizar estadios de doença avançada, um dos requisitos para um bom modelo animal.

O tempo necessário para que se desenvolvesse tumor foi menor no modelo de ECC-1-G3 que no modelo de ECC-1, evidenciando diferenças no comportamento destas duas linhas celulares *in vivo* relativamente à tumorigénese. No entanto, relativamente ao comportamento dos tumores não se verificaram diferenças, podendo dever-se à influência do microambiente envolvente na diferenciação celular, aproximando os dois tipos celulares no desenvolvimento de moléculas responsáveis pela metastização.

Uma vez mais, verificou-se uma maior expressão dos marcadores CD24, CD44 e CD133 para os tumores que resultaram da injeção de ECC-1-G3 em relação aos injectados com ECC-1. Este resultado confirma que a diferença entre as linhas celulares continua a existir *in vivo*. No entanto, a expressão destes marcadores deixa de ser tão evidente como no modelo heterotópico. Podendo este acontecimento justificar-se por uma possível adaptação por parte das células ao local de injeção, aproximando de alguma forma os fenótipos celulares.

Com estes resultados, verificou-se o papel importante que as células com propriedades de células estaminais desempenham no cancro do endométrio, nomeadamente, na resistência à quimioterapia e na metastização.

*VI. Conclusão
e Perspectivas
Futuras*

O trabalho realizado, cujo objectivo principal foi isolar e identificar células com propriedades de células estaminais do cancro do endométrio, avaliar a sua importância na resposta à quimioterapia, no metabolismo glicolítico tumoral e potencial replicativo e o seu comportamento *in vivo*, permitiu que se tirassem algumas conclusões.

Os marcadores moleculares de superfície CD24, CD44 e CD133 não apresentarem uma expressão uniforme na população com propriedades de células estaminais *in vitro*. O CD24 e CD44 têm um aumento de expressão na população de esferas em suspensão. O CD133 revela-se numa população inicial que depois diminuiu com a selectividade das gerações.

As células da linha celular ECC-1 apresentam uma sensibilidade reduzida aos fármacos utilizados como agentes de quimioterapia, nomeadamente à ciclofosfamida e à carboplatina. Verificou-se, ainda, uma menor sensibilidade para o tratamento com doxorubicina na população com propriedades de células estaminais. Nesta população celular a menor expressão de p53 poderá indicar um possível papel destas células na resistência aos citostáticos.

A população celular ECC-1-G3 tem uma maior resistência à morte por apoptose que a linha celular ECC-1, sendo também esta a linha que expressa maior quantidade da proteína p53, que parece não estar a activar preferencialmente a via apoptótica nestas células quando expostas à doxorubicina.

Os estudos *in vivo* revelaram um comportamento diferencial das populações celulares ECC-1 e ECC-1-G3. O potencial tumorigénico é maior nas células ECC-1-G3 assim como, a expressão dos marcadores CD24, CD44 e CD133 sugerindo que estas células, descendentes de células com propriedades de células estaminais, têm um comportamento mais agressivo *in vivo*.

Futuramente, prevê-se a diferenciação do comportamento *in vivo* das várias gerações celulares isoladas, tendo em vista perceber se as diferentes gerações influenciam a carcinogénese.

A expressão de glicoproteína P será um passo fundamental para a compreensão das vias envolvidas no mecanismo de resistência à quimioterapia. Relativamente às vias apoptóticas será importante avaliar proteínas pró e anti apoptóticas *bax* e *bcl-2*.

O estudo aprofundado de marcadores moleculares da população com propriedades estaminais ou mesmo populações progenitoras da génese tumoral será um processo de investigação fundamental para o desenvolvimento de fármacos mais específicos para terapêuticas dirigidas que possam melhorar a resposta à terapêutica adjuvante e das recidivas no cancro do endométrio.

VII. Bibliografía

1. Purdie D. Epidemiology of endometrial cancer. *Reviews in Gynaecological Practice*. 2003;3(4):217-220. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471769703000200>. Accessed November 3, 2011.
2. Jain MG, Rohan TE, Howe GR. Hormone replacement therapy and endometrial cancer in Ontario, Canada. *Journal of clinical epidemiology*. 2000;53(4):385-91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10785569>.
3. DiSaia, Creasman. *Clinical Gynecologic Oncology*. 7 th. (MOSBY, ed.); 2007.
4. Colombo N, Preti E, Landoni F, et al. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2011;22 Suppl 6(Supplement 6):vi35-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21908501>. Accessed March 17, 2012.
5. Luesley D, Lawton F, Berchuck A. *Uterine Cancer*. (Fancis T&, ed.). New york; 2006:31-48.
6. Coukos G, Rubin S. *Cancer of the Uterus*. (Dekker M, ed.). New York; 2005:93-143.
7. Athology MOP, Ynecologic OFG. *Molecular Pathology of Gynecologic Cancer*. 2007:51-102.
8. Muggia F, Oliva E. *Uterine Cancer: Screening, Diagnosis and Treatment*. 2009:105-141.
9. Mota F. *Compêndio de Ginecologia Oncológica*. 2012.
10. Forde GK, Carlson JW, Downey GO, et al. A quality process study of lymph node evaluation in endometrial cancer. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2011;30(4):335-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21623200>. Accessed April 12, 2012.
11. Temkin SM, Fleming G. Current treatment of metastatic endometrial cancer. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*. 2009;16(1):38-45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19078928>.
12. Kehoe SM, Zivanovic O, Ferguson SE, Barakat RR, Soslow R a. Clinicopathologic features of bone metastases and outcomes in patients with primary endometrial cancer. *Gynecologic oncology*. 2010;117(2):229-33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20199802>. Accessed June 11, 2012.
13. Takeshima N, Umayahara K, Fujiwara K, et al. Effectiveness of postoperative chemotherapy for para-aortic lymph node metastasis of endometrial cancer. *Gynecologic oncology*. 2006;102(2):214-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16457876>. Accessed April 9, 2012.
14. Gien LT, Kwon JS, D'Souza DP, et al. Brain metastases from endometrial carcinoma: a retrospective study. *Gynecologic oncology*. 2004;93(2):524-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15099973>. Accessed June 11, 2012.
15. Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Sasiadek M, Ssiadek MM. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J Appl Genet*. 2008;49(2):193-199. Available at:

- http://150.254.207.207/JAG/pdfy/2008_Volume_49/2008_Volume_49_2-193-199.pdf. Accessed September 10, 2010.
16. Bapat S a. Evolution of cancer stem cells. *Seminars in cancer biology*. 2007;17(3):204-13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16787749>. Accessed March 30, 2012.
17. O'Brien CA, Kreso A, Jamieson CHM. Cancer stem cells and self-renewal. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(12):3113-20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530701>. Accessed March 12, 2012.
18. Kyo S, Maida Y, Inoue M. Stem cells in endometrium and endometrial cancer: accumulating evidence and unresolved questions. *Cancer letters*. 2011;308(2):123-33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21683518>. Accessed August 28, 2011.
19. Huntly BJP, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nature reviews*. 2005;Cancer 5.
20. Kucia M, Ratajczak MZ. Stem cells as a two edged sword--from regeneration to tumor formation. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society* 57. 2006;7:5-16.
21. Al-Hajj M, Wicha, M.S., et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100.
22. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer research*. 2006;66(4):1883-90; discussion 1895-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16488983>. Accessed March 11, 2012.
23. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours : accumulating evidence and unresolved questions. *Nature reviews. Cancer*. 2008;8:755-768.
24. Cervelló I, Mirantes C, Santamaria X, et al. Stem cells in human endometrium and endometrial carcinoma. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2011;30(4):317-27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21623195>. Accessed June 11, 2012.
25. Hubbard S a, Gargett CE. A cancer stem cell origin for human endometrial carcinoma? *Reproduction (Cambridge, England)*. 2010;140(1):23-32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20089663>. Accessed June 11, 2012.
26. Nakamura M, Kyo S, Zhang B, et al. Prognostic impact of CD133 expression as a tumor-initiating cell marker in endometrial cancer. *Human pathology*. 2010;41(11):1516-29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20800872>. Accessed June 11, 2012.
27. Rutella S, Bonanno G, Procoli A, et al. Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(13):4299-311. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19509143>. Accessed October 3, 2011.

28. Gadducci A, Cosio S, Genazzani AR. Old and new perspectives in the pharmacological treatment of advanced or recurrent endometrial cancer: Hormonal therapy, chemotherapy and molecularly targeted therapies. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2006;58(3):242-56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436330>. Accessed March 14, 2012.
29. Anon. Cell Cycle & Mitosis Problem Set from the Biology Project at the University of Arizona.
30. Cho RJ, Campbell MJ, Winzler E a, et al. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Molecular cell*. 1998;2(1):65-73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9702192>.
31. Overbeck TL, Knight JM, Beck DJ. A comparison of the genotoxic effects of carbop | atin and cisplatin in Escherichia coli. 1996;362:249-259.
32. Duska LR, Berkowitz R, Matulonis U, et al. A pilot trial of TAC (paclitaxel, doxorubicin, and carboplatin) chemotherapy with filgastrim (r-metHuG-CSF) support followed by radiotherapy in patients with “high-risk” endometrial cancer. *Gynecologic oncology*. 2005;96(1):198-203. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15589601>. Accessed June 11, 2012.
33. Lee J-W, Sung N-Y, Kim J-K, et al. Effect of gamma irradiation on spleen cell function and cytotoxicity of doxorubicin. *Chemico-biological interactions*. 2008;173(3):205-14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18486936>. Accessed June 11, 2012.
34. Engblom P, Pulkkinen JO, Rantanen V, et al. Original Paper Effects of Paclitaxel With or Without Cremophor EL on Cellular Clonogenic Survival and Apoptosis. 1999;35(2):284-288.
35. Obel JC, Friberg G, Fleming GF. Chemotherapy in endometrial cancer. *Clinical advances in hematology & oncology: H&O*. 2006;4(6):459-68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16981669>.
36. Lee NK. Adjuvant treatment of advanced-stage endometrial cancer. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2011;54(2):256-65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21508695>.
37. CA S, DM G, TW B. Adjuvant chemotherapy with cisplatin, doxorubicin, and cyclophosphamide (PAC) for early-stage high-risk endometrial cancer: a preliminary analysis. *Gynecol Oncol*. 1990;38:305-308.
38. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature reviews. Cancer*. 2002;2(1):48-58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11902585>. Accessed March 9, 2012.
39. Leslie EM, Deeley RG, Cole SPC. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and applied pharmacology*. 2005;204(3):216-37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15845415>.
40. Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual review of biochemistry*. 2002;71:537-92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045106>. Accessed July 29, 2010.

41. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature reviews. Cancer.* 2002;2(1):48-58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11902585>. Accessed July 17, 2010.
42. Gillet J-P, Gottesman MM. *Multi-Drug Resistance in Cancer.* (Zhou J, ed.). Totowa, NJ: Humana Press; 2010. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-60761-416-6>. Accessed July 14, 2010.
43. Anon. http://www.microbehunter.com/2010/06/27/the-hemocytometer-counting-chamber/counting_chamber7/. Acedido pela última vez a 18/05/12 – 15h36.
44. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer research.* 2005;65(13):5506-11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15994920>.
45. Anon. The PubChem Project. at <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>
46. Kojima S, Zhou B, Teramukai S, et al. Cancer screening of healthy volunteers using whole-body 18F-FDG-PET scans: The Nishidai clinic study. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990).* 2007;43(12):1842-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17614273>. Accessed July 3, 2012.
47. Langsteger W, Heinisch M, Fogelman I. The role of fluorodeoxyglucose, 18F-dihydroxyphenylalanine, 18F-choline, and 18F-fluoride in bone imaging with emphasis on prostate and breast. *Seminars in nuclear medicine.* 2006;36(1):73-92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16356797>. Accessed April 4, 2012.
48. Tokino T, Nakamura Y. The role of p53-target genes in human cancer. *Critical reviews in oncology/hematology.* 2000;33(1):1-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10714958>.
49. Gong C, Yao H, Liu Q, et al. Markers of tumor-initiating cells predict chemoresistance in breast cancer. *PloS one.* 2010;5(12):e15630. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3004932&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed August 1, 2011.
50. Dave B, Chang J. Treatment resistance in stem cells and breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia.* 2009;14(1):79-82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19259795>. Accessed October 16, 2011.
51. Wilson H, Huelsmeyer M, Chun R, et al. Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *Veterinary journal (London, England : 1997).* 2008;175(1):69-75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17851099>.
52. O'Brien CA, Kreso A, Dick JE. Cancer stem cells in solid tumors: an overview. *Seminars in radiation oncology.* 2009;19(2):71-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19249644>. Accessed March 8, 2012.
53. Boman BM, Wicha MS. Cancer stem cells: a step toward the cure. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2008;26(17):2795-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18539956>. Accessed March 28, 2012.

54. M A-H, MS W, Benito-Hernandez A MS, Clarke, MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:3983-3988.
55. Ghani FI, Yamazaki H, Iwata S, et al. Identification of cancer stem cell markers in human malignant mesothelioma cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;404(2):735-42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21163253>. Accessed May 22, 2012.
56. Yamazaki H, Naito M, Ghani FI, et al. Characterization of cancer stem cell properties of CD24 and CD26-positive human malignant mesothelioma cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;419(3):529-36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22369943>. Accessed June 12, 2012.
57. Burgos-Ojeda D, Rueda BR, Buckanovich RJ. Ovarian cancer stem cell markers: Prognostic and therapeutic implications. *Cancer letters*. 2012;322(1):1-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22334034>. Accessed May 9, 2012.
58. Climate B, Dyck V, Phylogenies TF, Compare EP. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004;432(November):396-401.
59. TW B, DM G, M M. Postoperative adjuvant cisplatin, doxorubicin, and cyclophosphamide (PAC) chemotherapy in women with high-risk endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1994;55:47-50.
60. MS A, FH van W, G B. Doxorubicin versus doxorubicin and cisplatin in endometrial carcinoma: definitive results of a randomised study. *EORTC GCG*. 2003;14:441-448.
61. PJ H, KD S, JA P. Paclitaxel and carboplatin, alone or with irradiation, in advanced or recurrent endometrial cancer: a phase II study. *J Clin Oncol*. 2001;19:4048-4053.
62. T A, S N, T Y. Treatment with paclitaxel plus carboplatin, alone or with irradiation, of advanced or recurrent endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2007;104:32-35.
63. Iannolo G, Conticello C, Memeo L, De Maria R. Apoptosis in normal and cancer stem cells. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2008;66(1):42-51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18035551>. Accessed March 19, 2012.
64. Bao S, Wu Q, McLendon R, Al. E. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444:756-60.
65. Capper D, Gaiser T, Hartmann C, et al. Stem-cell-like glioma cells are resistant to TRAIL/Apo2L and exhibit down-regulation of caspase-8 by promoter methylation. *Acta Neuropathol*. 2009;117:445-456.
66. Fulda S. Regulation of apoptosis pathways in cancer stem cells. *Cancer letters*. 2012. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22429999>. Accessed June 28, 2012.
67. Komarova E a, Gudkov a V. Chemoprotection from p53-dependent apoptosis: potential clinical applications of the p53 inhibitors. *Biochemical pharmacology*. 2001;62(6):657-67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11556286>.

68. Ito K, Watanabe K, Nasim S, et al. Prognostic significance of p53 overexpression in endometrial cancer. *Cancer research*. 1994;54(17):4667-70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12193924>.
69. Martinez-Rivera M, Siddik ZH. Resistance and gain-of-resistance phenotypes in cancers harboring wild-type p53. *Biochemical Pharmacology*. 2012;83(8):1049-1062. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295211009427>. Accessed May 6, 2012.
70. Zhao T, Xu Y. P53 and Stem Cells: New Developments and New Concerns. *Trends in cell biology*. 2010;20(3):170-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20061153>. Accessed March 25, 2012.
71. Bonizzi G, Cicalese A, Insinga A, Pelicci PG. The emerging role of p53 in stem cells. *Trends in molecular medicine*. 2012;18(1):6-12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21907001>. Accessed March 17, 2012.
72. Jerry DJ, Tao L, Yan H. Regulation of cancer stem cells by p53. *Breast cancer research : BCR*. 2008;10(4):304. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2575544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed June 20, 2012.
73. Tsukada H, Murakami M, Shida M, et al. 18F-fluorodeoxyglucose uptake in uterine leiomyomas in healthy women. *Clinical imaging*. 2009;33(6):462-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19857807>. Accessed July 3, 2012.
74. Smith T a D. Influence of chemoresistance and p53 status on fluoro-2-deoxy-D-glucose incorporation in cancer. *Nuclear medicine and biology*. 2010;37(1):51-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20122668>. Accessed July 3, 2012.
75. Seo S, Hatano E, Higashi T, et al. P-glycoprotein expression affects 18 F-fluorodeoxyglucose accumulation in hepatocellular carcinoma in vivo and in vitro. 2009:1303-1312.
76. Seo S, Hatano E, Higashi T, et al. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts tumor differentiation, P-glycoprotein expression, and outcome after resection in hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(2 Pt 1):427-33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17255262>. Accessed March 30, 2012.
77. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*. 2003;22(47):7468-85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14576852>. Accessed March 13, 2012.
78. Pet FDG. A New Oncologic PET Tracer. 2001:1815-1817.
79. Céspedes MV, Casanova I, Parreño M, Mangués R. Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2006;8(5):318-29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18546291>.

80. IJ F. Orthotopic implantation of human colon carcinomas into nude mice provides a valuable model for the biology and therapy of metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 1991;10:229–243.
81. L C, Y R, Al JB et. Characterization of a novel transplantable orthotopic murine xenograft model of a human bladder transitional cell tumor (BIU-87). *Cancer Biology.* 2006:394–398.
82. CM J, H L, B K-K, Al E. Truncated galectin-3 inhibits tumor growth and metastasis in orthotopic nude mouse model of human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 9:2374–2383.
83. Doll A, Gonzalez M, Abal M, et al. An orthotopic endometrial cancer mouse model demonstrates a role for RUNX1 in distant metastasis. *International journal of cancer. Journal international du cancer.* 2009;125(2):257-63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19384951>. Accessed July 3, 2012.
84. Cabrera S, Llauradó M, Castellví J, et al. Generation and characterization of orthotopic murine models for endometrial cancer. *Clinical & experimental metastasis.* 2012;29(3):217-27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198674>. Accessed May 20, 2012.
85. JR L, BL R. Prognostic factors associated with recurrence in clinical stage I adenocarcinoma of the endometrium. *Obstet Gynecol.* 1991;78:63-69.
86. JC S, JR L, CB W, JS C. Tumor size in endometrial cancer: a prognostic factor for lymph node metastasis. *Obstet Gynecol.* 1987;70:216-219.

VIII. Anexo

Tabela A – Anexo: Registo do historial de cada animal utilizado para o modelo ortotópico do endométrio.

Linha Celular	Nº de Células (Milhões)	Reinjecção (Milhões)	Laqueação	Tempo para aparecimento de Tumor	Necrópsia
ECC-1	48,89	50	sim	Sem tumor	Genitais, pulmão, fígado e coração
ECC-1	23,33	não	sim	Sem tumor	Genitais, pulmão, fígado e coração
ECC-1	21,45	não	não	7 meses	Genitais/tumor, pulmão, fígado e coração
ECC-1	24,44	50	sim	6 meses	Genitais/tumor, pulmão, fígado e coração
ECC-1	11,56	não	não	6 meses	Genitais/tumor, pulmão, fígado ,coração, baço e intestino
ECC-1	26,66	não	não	6 meses	Genitais/tumor, pulmão, fígado e coração
ECC-1	26,82	não	não	6 meses	Genitais/tumor, pulmão, fígado e coração
ECC-1	25	não	não	7 meses	Genitais/tumor, pulmão, fígado e coração
ECC-1	25	não	não	sem tumor	Genitais/tumor, pulmão, fígado e coração
ECC-1	25	não	não	sem tumor	Genitais/tumor, pulmão, fígado e coração
ECC-1	34,68	não	não	sem tumor	-
ECC-1	9,43	não	não	sem tumor	-
ECC-1	5,15	não	não	sem tumor	-
ECC-1	19,27	não	não	sem tumor	-
ECC-1	38,53	não	não	sem tumor	-
ECC-1	32,18	não	não	sem tumor	-
ECC-1	5,78	não	não	sem tumor	-
ECC-1-G3	20	não	sim	3,5 meses	Genitais/tumor, pulmão, fígado e coração
ECC-1-G3	20	20	sim	4 meses	Genitais/tumor, pulmão, fígado e coração
ECC-1-G3	20	60	sim	sem tumor	-