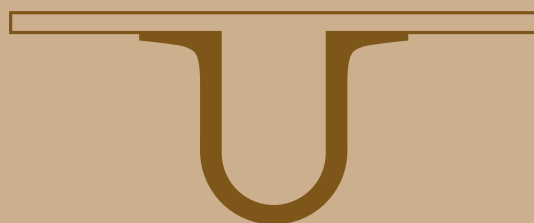




UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Gonçalo Jorge dos Santos Balteiro

RÁDIO-223 NO TRATAMENTO DO CARCINOMA
DA PRÓSTATA METASTÁTICO
ESTUDO DOS EFEITOS EM LINHAS CELULARES NORMAIS

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica,
orientada pela Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho
e pela Professora Doutora Ana Margarida Coelho Abrantes e apresentada
ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia.

Setembro de 2018



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

FACULDADE
DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA

Gonçalo Jorge dos Santos Balteiro

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático

Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica,
orientado pela Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e
pela Professora Doutora Ana Margarida Filomena Abrantes e apresentada ao
Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Setembro 2018

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.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

Marie Curie

Agradecimientos

Seria impossível concluir todo este trabalho de investigação sem o contributo de diversas pessoas e de uma equipa multidisciplinar, a quem estarei sempre grato. Toda a ajuda, os conselhos, a inspiração e a motivação que me deram ao longo desta etapa foram absolutamente fundamentais para a poder concluir da melhor maneira, e por tudo isto não posso deixar de expressar o meu profundo agradecimento:

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, orientadora desta dissertação, Professora da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e diretora do Instituto de Biofísica, pela disponibilidade e pelas críticas construtivas na revisão do manuscrito, e por ser um exemplo na partilha do conhecimento científico.

À Professora Doutora Margarida Abrantes, orientadora desta dissertação e Professora da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela amizade, apoio e disponibilidade constante que sempre demonstrou, por toda a ajuda importante que me deu ao nível do conhecimento científico, e pelo tempo e paciência dedicados à revisão deste manuscrito.

À Mestre Inês Marques, que inicialmente me ensinou tudo aquilo que necessitava saber, pela colaboração constante, por me ter ajudado tanto no laboratório e na análise estatística e por estar sempre disponível.

Ao Dr. Paulo Teixeira, por estar disponível sempre que precisei, pela enorme simpatia e ajuda crucial na obtenção das imagens morfológicas.

Ao Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, nomeadamente aos profissionais do Serviço de Medicina Nuclear por permitir o bom funcionamento deste projeto através da dádiva do radiofármaco ^{223}Ra .

Aos mestres Ricardo Teixo, Rita Neves e Gonçalo Brites, por toda a ajuda que sempre me deram e pelos conselhos experientes que me foram bastante úteis.

Ao Doutor Fernando Mendes, por estar sempre disponível e ter sido importante no aumentar dos meus conhecimentos científicos.

À Isabel, Adriana e Simone, por tornaram o dia a dia no laboratório mais alegre e por toda a ajuda que sempre me deram.

Ao Miguel, por ser um verdadeiro amigo e padrinho que Coimbra me deu, por me ter ajudado sempre a todos os níveis e me ter proporcionado momentos de felicidade.

Ao meu amigo de infância Cristiano, que cresceu comigo e por continuar a ser um bom conselheiro apesar da distância.

Aos meus grandes amigos António e David, que foram durante estes 5 anos os melhores exemplos de amizade que podia ter conhecido.

A todos os restantes colegas e amigos da Faculdade, pelos bons momentos vividos e que ficarão sempre na minha memória.

A toda a família do Sporting Clube Povoense, ao qual pertenço com muito orgulho, pela boa disposição que sempre demonstram, pelos momentos felizes vividos e ainda por viver, e por serem um exemplo de que com trabalho é possível alcançar bons resultados.

Ao meu tio Bruno, pelo interesse que sempre manifestou pela minha vida académica.

Aos meus tios José e Lúcia, e à minha prima Carolina, por estarem sempre presentes, e por todo o carinho que sempre tiveram para comigo.

Aos meus avós Carlos e Fátima, pelo carinho e apoio incondicional, por me tratarem sempre tão bem e me facilitarem a adaptação a Coimbra.

À minha avó Bertina, por ser uma pessoa tão fundamental na minha vida, pela preocupação constante e por querer sempre o melhor para mim

Ao meu avô José, que tão cedo partiu e de forma tão inesperada, o meu agradecimento eterno. Tenho a certeza de que neste momento estarás orgulhoso de tudo o que alcancei.

À Adriana, pelo amor e carinho incondicional que me deu ao longo de toda esta etapa, por me motivar diariamente e ser um exemplo para mim.

Ao meu irmão Ricardo, por ser o meu melhor amigo, por todos os bons momentos vividos e que ainda temos para viver, pela alegria e sensatez que sempre demonstra e por ser o melhor exemplo que podia ter de que com esforço, sacrifício e trabalho tudo é possível de alcançar.

E, por último, aos meus pais, as pessoas mais importantes da minha vida, porque sem eles nada disto seria possível. A educação, o amor, os valores, o conhecimento e o apoio que me transmitiram dia após dia foram sem dúvida a maior motivação que podia ter, orientando-me e direcionando-me sempre no caminho correto. Obrigado por apostarem sempre em mim, pelas palavras certas nos momentos certos, por todos os sacrifícios que fizeram. Tudo isto é por vocês.

Índice

Resumo	3
Abstract	7
Lista de Abreviaturas, Fórmulas e Símbolos	11
I. Introdução	19
1. CANCRO DA PRÓSTATA	21
1.1. Próstata	21
1.2. Epidemiologia.....	22
1.3. Causas.....	24
1.4. Diagnóstico e Estadiamento.....	26
1.5. Tratamento.....	32
2. CARCINOMA DA PRÓSTATA AVANÇADO.....	34
3. CARCINOMA DA PRÓSTATA METASTÁTICO RESISTENTE À CASTRAÇÃO	36
4. TERAPÊUTICA.....	37
5. ²²³ Ra NO TRATAMENTO DO CPMRC.....	39
II. Objetivos	47
III. Materiais e Métodos	49
1. CULTURA CELULAR	51
2. AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DO ²²³ Ra.....	52
3. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DO AZUL DE TRIPANO	53
4. ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO ENSAIO DA SULFORODAMINA B	54
5. ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA CELULAR PELO ENSAIO CLONOGÉNICO	56
6. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA PELO MÉTODO <i>MAY-GRÜNWARD GIEMSA</i>	57
7. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ²²³ Ra EM ESTRUTURAS 3D DE CANCRO DA PRÓSTATA.....	59
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
IV. Resultados*	65
1. AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DO ²²³ Ra.....	67
2. ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO ENSAIO SRB	68
3. ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA CELULAR PELO ENSAIO CLONOGÉNICO	73
4. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA PELO MÉTODO <i>MAY-GRÜNWARD GIEMSA</i>	75
5. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ²²³ Ra EM ESTRUTURAS 3D DE CANCRO DA PRÓSTATA.....	78
V. Discussão	83
VI. Conclusões e Perspetivas Futuras	93
VII. Bibliografia	97

Resumo

O cancro da próstata é o segundo tipo de neoplasia mais frequente em homens a nível mundial e a quinta causa de morte relacionada com o cancro. Nos países mais desenvolvidos, o cancro da próstata é o tipo de cancro mais frequente em homens. A terapia hormonal por privação de androgénios (ADT) tem sido aceite como o tratamento *standard* para o carcinoma da próstata; no entanto, apesar de se observar uma resposta inicial favorável, muitas vezes esta é de curta duração. A fase da doença em que não ocorre resposta à terapêutica por castração e quando simultaneamente surgem metástases ósseas designa-se por cancro da próstata metastático resistente à castração (CPMRC), verificando-se um alto índice de mortalidade. O radiofármaco Rádio-223 (^{223}Ra) surge como alternativa terapêutica por apresentar eficácia comprovada no aumento do tempo médio de sobrevivência do doente, formando complexos com a hidroxiapatite em áreas de remodelação óssea.

O objetivo primordial deste projeto foi compreender os efeitos do ^{223}Ra numa linha celular normal, não tumoral, e realizar testes complementares de modo a comparar os resultados obtidos entre as células tumorais e as células normais.

Numa primeira fase desta dissertação avaliou-se a cinética do ^{223}Ra numa linha normal do epitélio da próstata, a linha RWPE-1, através da realização dos estudos de captação. De seguida estudou-se os efeitos nas três linhas celulares ao nível da proliferação celular, com recurso ao ensaio SRB, e da sobrevivência celular, obtendo os fatores de sobrevivência celular através do ensaio clonogénico. Os efeitos do ^{223}Ra foram igualmente estudados a nível morfológico através do método de coloração *May-Grünwald Giemsa* e por fim desenvolveu-se e foi otimizado um protocolo de obtenção de estruturas tridimensionais de células, sujeitando-as aos efeitos do ^{223}Ra . Os efeitos foram estudados recorrendo ao ensaio de morfologia.

Verificou-se que existe captação de ^{223}Ra por parte das células da linha RWPE-1, sendo, no entanto, inferior comparativamente com as linhas celulares tumorais. Através do ensaio SRB, 48 horas após a irradiação, na linha celular RWPE-1 não ocorreu alterações na proliferação celular comparativamente com as linhas celulares tumorais PC3 e LNCaP, que sofreram uma diminuição da proliferação com o aumento da dose. No entanto, no ensaio SRB 8 dias após a irradiação, a linha celular RWPE-1 sofreu uma diminuição na proliferação celular comparativamente com as linhas celulares PC3 e LNCaP. Estes dados são corroborados pelo ensaio clonogénico, pois também se verifica uma diminuição do fator de sobrevivência para a linha celular RWPE-1.

A análise da morfologia revelou evidências de necrose para as linhas celulares tumorais, 48 horas após a irradiação, sendo que para a linha celular RWPE-1 não são visíveis aspetos típicos de morte celular. Estes dados corroboram os resultados obtidos no ensaio SRB realizado 48 horas após a exposição ao ^{223}Ra .

Os ensaios preliminares realizados com o objetivo de obter culturas 3D da linha celular tumoral PC3 através do método de levitação magnética foram bem-sucedidas, tendo-se obtido culturas com organização espacial esférica, conferindo-lhes um aspeto tridimensional. Na análise morfológica não foram visíveis os aspetos morfológicos de morte celular esperados.

Assim, com este trabalho foi possível concluir que o ^{223}Ra apresenta maior seletividade para as linhas tumorais do que para as células normais, e que o seu efeito aumenta com o aumento da dose e também com o tempo após a irradiação. No que diz respeito às culturas 3D de células tumorais de cancro da próstata foi possível estabelecer um protocolo de execução capaz de ser reproduzível em ensaios futuros.

Palavras-chave: Rádio-223; cancro da próstata; RWPE-1; efeitos da radiação.

Abstract

Prostate cancer is the second most common form of neoplasm in men worldwide and the fifth leading cause of cancer-related death. In developed countries, prostate cancer is the most common type of cancer in men. Androgen deprivation hormone (ADT) therapy has been accepted as the standard treatment for prostate carcinoma; however, despite the favorable initial response which can be observed, it is often short-lived. The stage of the disease in which there is no response to castration therapy and when bone metastases occur simultaneously is called castration-resistant metastatic prostate cancer (CPMRC), with a high mortality rate. The Radium-223 (^{223}Ra) is a therapeutic alternative because it has proved effective in increasing the patient average survival time, forming complexes with hydroxyapatite in areas of bone remodeling.

The primary objective of this project was to understand the effects of ^{223}Ra on a normal, non-tumor cell line and to perform complementary tests to compare the results obtained between tumor cells and normal cells.

In a first part of this dissertation, the kinetics of ^{223}Ra were evaluated in a normal cell line of prostate epithelium, the RWPE-1 cell line, through the uptake studies. The effects on the three cell lines at the level of cell proliferation, using the SRB assay, and cell survival, were then studied, obtaining the cell survival factors through the clonogenic assay. The effects of ^{223}Ra were also studied at the morphological level through the method of staining May-Grünwald Giemsa and finally a protocol for obtaining three-dimensional cell structures was developed to study ^{223}Ra effects using morphology assay.

^{223}Ra uptake by RWPE-1 cells was lower compared to tumor cell lines. Through the SRB assay, 48 hours after irradiation, in the RWPE-1 cell line there were no changes in cell proliferation compared to the PC3 and LNCaP tumor cell lines, which underwent a decrease in proliferation with increasing radiation dose. However, in the SRB assay 8 days after irradiation, the RWPE-1 cell line suffered a decrease in cell proliferation compared to the PC3 and LNCaP cell lines. These data were corroborated by the clonogenic assay, in which there was also a decrease in the survival factor for the RWPE-1 cell line.

Morphology analysis revealed evidence of necrosis for tumor cell lines 48 hours after irradiation, and typical aspects of cell death are not visible for the RWPE-1 cell line. These data corroborate the results obtained in the SRB assay performed 48 hours after exposure to ^{223}Ra .

Preliminary tests performed with the objective of obtaining 3D cultures of the PC3 tumor cell line through the magnetic levitation method were successful, obtaining cultures with spherical spatial organization, giving them a three-dimensional appearance. In the morphological analysis the morphological aspects of expected cell death were not visible.

Thus, with this work it was possible to conclude that ^{223}Ra presents greater selectivity for tumor lines than for normal cells, its effect increases with increasing dose and with time after irradiation. With respect to 3D cultures of prostate cancer tumor cells it has been possible to establish an implementation protocol capable of being reproducible in future lab experiences.

Key-words: Radium-223; prostate cancer; RWPE-1; radiation effects.

Lista de Abreviaturas, Fórmulas e Símbolos

^{223}Ra : Rádio-223

^{227}Ac : Actínio-227

AA: Acetato de Abiraterona

ATCC: *American Type Culture Collection*

ADT: *Androgen-Deprivation Therapy*

Bq: Becquerel

BRCA1: *Breast cancer 1, early onset*

BRCA2: *Breast cancer 2, early onset*

Ci: Curie

CO₂: Dióxido de Carbono

CPMRC: Carcinoma da Próstata Metastático Resistente à Castração

CPRC: Carcinoma da Próstata Resistente à Castração

DHT: 5 α -Dihidrotestosterona

DNA: *Deoxyribonucleic Acid*

DRE: *Digital Rectal Examination*

EMA: *European Medicines Agency*

FBS: *Fetal Bovine Serum*

FDA: *Food and Drug Administration*

FS: Fator de Sobrevivência Celular

Gy: Gray

HBP: Hiperplasia Benigna Prostática

HOXB13: *Homeobox B13*

LET: *Linear Energy Transfer*

LH: *Luteinizing Hormone*

LHRH: *Luteinizing hormone–releasing hormone*

MLM: Método de Levitação Magnética

MSH2: MutS Homolog 2

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PE: *Plate efficiency*

PSA: *Prostate-specific antigen*

RA: Recetor de androgénios

ROS: *Reactive Oxygen Species*

SRB: Sulforodamina B

SFM: *Keratinocyte Serum-Free Growth Medium*

T_{1/2}: Tempo de semi-desintegração

Índice de Tabelas e Figuras

Índice de Tabelas

Tabela I: Tempo correspondente à irradiação de 0,2 mL de suspensão celular, calculado para uma atividade inicial variável, para as respetivas doses escolhidas	55
Tabela II: Tempo correspondente à irradiação de 0,2 mL de suspensão celular, calculado para uma atividade inicial constante de 0,3 mCi, para as respetivas doses escolhidas.....	56
Tabela III: Tempos correspondentes à irradiação de 2 mL de suspensão celular, calculado para uma atividade inicial constante de 0,5 µCi, para as respetivas doses escolhidas.....	58
Tabela IV: Tempos correspondentes à irradiação de 0,25 mL de suspensão celular, calculado para uma atividade inicial variável, para as respetivas doses escolhidas	61
Tabela V: Significância estatística na comparação entre linhas celulares para o ensaio SRB 48 horas após a irradiação	71
Tabela VI: Significância estatística na comparação entre linhas celulares para o ensaio SRB 8 dias após a irradiação.....	73
Tabela VII: Significância estatística na comparação entre linhas celulares para o ensaio clonogénico	75

Índice de Figuras

Figura 1: Localização da próstata no sistema reprodutor masculino (Adaptado de American Cancer Society, 2016).....	21
Figura 2: Incidência e mortalidade do cancro da próstata a nível mundial (Adaptado de GLOBOCAN, 2012).....	23
Figura 3: Incidência e mortalidade por cancro relativo ao sexo masculino, em Portugal, por cada 100 mil habitantes. A cor azul representa a incidência e a vermelha a mortalidade. (Adaptado de GLOBOCAN, 2012).....	24
Figura 4: Hereditariedade do cancro da próstata: mutações mais conhecidas. Adaptado de (Adjakly et al.,2015).....	26
Figura 5: Relação entre as concentrações séricas de PSA e o risco de cancro da próstata. Adaptado de (Heidenreich et al.,2011).....	27
Figura 6: Esquema representativo de todos os passos a seguir na fase de deteção precoce do cancro da próstata. Adaptado de (Greene et al., 2009)	29
Figura 7: Escala de Gleason. Adaptado de (Shah e Zhou, 2016).....	30
Figura 8: Sistema de classificação TNM para cancro da próstata. Adaptado de (Li et al, 2013)	31
Figura 9: Alterações nos RA que conduzem ao falhanço da terapêutica. Adaptado de (Knudsen e Penning, 2010).....	35

Figura 10: Mecanismo de ação da sipuleucel-T. Adaptado de (Handy e Antonarakis, 2018).....	39
Figura 11: Mecanismo de interação do Rádio-223 em células de metástases ósseas. Adaptado de (Marques et al., 2018)	40
Figura 12: Comparação entre um emissor de partículas alfa como o Rádio-223 e um emissor de partículas beta ao nível do seu raio de ação no osso. Adaptado de (Shore, 2015)	41
Figura 13: Cadeia de decaimento do rádio-223. Adaptado de (EMA)	42
Figura 14: Vantagens da cultura 3D de células. Adaptado de (Ravi et al., 2014)	60
Figura 15: Placa de levitação magnética (Biosciences, Inc TM).....	61
Figura 16: Concentrating drive (Biosciences, Inc TM).....	62
Figura 17: Avaliação da percentagem de captação de ²²³ Ra na linha celular de tecido normal da próstata, a linha celular epitelial RWPE-1. Os ensaios expressam a média percentual±erro padrão de pelo menos 6 experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas representam-se com *** para p<0,001 quando comparados os diferentes tempos em relação à condição inicial t=0.	67
Figura 18: Avaliação da percentagem de captação de ²²³ Ra na linha celular de tecido normal da próstata, a linha celular epitelial RWPE-1, e das linhas celulares de cancro da próstata humanas, as linhas celulares LNCaP e PC3, para os tempos definidos de 5, 60 e 120 minutos. Os ensaios expressam a média percentual±erro padrão de pelo menos 6 experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas representam-se com # para p<0,05 e ### para p<0,001 quando comparados os tempos entre si.	68
Figura 19: Avaliação da proliferação celular com recurso ao ensaio SRB da linha celular de tecido normal da próstata, a linha celular epitelial RWPE-1, e das linhas celulares de cancro da próstata humanas, as linhas celulares LNCaP e PC3, após irradiação com doses de 1, 4 e 10 mGy de ²²³ Ra. Os ensaios foram realizados 48h após a irradiação, expressando a média percentual±erro padrão de pelo menos 6 experiências independentes. A condição controlo foi normalizada a 100% e os resultados das restantes condições indicam a percentagem de proliferação relativamente ao controlo. As diferenças estatisticamente significativas representam-se com *** para p<0,001 quando avaliada a percentagem de proliferação celular de cada dose em cada linha celular relativamente à condição controlo. As diferenças estatisticamente significativas representam-se com # para p<0,05 e ### para p<0,001 quando comparadas os valores de proliferação celulares entre as diferentes doses de irradiação.	69
Figura 20: Avaliação da proliferação celular com recurso ao ensaio SRB da linha celular de tecido normal da próstata, a linha celular epitelial RWPE-1, e das linhas celulares de cancro da próstata humanas, as linhas celulares LNCaP e PC3, após irradiação com doses de 1, 4 e 10 mGy de ²²³ Ra. Os ensaios foram realizados 8 dias após a irradiação, expressando a média percentual±erro padrão de pelo menos 6 experiências independentes. A condição controlo foi normalizada a 100% e os resultados	

das restantes condições indicam a percentagem de proliferação relativamente ao controlo. As diferenças estatisticamente significativas representam-se com *** para $p < 0,001$ quando avaliada a percentagem de proliferação celular de cada dose em cada linha celular relativamente à condição controlo. As diferenças estatisticamente significativas representam-se com ## para $p < 0,01$ e ### para $p < 0,001$ quando comparadas os valores de proliferação celulares entre as diferentes doses de irradiação..... 72

Figura 21: Análise da sobrevivência celular da linha celular de tecido normal da próstata, a linha epitelial RWPE-1, e das linhas celulares de cancro da próstata humano, as linhas celulares LNCaP e PC3, após irradiação com doses de 1, 4 e 10 mGy. Os gráficos expressam a média percentual \pm erro padrão de pelo menos 8 ensaios independentes. As diferenças estatisticamente significativas representam-se com * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$ quando avaliada a condição (dose) e respetivo controlo. As diferenças estatisticamente significativas representam-se com ## para $p < 0,01$ e ### para $p < 0,001$ quando comparados os valores dos fatores de sobrevivência entre as diferentes doses de irradiação..... 74

Figura 22: Análise morfológica das células RWPE-1, PC3 e LNCaP após coloração das células com recurso ao corante May-Grünwald-Giemsa. As linhas celulares foram expostas a doses de 0,4 e 4 mGy de ^{223}Ra , para além da ausência de exposição à radiação (Controlo). Os ensaios foram realizados 48h após a irradiação. As imagens foram obtidas com recurso a um microscópio ótico e apresentam-se com uma ampliação de 400x. 77

Figura 23: Análise morfológica da estrutura 3D das células PC3 após aplicação do método de levitação magnética. Os resultados foram obtidos expondo as linhas celulares à dose de 10 mGy de ^{223}Ra , para além da ausência de exposição à radiação (Controlo). Os ensaios foram realizados 48h após a irradiação. As imagens foram obtidas com recurso a um microscópio ótico e apresentam-se com uma ampliação de 400x..... 79

I. Introdução

1. CANCRO DA PRÓSTATA

1.1. Próstata

A próstata é um órgão parcialmente glandular e muscular que se encontra exclusivamente no sistema genital masculino. A sua principal função é a produção de um fluido alcalino que faz parte da constituição do sêmen, contribuindo para a sua mobilidade e nutrição (Dunn e Kazer, 2011).

Em termos anatómicos, a próstata encontra-se localizada inferiormente à bexiga e em anteriormente ao reto (Figura 1). Lateral e medialmente encontram-se também as vesículas seminais, responsáveis pela produção do líquido seminal que se vai juntar à secreção prostática e aos espermatozoides. A uretra atravessa a próstata e transporta a urina e o esperma para o exterior através do pênis. As dimensões prostáticas variam de acordo com a idade, podendo tornar-se bastante maior em homens mais velhos (Bosch *et al.*, 2007).

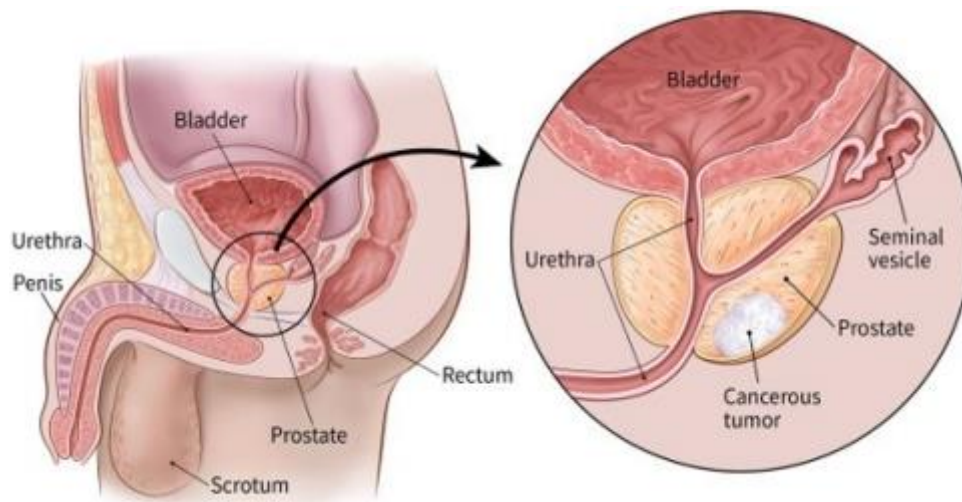


Figura 1: Localização da próstata no sistema reprodutor masculino (Adaptado de American Cancer Society, 2016)

O tamanho anatómico médio de uma próstata saudável de um adulto jovem é de cerca de 28 a 47 cm (Dunn e Kazer, 2011).

Ao longo do século XX, McNeal desenvolveu um conjunto de estudos que lhe permitiram criar um modelo estrutural para a próstata, dividindo-a em 4 secções histologicamente distintas e separadas anatomicamente, sendo 3 delas glandulares, a zona

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

periférica, a zona central e a zona de transição, e secção zona não glandular denominada de zona fibromuscular e que se localiza anteriormente.

A zona periférica constitui cerca de 70% de todo o tecido glandular. Esta zona cobre a parte posterior e lateral da próstata, sendo a parte que é palpável aquando do exame do toque retal (DRE, derivado do inglês *digital rectal examination*). Esta área é onde normalmente se localizam a grande maioria dos carcinomas e outras patologias benignas como a prostatite crónica (Muruve, 2017).

A zona central é a área que envolve os ductos ejaculatórios, corresponde a 25% da área glandular. Poucos cancros se desenvolvem nesta região, representando entre 1 a 5% da totalidade dos tumores na próstata (Muruve, 2017). As diferenças histológicas acentuadas entre esta zona e a zona periférica conferem diferenças biológicas importantes (Mcneal, 1981). A zona central é descrita como uma porção de tecido glandular que constitui a maioria da base da próstata (Aaron *et al.*, 2016).

A zona de transição é descrita como tendo dois lóbulos laterais. A zona de transição é onde a hiperplasia benigna prostática ocorre e pode levar à obstrução da bexiga onde um adenoma pode crescer até atingir um tamanho significativo (Muruve, 2017). A zona de transição é constituída por dois lóbulos iguais de tecido glandular lateralmente à uretra. Esta porção da próstata está envolvida maioritariamente no desenvolvimento de hiperplasia benigna prostática (HBP) (Hammerich *et al.*, 2009).

A zona fibromuscular anterior representa 30% do volume da próstata, não tem qualquer elemento glandular e é praticamente composta somente de tecido muscular liso e fibroso (Marangoni, 2011).

1.2. Epidemiologia

O cancro da próstata é o segundo tipo de cancro mais frequente em homens a nível mundial e a quinta causa de morte relacionada com o cancro, estimando-se que 1,3 milhões de novos casos ocorram em 2018. Nos países mais desenvolvidos, no entanto, o cancro da próstata é mesmo o mais frequente em homens (GLOBOCAN, 2018),

A taxa de mortalidade deste tipo de cancro tem vindo a diminuir ao longo dos anos, especialmente na Europa e nos Estados Unidos. Este facto tem sido associado a uma deteção cada vez mais precoce, em estádios onde ainda é possível tratar, a um maior conhecimento

dos fatores de risco e causas e também à melhoria das terapêuticas disponíveis (Center *et al.*, 2012).

A incidência e a mortalidade diferem muito consoante a região geográfica, como podemos ver na figura 2. As incidências mais altas ocorrem na Austrália/Nova Zelândia, Este da Europa, Norte da Europa e América do Norte, e a mais baixa ocorre no continente Asiático. Relativamente à taxa de mortalidade, a mais alta encontra-se na região do Caribe e no continente Africano, a mais baixa na Ásia (GLOBOCAN, 2018). Existem várias explicações para esta diferença tão acentuada nas taxas de mortalidade entre países. Estas grandes diferenças podem dever-se ao fator ambiental, às diferenças de tratamento e à má atribuição da causa de morte. Um estudo efetuado comparou os dados estatísticos do cancro da próstata da população masculina Japonesa imigrante no Estados Unidos com população masculina Japonesa a viver no Japão e concluiu que no caso da população migrante as suas estatísticas começam-se a assemelhar às da população local. A faixa etária aquando da emigração e o número de anos que decorreram após a mudança parece relacionar-se com essa diferença (Shimizu *et al.*, 1991).

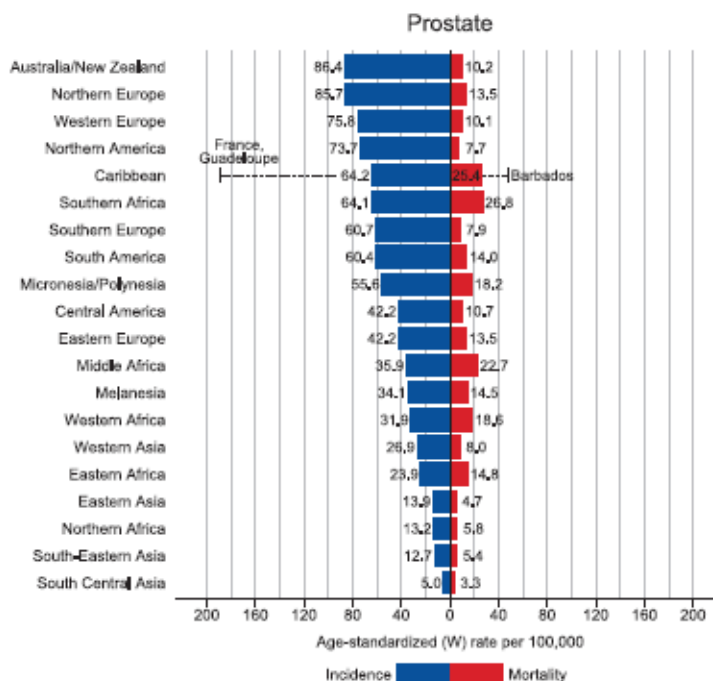


Figura 2: Incidência e mortalidade do cancro da próstata a nível mundial (Adaptado de GLOBOCAN, 2018)

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

Entre os anos de 1986 e 2006 verificou-se uma alteração na taxa de mortalidade por cancro da próstata em Portugal, diminuído cerca de 3,1% por ano (Bastos *et al.*, 2011). Dados relativos a 2012 indicam que em Portugal o cancro da próstata é a uma das principais causas de morte oncológica, sendo mesmo a neoplasia com maior incidência no sexo masculino (Figura 3). Anualmente têm sido registados 6662 novos casos e cerca de 1500 mortes derivadas deste tumor (Marques, 2016).

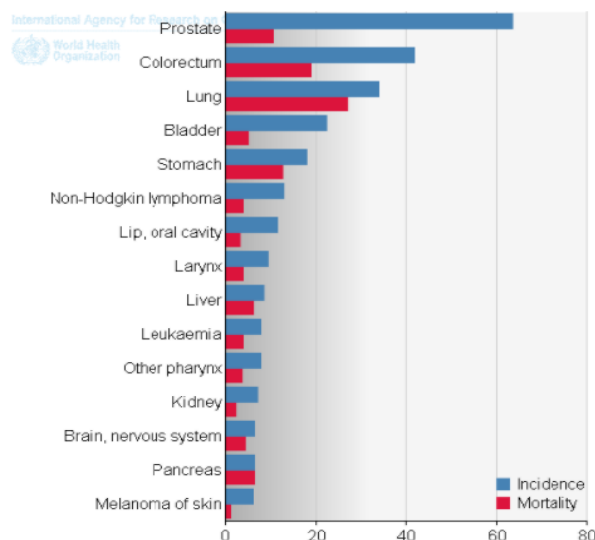


Figura 3: Incidência e mortalidade por cancro relativo ao sexo masculino, em Portugal, por cada 100 mil habitantes. A cor azul representa a incidência e a vermelha a mortalidade. (Adaptado de GLOBOCAN, 2012)

1.3. Causas

O fator de risco mais importante no desenvolvimento do cancro da próstata é a idade avançada. Estudos estatísticos demonstram que 75% dos casos envolvem homens com idade superior a 65 anos (Spickett e Robertson, 2011), e que é muito raro que aconteça em idades inferiores a 40 anos. Estes dados demonstram que o envelhecimento tem um papel fundamental na probabilidade de ter ou não ter a doença. No entanto existem outras causas que também fazem variar as taxas de incidência, como é o caso da etnia.

É ainda muito pouco claro a influência da etnia no desenvolvimento do cancro da próstata, podendo estar relacionada com fatores como o acesso às condições de saúde e educação, nutrição e ambiente (Dunn e Kazer, 2011). No entanto, é um facto que o grupo racial e étnico afro-americano é aquele que apresenta o risco mais elevado de metastização e

maior mortalidade, principalmente numa idade jovem e comparando com a população caucasiana, devendo-se a uma possível instabilidade biológica desta população (Powel *et al.*, 2014). Uma das hipóteses mais fortes é o elevado nível de testosterona na circulação sanguínea que os indivíduos de etnia africana apresentam, superior a todos os restantes grupos. A testosterona é o principal potenciador do crescimento da próstata, e as concentrações séricas de di-hidrotestosterona (DHT), formada a partir da catálise promovida pela enzima 5 α -redutase, correlacionam-se com o risco de cancro da próstata (Zeigler-Johnson *et al.*, 2008).

O histórico familiar é outro fator de risco associado ao desenvolvimento desta doença. O risco de ter carcinoma na próstata em homens que tenham um familiar de primeiro grau com a doença aumenta exponencialmente (American Cancer Society, 2016). Esse risco depende do número de familiares que tenham a doença e da idade a que o diagnóstico ocorre, aumentando ainda mais se esse familiar for diagnosticado numa idade inferior a 60 anos (Hogle, 2009). Estudos efetuados demonstraram que o risco é cinco vezes maior se o número de familiares diretos com histórico da doença for superior a dois (Bashir, 2015).

Estudos genómicos identificaram mais de 100 variantes que se relacionam com o risco hereditário de cancro da próstata (Figura 4). Mutações em genes, tais como *BRCA1* (*Breast cancer 1, early onset*), *BRCA2* (*Breast cancer 2, early onset*), *MSH2* (*MutS Homolog 2*) e *HOXB13* (*Homeobox B13*), também estão associadas a cancros mais agressivos e numa idade mais jovem, com a mutação no gene *BRCA2* (associada ao cancro da mama) a representar entre 1,2 a 1,8% da globalidade de casos (Pritchard *et al.*, 2016). Em muitos dos casos ainda não se conhece de forma exata o mecanismo que faz com que as mutações tenham influência no processo da carcinogénese, como é o caso do gene *HOXB13*. Este gene codifica um fator de transcrição importante durante o desenvolvimento embrionário, mas também se sabe que participa no processo de carcinogénese porque regula a transcrição do recetor de androgénios (RA), e é essa interação que promove a diferenciação do tumor (Adjakly *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016).

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

Disease or comorbidity	Genes (locus)	Mutations/Variants
Hereditary prostate cancer	<i>HPC1/RNAS EL (1q24-25)</i>	Mutations: E265X, MetIle, 471delAAAG; Variants: Arg462Gin, Glu541Asp
	<i>PCaP (1q42-43)</i> <i>HPCX (Xq27-28)</i> <i>HPC20(20q13) (17p11)</i>	Unidentified Unidentified Unidentified
	<i>PG1/MSR1 (8q 22-23)</i>	Mutations: Arg293X, Asp174Tyr, Pro36Ala, Ser41Tyr, Val113Ala, Gly369Ser, His441Arg Variants: Pro275Ala, PRO3, INDEL1, IVS5-59, INDEL7
Hereditary prostate cancer/breast cancer	<i>BRCA2 (13q12-13)</i>	6051delA (exon11), 999del5, 617del5
Hereditary prostate cancer/brain cancer	<i>CAPB (1q36)</i>	Unidentified

Figura 4: Hereditariedade do cancro da próstata: mutações mais conhecidas. Adaptado de (Adjakly *et al.*, 2015)

1.4. Diagnóstico e Estadiamento

O diagnóstico do cancro da próstata numa fase inicial é de extrema importância de forma a evitar as complicações associadas à progressão da doença. Alguns dos exames utilizados neste diagnóstico são o exame do toque retal e a deteção do antigénio específico da próstata (PSA, derivado do inglês *prostate-specific antigen*) (Heidenreich *et al.*, 2011).

O toque retal enquanto exame da próstata é um exame físico importante na avaliação clínica dos doentes com cancro prostático. Tem como objetivo avaliar o tamanho, a consistência e a forma da próstata, para identificar a presença de nódulos. Apesar da sua importância, o facto de apenas ser possível a palpação das partes posterior e lateral da próstata faz com que este exame apresente algumas limitações, pois 40% a 50% dos tumores podem não ser detetados (Amorim *et al.*, 2011).

O PSA é uma proteína com função enzimática (protease) produzida pelas células epiteliais da próstata. É um elemento do fluído seminal necessário para a ejaculação, estando presente na circulação sanguínea. Quanto mais elevado for o valor sérico de PSA, maior será o risco de ter cancro da próstata (Figura 5). Este exame é bastante sensível, mas pouco específico (Dunn e Kazer, 2011; Bacelar Júnior *et al.*, 2015).

PSA level, ng/ml	Risk of PCa, %
0–0.5	6.6
0.6–1	10.1
1.1–2	17.0
2.1–3	23.9
3.1–4	26.9

PCa = prostate cancer; PSA = prostate-specific antigen.

Figura 5: Relação entre as concentrações séricas de PSA e o risco de cancro da próstata.
Adaptado de (Heidenreich *et al.*, 2011)

Problemas na arquitetura normal da próstata, como traumas ou prostatite associada ao envelhecimento, provocam o aumento da concentração de PSA circulante. O uso da avaliação da concentração de PSA, embora reconhecido enquanto método de diagnóstico populacional e de seguimento, permanece controverso e algo imperfeito devido a evidências de sobrediagnóstico e sobretratamento. O facto do PSA ser sintetizado tanto pelas células do cancro da próstata como pelas células normais faz com que este não seja um biomarcador específico e ideal (Greene *et al.*, 2009).

Uma das formas de aumentar a especificidade e a seletividade do teste, especialmente na presença de baixas concentrações totais, é utilizar a fração livre do PSA. No plasma a maior parte do PSA está ligado às proteínas do plasma (forma complexada), enquanto outra porção se encontra livre. Doentes com cancro da próstata têm tendência para ter menores valores de PSA livre, uma vez que as células malignas da próstata estão associadas à produção de PSA que se liga a proteínas plasmáticas. Logo, quanto menor for a percentagem de PSA livre relativamente ao PSA total, maior será a probabilidade de estarmos perante um caso de cancro da próstata. Desta forma é possível reduzir o número de biópsias para níveis de PSA entre 4.0 e 10,0 ng/mL. (Greene *et al.*, 2009; Larcher e Hughes, 2015).

Na Europa a biópsia prostática é recomendada quando as concentrações séricas de PSA são superiores a 4 ng/mL (Bacelar Júnior *et al.*, 2015).

As concentrações séricas de PSA variam consoante a idade e a raça, existindo variações associadas a fatores genéticos, à toma de fármacos e à obesidade (Fowke *et al.*, 2006; Loeb *et*

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

al., 2012). Apenas cerca de 25% dos homens com níveis de PSA entre 4,0 e 10,0 ng/mL apresentam biópsias positivas (Lewis *et al.*, 2017).

A incorporação do PSA na prática clínica alterou a epidemiologia do cancro da próstata. Não sendo um biomarcador ideal, atualmente é o mais usado no diagnóstico e no seguimento deste tipo de cancro, sendo a principal ferramenta disponível para estimar o estado do tumor (Placer e Morote, 2011).

No fundo, o teste do PSA é usado para definir e caracterizar o cancro da próstata de modo a escolher a terapia adequada a utilizar (Figura 6).

Candidatos para testes de deteção precoce:

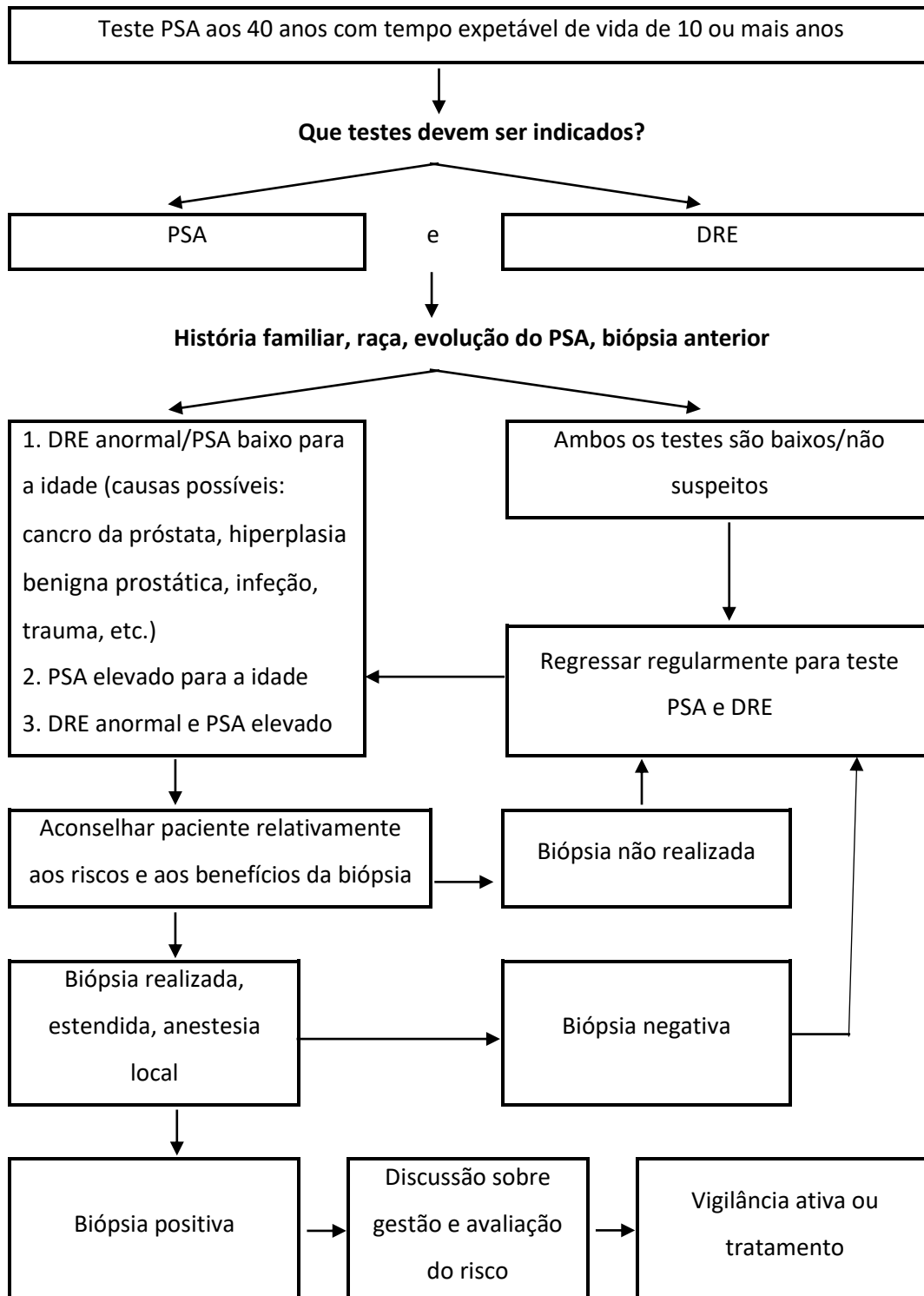


Figura 6: Esquema representativo de todos os passos a seguir na fase de deteção precoce do cancro da próstata. Adaptado de (Greene *et al.*, 2009)

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

O método de classificação mais utilizado para avaliar histologicamente o tecido prostático e estratificar as biópsias do cancro da próstata, influenciando a estratégia de tratamento posterior, é a escala de Gleason. As alterações são classificadas em cinco graus, numerados de 1 a 5, o que permite caracterizar a sua diferenciação relativamente ao tecido normal. O grau 1 corresponde a um tumor bem diferenciado e o grau 5 corresponde a um tumor muito pouco diferenciado (Figura 7) (Tabesh *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2004).

O resultado final da classificação de Gleason corresponde à soma de 2 componentes: o grau do padrão predominante (primário) e o grau do padrão secundário, sendo que o resultado pode ir de 2 (1+1) a 10 (5+5) (Bacelar Júnior *et al.*, 2015).

Existe uma grande quantidade de definições de cancro da próstata de “baixo risco”. Atualmente a mais aceite a nível mundial foi introduzida por D’Amico e corresponde a um grau de Gleason igual ou inferior a 6, PSA menor que 10 mg/mL, e um tumor que ou não é palpável ou é palpável somente em menos de metade de um lóbulo da próstata (Klotz, 2013).

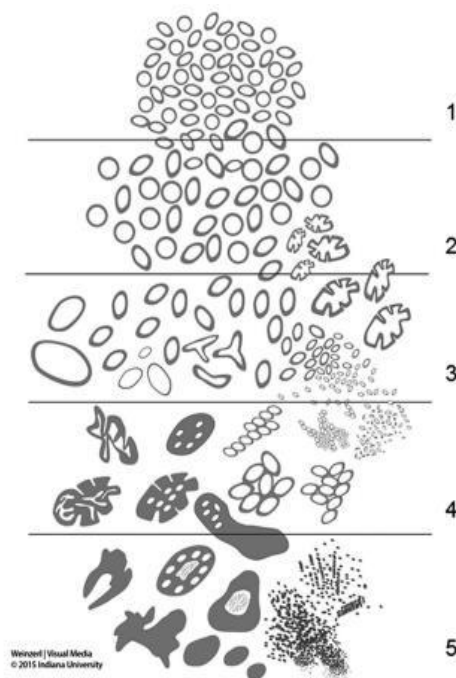


Figura 7: Escala de Gleason. Adaptado de (Shah e Zhou, 2016)

Relativamente ao sistema de estadiamento, o sistema TNM [tumor primário (T); gânglios linfáticos (N); metástases à distância (M)] para o cancro da próstata foi definido em 1992, quando a International Union Against Cancer e a American Joint Committee on Cancer

se juntaram para adotar um critério unificado sobre o estadiamento do cancro (Andreou e Cheng, 2010).

Embora este sistema seja aceite como um todo pela comunidade científica, ainda existe alguma incerteza na aplicação de algumas subclassificações (Cheng *et al.*, 2011).

Analisando este sistema de estadiamento da próstata (Figura 8) é possível dividir a patologia em três grupos: confinada à próstata, quando se encontra apenas aí localizada, sendo detetáveis clinicamente e radiologicamente e onde se inclui o T1 e o T2 (a ausência ou a existência de um nódulo na próstata detetado aquando do toque retal define a categoria T1 ou T2); avançada, quando a doença evolui para além da cápsula prostática, designando-se por T3, e atinge até estruturas adjacentes (T4); e o cancro da próstata metastizado, em que o tumor avança para a região dos gânglios linfáticos (N) e forma metástases distantes no osso (M) (Soylu *et al.*, 2012).

Evaluation of the (primary) tumor (T)	
Clinical	
TX: can not evaluate primary tumor	
T0: no evidence of primary tumor	
T1: clinically inapparent tumor neither palpable nor visible by imaging	
T1a: tumor was incidentally found in less than 5% of prostate tissue resected	
T1b: tumor was incidentally found in more than 5% of prostate tissue resected	
T1c: tumor was found in a needle biopsy performed because of elevated serum PSA	
T2: tumor confined within prostate ¹	
T2a: the tumor is in half or less than half of one of the prostate gland's 2 lobes	
T2b: the tumor is in more than half of one lobe, but not both	
T2c: the tumor is in both lobes	
T3: the tumor has spread through the prostatic capsule (if it is only part-way through, it is still T2)	
T3a: the tumor has spread through the capsule on one or both sides	
T3b: the tumor has invaded one or both seminal vesicles	
T4: the tumor has invaded adjacent structures other than seminal vesicles (e.g. external sphincter, rectum, bladder, levator muscles, and/or pelvic wall)	
Pathologic (pT) ²	
pT2: organ confined	
pT2a: unilateral, one-half of one side or less	
pT2b: unilateral, involving more than one-half of side but not both sides	
pT2c: bilateral disease	
pT3: extraprostatic extension	
pT3a: extraprostatic extension or microscopic invasion of bladder neck	
pT3b: seminal vesicles invasion	
pT4: Invasion of rectum, levator muscles, and/or pelvic wall	
Evaluation of the regional lymph nodes (N)	
(p)NX: regional lymph nodes were not assessed (sampled)	
(p)N0: there has been no spread to the regional lymph nodes	
(p)N1: there has been spread to the regional lymph nodes	
Evaluation of distant metastasis (M)	
M0: there is no distant metastasis	
M1: there is distant metastasis	
M1a: the cancer has spread to lymph nodes beyond the regional ones	
M1b: the cancer has spread to bone	
M1c: the cancer has spread to other sites (regardless of bone involvement)	

Figura 8: Sistema de classificação TNM para cancro da próstata. Adaptado de (Li *et al.*, 2013)

1.5. Tratamento

Após a realização do diagnóstico existem algumas opções terapêuticas que podem ser tidas em consideração, entre as quais se incluem: a vigilância ativa, a prostatectomia radical, a irradiação por fonte externa, a braquiterapia e a crioterapia (Santos *et al.*, 2004).

A vigilância ativa pretende ser uma alternativa ao tratamento imediato de caráter curativo, evitando assim um tratamento mais agressivo em tumores localizados e pouco significativos. Embora os critérios de inclusão na vigilância ativa variem de instituição para instituição, de uma forma geral os dados clínicos mais relevantes usados para definir possíveis candidatos ao tratamento de vigilância ativa incluem o grau de Gleason ser menor ou igual a 6, a concentração plasmática de PSA ser inferior a 10 ng/mL, estágio clínico T1c ou T2a, números de *cores* positivos na biopsia não superior a 2 e percentagem de cancro por *core* inferior a 50% (Montironi *et al.*, 2014; Dall’Era *et al.*, 2008). O aparecimento do teste do PSA fez com que o diagnóstico numa fase mais inicial do cancro da próstata tivesse crescido, o que, por conseguinte, tornou o método de vigilância ativa mais frequente. É uma alternativa terapêutica para homens com uma esperança média de vida de 10 anos. O protocolo inclui medições regulares dos níveis de PSA e realização periódica de biópsias e de DRE (Dunn e Kazer, 2011).

A prostatectomia radical é considerada o tratamento *standard* em doentes com uma esperança média de vida superior a 10 anos e cujo carcinoma está confinado à próstata. Consiste na remoção completa do tecido prostático, sendo que a laparoscopia e a prostatectomia com recurso a um robot são os métodos clínicos mais usados. Embora apresente bons resultados a longo prazo, o tratamento cirúrgico está associado a problemas como a incontinência urinária e a disfunção erétil (Alves *et al.*, 2015; Mohler *et al.*, 2007; DeFode *et al.*, 2011).

A irradiação por fonte externa tem algumas vantagens em relação à prostatectomia radical, pois evita as complicações associadas à cirurgia e à anestesia, como hemorragia, possíveis embolia pulmonar e/ou enfarte do miocárdio. Por esta razão é a mais indicada para doentes com maior risco cirúrgico, nomeadamente doentes com problemas cardíacos e idosos (Mohler *et al.*, 2007; Júnior, 2017). Atualmente os sistemas modernos de radioterapia

conformacional 3D e de radioterapia de intensidade modulada têm sido cada vez mais usados porque permitem a entrega de doses de radiação mais elevadas diretamente na zona tumoral, com efeitos secundários menores nos tecidos adjacentes e melhores taxas de sucesso em termos de sobrevivência (Zelevsky *et al.*, 2010; Heidenreich *et al.*, 2011).

A braquiterapia está relacionada com a distribuição de fontes/sementes radioativas nos tecidos prostáticos, sendo guiada por ecografia. Existem 2 modalidades diferentes: braquiterapia de baixo débito de dose, que envolve a introdução de sementes permanentes que vão gradualmente perdendo a sua radioatividade, e a braquiterapia de alto débito de dose, que é temporária e geralmente usada em combinação com a irradiação por fonte externa. São candidatos a ambas as abordagens doentes de baixo risco, sem problemas de obstrução da uretra, com um volume da próstata inferior a 60 cm³ e sem antecedentes de cirurgia prostática (Dunn e Kazer, 2011). A braquiterapia está estabelecida como um tratamento primário do carcinoma da próstata localizado e a sua capacidade para ultrapassar dificuldades como o movimento do órgão tornam esta técnica mais vantajosa relativamente à irradiação de fonte externa. Para além disso permite a deposição direta no tumor de doses elevadas e adequadas, com um ótimo controlo bioquímico e sem afetar a bexiga e o reto devido ao curto alcance destas fontes de energia (Hoskin *et al.*, 2012; Mohler *et al.*, 2010). Algumas desvantagens e aspetos a melhorar desta técnica são a exposição à radiação da equipa médica durante o processo de implantação, o facto de o doente emitir radiação após a intervenção e as dificuldades na distribuição da dose e na posição final das sementes (Demanes *et al.*, 2011).

A crioterapia envolve a congelação da glândula prostática, estando recomendada para casos de alto risco em que a prostatectomia radical é contraindicada (Dunn e Kazer, 2011). É uma técnica não invasiva que normalmente utiliza criossondas com árgon e hélio que são inseridas na próstata para congelar e descongelar o tecido tumoral durante cerca de 10 minutos. Numa primeira fase o arrefecimento origina isquemia do tecido e posteriormente a cristalização do fluido extracelular provoca um aumento da pressão osmótica, o que conduz à saída de água do espaço intracelular para o espaço extracelular. Este mecanismo leva à falência do metabolismo celular com desnaturação das proteínas da célula, que entra em apoptose. O processo de descongelamento também provoca danos celulares. Os cristais formados fora das células começam a derreter e o gradiente resultante gera a entrada de água

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

novamente para dentro das mesmas, provocando a lise celular. Neste processo considera-se que 2 ciclos de congelação-descongelação levam à morte do tecido alvo (Prohaska e Bermudez, 2018; Sverrisson *et al.*, 2013; Phillips *et al.*, 2014).

2. CARCINOMA DA PRÓSTATA AVANÇADO

O carcinoma da próstata avançado é uma fase da doença caracterizada pelo facto de esta deixar de ser localizada devido à disseminação das células cancerígenas em tecidos contíguos e que pode resultar no aparecimento de metástases, nomeadamente ósseas (Bahl, 2013). Um dos acontecimentos importantes no estudo desta neoplasia foi quando Hodges e Huggins demonstraram que as células do adenocarcinoma da próstata são hormonodependentes (Huggins e Hodges, 1941), o que levou a tentar entender melhor o funcionamento dos androgénios.

Os androgénios desempenham um papel fundamental num grande conjunto de respostas fisiológicas. A testosterona é essencial para a fertilidade e desenvolvimento do sistema reprodutor masculino, é produzida nos testículos pelas células de Leydig com intervenção da hormona luteinizante (LH, derivado do inglês *luteinizing hormone*) que aí se liga ao seu recetor (Welsh *et al.*, 2011). O citocromo P450, a 5 α -redutase, cuja função é converter a testosterona no metabolito ativo mais potente designado por 5 α -dihidrotestosterona (DHT), é secretado na próstata e nos tecidos genitais. A DHT tem uma maior afinidade para os recetores de androgénios (RA) e liga-se a estes induzindo-lhes atividade transcripcional, permitindo o funcionamento de todos os processos que conduzem à diferenciação das células prostáticas (Lonergan e Tindall, 2011).

O recetor de androgénio (RA), para além de desempenhar um papel fundamental no normal crescimento e desenvolvimento da próstata, também influi na carcinogénese prostática e na evolução da doença quando esta não responde aos tratamentos hormonais. Esta evolução de um estágio localizado para o fenótipo resistente à castração envolve uma complexa rede de moléculas sinalizadoras e é outorgada à via de sinalização dos RA (Lonergan

e Tindall, 2011; Heinlein e Chang, 2004).

A reativação dos AR na resistência à castração pode acontecer pela mutação dos mesmos ou *splicing* alternativo, por alterações nos seus cofatores, por modificações pós-translacionais, pela contínua síntese de ligandos intratumorais ou por desregulação que provoca uma amplificação e sobre-expressão aberrante de AR, como se pode ver na figura 9 (Knudsen e Penning, 2010).

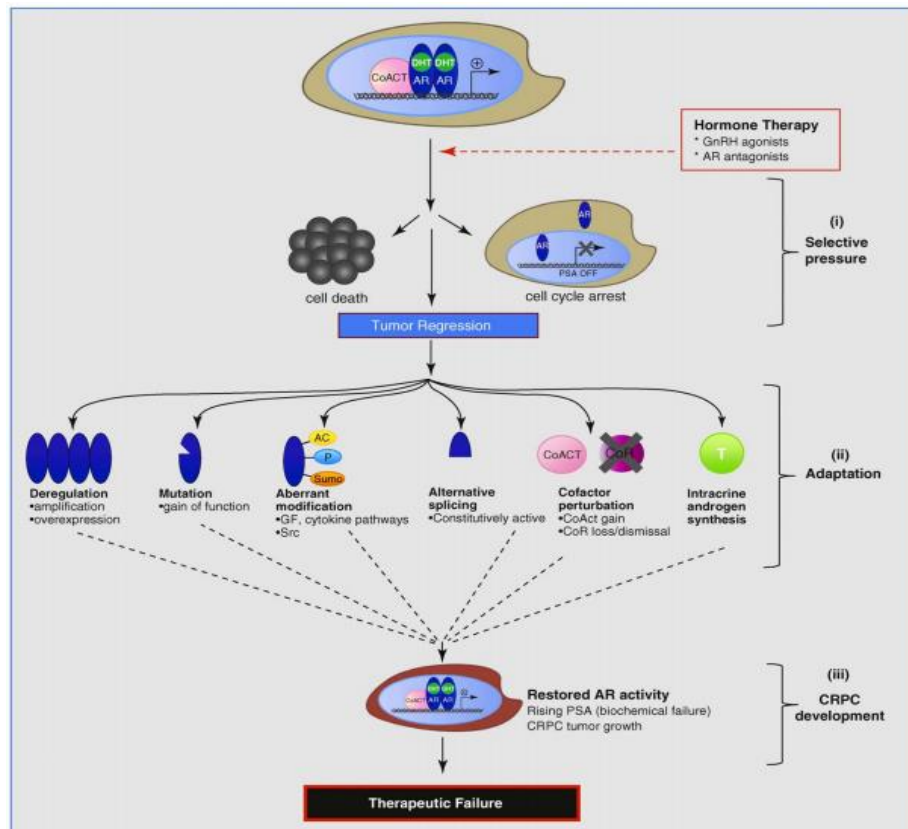


Figura 9: Alterações nos RA que conduzem ao falhanço da terapêutica. Adaptado de (Knudsen e Penning, 2010)

Desde que as regressões do cancro da próstata foram documentadas pela primeira vez nos anos 40 que a terapia por privação androgénica (ADT, derivado do inglês *androgen-deprivation therapy*) é considerada o tratamento padrão no combate a esta neoplasia. Tentativas de melhorar a sua eficiência englobam o uso isolado de anti-androgénios, utilização de um regime de dosagem intermitente de ADT e o uso de anti-androgénios em conjunto com a castração cirúrgica ou médica (Sweeney *et al.*, 2015).

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

A castração cirúrgica ou orquidectomia bilateral é um procedimento permanente que, como o próprio nome indica, consiste na remoção dos testículos. É a forma mais rápida e irreversível de obter um bloqueio androgénico sem tratamento intermitente, embora com consequências graves na qualidade de vida do doente (Morrison *et al.*, 2011).

A utilização de agonistas da hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH, derivado do inglês *luteinizing hormone–releasing hormone*) tem sido a opção mais comum na castração médica, pois estes agentes permitem a aplicação da ADT evitando os problemas físicos e psicológicos associados com a orquidectomia (Heidenreich *et al.*, 2013). Esta hormona estimula a libertação da LH pela hipófise, que vai inibir a síntese de testosterona por parte das células de Leydig. Desta forma tem sido desenvolvido um conjunto de moléculas peptídicas com características agonistas sobre os recetores de LHRH que vão inibir os recetores hipofisários. Isto provoca uma dessensibilização gonadotrópica, com diminuição da LH e, conseqüentemente, de testosterona. Só 3 a 4 semanas após a administração é que são visíveis efeitos terapêuticos positivos, observando-se picos de testosterona numa fase inicial (Teles, 2015).

A utilização de antagonistas de LHRH e a administração de estrogénios e antiandrogénios são outras opções disponíveis para diminuir drasticamente as concentrações séricas de testosterona (Helsen *et al.*, 2014).

3. CARCINOMA DA PRÓSTATA METASTÁTICO RESISTENTE À CASTRAÇÃO

Desde há vários anos que a terapia por privação de androgénios (ADT) tem sido aceite como o tratamento *standard* para o cancro da próstata; no entanto, apesar de se observar uma resposta inicial favorável, esta é habitualmente de curta duração. As células malignas tornam-se resistentes à terapêutica hormonal (castração) após 12-18 meses do seu início (Rodrigues *et al.*, 2014).

O cancro da próstata metastático resistente à castração (CPMRC) define-se como uma doença que progride e não responde à castração médica ou cirúrgica, em doentes com concentrações de testosterona sérica inferiores a 50 ng/dL (Graff e Chamberlain, 2014).

As metástases no esqueleto surgem em cerca de 80% das situações de cancro da próstata avançado e, naturalmente, são indicativas de elevada mortalidade. Ao longo dos anos têm surgido um conjunto de opções terapêuticas com o objetivo de melhorar a qualidade de vida destes doentes (Sturge *et al.*, 2011).

4. TERAPÊUTICA

A quimioterapia é uma das abordagens principais no tratamento de doentes com CPMRC, sendo geralmente iniciada quando existem sintomas de doença metastática (Magalhães, 2014).

O docetaxel foi o primeiro fármaco quimioterapêutico aprovado pela EMA (derivado do inglês, *European Medicines Agency*) em novembro de 2004 para combater o cancro da próstata metastático resistente à castração. Pertence à família dos taxanos e é um fármaco cujo mecanismo de ação se baseia na ligação com alta afinidade com os filamentos da tubulina que constitui os microtúbulos intracelulares, inibindo as dinâmicas da sua formação. Assim, consequentemente, provoca morte das células tumorais, predominantemente por apoptose, devido ao bloqueio na fase mitótica do ciclo celular (Paller e Antonarakis, 2011; Teles, 2015).

O cabazitaxel é um fármaco que foi aprovado pela EMA em março de 2011, sendo utilizado no tratamento do CPMRC em doentes que já foram tratados anteriormente com docetaxel (Teles, 2015). É um taxano semissintético desenhado para superar a resistência que por vezes surge ao docetaxel. O seu mecanismo de ação é parecido ao do docetaxel, atuando na inibição da formação de microtúbulos, o que leva à morte celular pela interrupção da mitose. Em estudos com modelos animais e linhas celulares tanto resistentes como sensíveis ao docetaxel, o cabazitaxel demonstrou elevada citotoxicidade. No entanto, este mecanismo ainda não é bem claro (Cheetham e Petrylak, 2013). Alguns dos possíveis efeitos secundários incluem problemas gastrointestinais, insuficiência renal e neutropenia (Dunn e Kazer, 2011).

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

Outra abordagem terapêutica bastante utilizada é a hormonoterapia. As terapias hormonais têm a capacidade para melhorar a sobrevivência e diminuir o volume do tumor, devido à interferência com o processo androgénico que leva à diminuição das suas concentrações séricas (Graff e Chamberlain, 2014).

A enzalutamida é um antagonista do recetor de androgénios, inibindo competitivamente a ligação da testosterona aos recetores e bloqueando as suas vias de sinalização. No entanto, ao contrário dos anti-androgénicos de primeira geração, a enzalutamida também inibe a translocação nuclear do recetor e a ligação ao DNA das células cancerígenas (Rodriguez-Vida *et al.*, 2015). Consequentemente, a proliferação celular irá diminuir e o fármaco provoca a apoptose destas células, levando à regressão tumoral (Teles, 2015).

O acetato de abiraterona (AA) é um inibidor do citocromo P-450c17, uma enzima fundamental na síntese androgénica a nível testicular e extragonadal e responsável pela conversão do colesterol em testosterona e dihidrotestosterona. Assim, este fármaco bloqueia a produção de testosterona e também de glicocorticóides. O AA é utilizado no tratamento de doentes com CPMRC anteriormente tratados com docetaxel, sozinho ou em combinação. Esta terapia combinada recebeu aprovação pela EMA em novembro de 2012 (Ryan *et al.*, 2013; Magalhães, 2014).

A imunoterapia é também uma das terapêuticas utilizada no combate ao CPMRC. A ideia chave da imunoterapia é a ativação do sistema imunitário para combater o tumor. O sipuleucel-T é uma vacina cujo mecanismo de ação se caracteriza pela utilização de células dendríticas, as células antigénicas mais poderosas do organismo, para estimular os linfócitos T de modo a modularem as respostas imunes contra o antigénio que as células tumorais do cancro da próstata expressam (Figura 10). Esse antigénio é a fosfatase ácida prostática, uma enzima altamente específica do tecido prostático cuja associação com o cancro da próstata foi descrita pela primeira vez em 1930, sendo que a sua expressão noutros tecidos ou órgãos é reduzida (menos de 5%) (Handy e Antonarakis, 2018; Teles, 2015; Graff e Chamberlain, 2014).

A diminuição irregular dos níveis de PSA no soro, para além dos custos financeiros elevados e da dificuldade na preparação clínica são as principais desvantagens deste tratamento. Esta vacina é a única atualmente e foi aprovada pela EMA em setembro de 2013 (Magalhães, 2014).

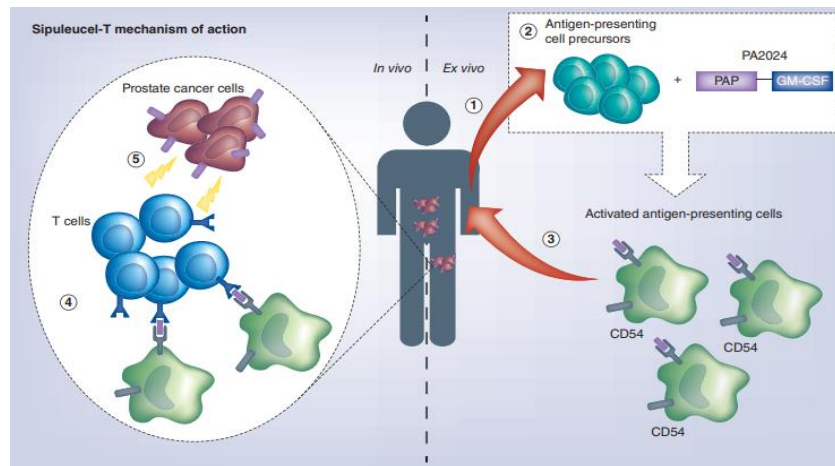


Figura 10: Mecanismo de ação da sipuleucel-T. Adaptado de (Handy e Antonarakis, 2018)

5. ^{223}Ra NO TRATAMENTO DO CPMRC

O dicloreto de Rádio-223 (Xofigo[®], antes Alpharadin[™]) é indicado para o tratamento de doentes com carcinoma da próstata resistente à castração, sem metástases viscerais visíveis e com metástases ósseas sintomáticas, através de administração intravenosa (Shirley e McCormack, 2014). Na fase III do estudo denominado ALSYMPCA testou-se a eficiência do rádio-223 no CPMRC em doentes com metástases ósseas. O estudo foi realizado recorrendo a 921 doentes tratados anteriormente com docetaxel ou não candidatos a quimioterapia. Enquanto que um grupo de doentes foi sujeito a seis administrações endovenosas de rádio-223, ao outro foi administrado placebo. O processo ocorreu durante seis meses e o intervalo de tempo entre cada administrações foi de quatro semanas. Os resultados obtidos demonstraram que o rádio-223 aumentou o tempo de sobrevivência médio dos doentes tratados com o radiofármaco (14,9 meses) comparativamente com o grupo placebo (11,3 meses) (Parker *et al.*, 2013; Teles, 2015, Magalhães, 2014). Os resultados deste estudo levaram a que esta modalidade terapêutica fosse aprovada pela EMA e pela FDA em 2013 (EMA, 2013; FDA, 2013).

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

O ^{223}Ra é um emissor de partículas alfa com elevada transferência linear de energia (LET). A transferência linear de energia define-se como a quantidade de energia que é transferida para o material por unidade de comprimento de percurso. Esta transferência de energia relaciona-se com o número de ionizações que ocorrem. O valor da LET das partículas alfa é elevado e tem uma gama de valores entre 80–100 keV/ μm , quando se compara com o das partículas beta, que é de cerca de 0,2 keV/ μm , dependendo da energia (Kassis, 2008; Marques *et al.*, 2018).

As partículas alfa têm um poder de penetração reduzido devido ao seu tamanho e à sua baixa velocidade comparativamente com as partículas beta, raios-x e raios-gama. Nos tecidos biológicos percorre cerca de 100 μm , o que corresponde a menos de 10 diâmetros celulares. Devido ao facto de ser semelhante ao cálcio, o rádio-223 tem uma capacidade natural para se ligar à matriz óssea formada, atingindo lesões osteoblásticas metastáticas. Após a administração e consequente difusão do rádio na corrente sanguínea, as trocas iónicas que ocorrem na fase mineral do osso fazem com que este se concentre no esqueleto, nas áreas de remodelação óssea. Embora o processo de interação do rádio nas metástases ósseas não seja totalmente conhecido, diversos estudos de farmacocinética e de farmacodinamia têm mostrado uma rápida absorção do rádio-223 por parte do osso, formando complexos com a hidroxiapatite em áreas de remodelação óssea (Figura 11). A excreção do ^{223}Ra que não se liga ao osso (39%) é feita de forma maioritária por via intestinal (Liepe e Shinto, 2016; Nilsson, 2016; Sartor *et al.*, 2014).

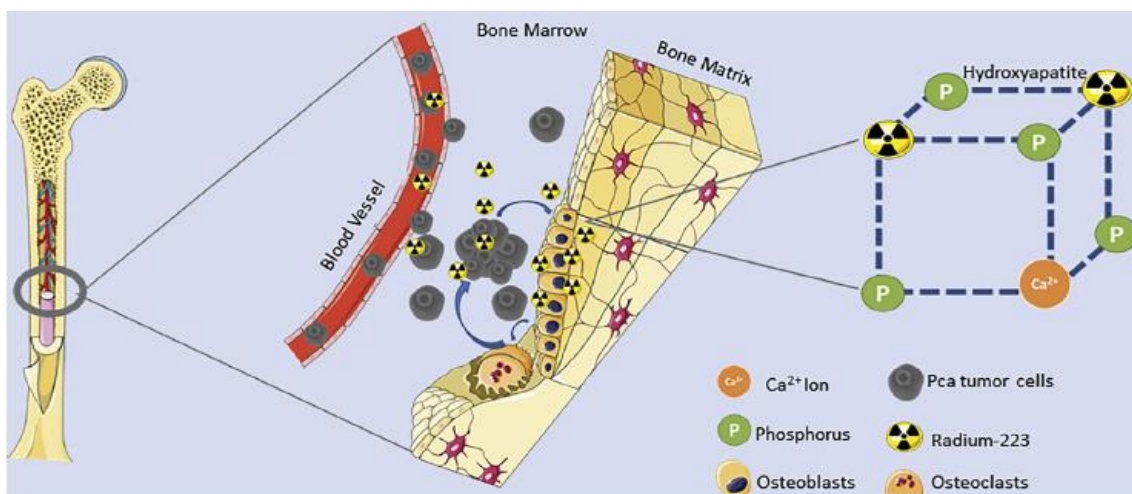


Figura 11: Mecanismo de interação do Rádio-223 em células de metástases ósseas. Adaptado de (Marques *et al.*, 2018)

A elevada LET da radiação induz quebras irreversíveis na dupla cadeia de DNA originando, assim, um efeito citotóxico localizado muito agressivo. O facto das partículas alfa penetrarem apenas de forma mais superficial faz com que os efeitos tóxicos em tecidos saudáveis envolventes como a medula óssea sejam atenuados, provocando morte celular intensa num pequeno volume de tecido (Figura 12) (Parker *et al.*, 2013).

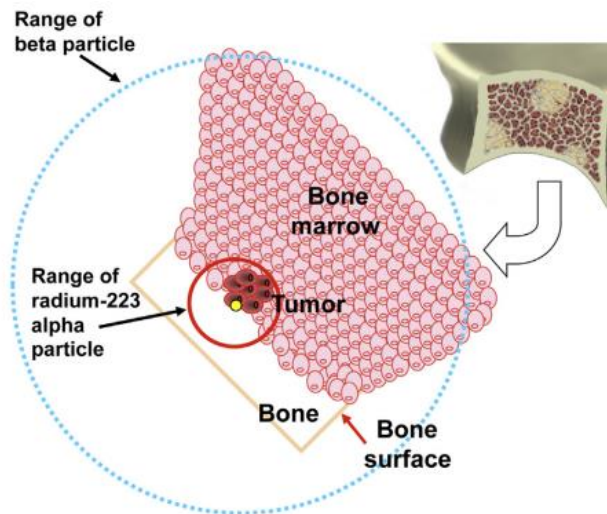


Figura 12: Comparação entre um emissor de partículas alfa como o Rádio-223 e um emissor de partículas beta ao nível do seu raio de ação no osso. Adaptado de (Shore, 2015)

Quimicamente, o rádio-223 é um radioisótopo do metal alcalinoterroso rádio, sendo quimicamente semelhante ao cálcio. Tem um período de semi-desintegração ($T_{1/2}$) de 11,4 dias e atividade específica de 1,9 MBq/ng.

O ^{223}Ra é produzido em larga escala e de forma relativamente barata utilizando um sistema gerador com uma fonte de actínio-227 (^{227}Ac). O actínio-227 é produzido através da irradiação de ^{226}Ra com neutrões. O esquema de decaimento do ^{223}Ra encontra-se representado na Figura 13. Como podemos apreciar, decai para radão-219 que, por sua vez, decai para chumbo-207 estável após 5 etapas. Os isótopos-filhos têm períodos curtos e este processo é acompanhado por emissões alfa, gama e beta. Estas diferentes emissões têm também diferentes energias. Durante todas as fases do processo de decaimento, por cada átomo de rádio-223, são libertadas 4 partículas alfa que representam 95% do total da energia emitida (intervalo de energia de 5,0-7,5 MeV). As partículas beta libertadas representam uma fração energética de 3,6%, com as energias médias a estarem entre os 0,445 MeV e os 0,492 MeV, e a radiação gama representa somente 1,1 %, com intervalo energético de valores entre

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

os 0,01 MeV e os 1,27 MeV (Florimonte *et al.*, 2016; Marques *et al.*, 2018; EMA, 2013).

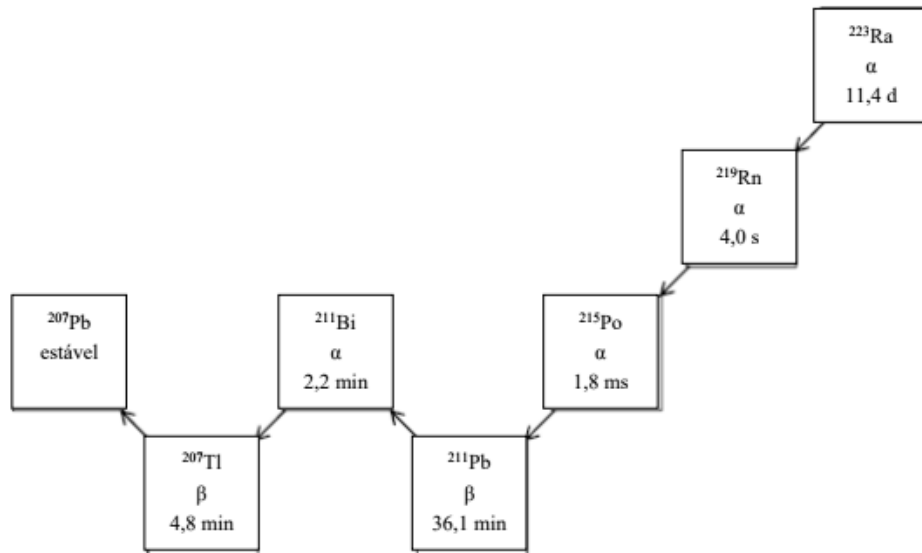


Figura 13: Cadeia de decaimento do rádio-223. Adaptado de (EMA)

O Rádio-223 foi aprovado e introduzido na prática clínica em 2013, e os seus benefícios e recomendações de uso estão incluídos nos principais guias de tratamento europeus e norte-americanos para o CPMRC. A atividade aprovada de rádio-223 para administrar é de 50 kBq (1,35 μ Ci) por kg de massa corporal, até perfazer 6 injeções intravenosas com intervalos de 4 semanas. Tem de ser administrado por injeção lenta (geralmente até 1 minuto). O ^{223}Ra é a primeira terapia disponível que aumenta significativamente o tempo de vida em doentes com CPMRC, o que faz com que o seu uso clínico esteja em crescimento (Du *et al.*, 2017).

Os efeitos biológicos da radiação ionizante podem ser diretos ou indiretos. As partículas alfa são partículas pesadas que depositam energia a curtas distâncias. Carregadas positivamente, relacionam-se com os efeitos diretos, pois removem eletrões de átomos ou moléculas por terem elevada energia. Consequentemente, provocam a ionização e de seguida dá-se a rutura da dupla cadeia da molécula de DNA. Assim, originam efeitos citotóxicos mais potentes nas zonas metastáticas e, consequentemente, induzem morte celular. Já as partículas beta e gama estão relacionadas com os efeitos indiretos, ocorrendo formação de espécies reativas de oxigénio pela ionização da molécula da água, denominados ROS (derivado

do inglês, *reactiv oxygen species*) (Tharmalingam *et al.*, 2017; Shore, 2015; Marques *et al.*, 2018).

O facto das partículas alfa terem um alcance de penetração muito pequeno e de serem facilmente bloqueadas faz com que a manipulação do fármaco seja simples e a administração seja através de um tubo de plástico, não sendo necessários procedimentos complexos de blindagem nem de monitorização e de proteção da radiação. A eliminação dos resíduos radioativos de dicloreto de rádio-223 deve ser feita 4 meses depois da administração, sendo descartados como um desperdício clínico normal.

No entanto, o elevado LET das partículas alfa torna o dicloreto de rádio-223 muito mais citotóxico e mutagénico para uma célula individual do que radiofármacos que emitem partículas beta. Numa terapia alvo este facto é sem dúvida uma vantagem pois o volume de células normais à volta do tumor que serão irradiadas é muito mais pequeno (Cheetham e Petrylak, 2012).

Numa perspetiva clínica, a sua utilização tem a enorme vantagem de permitir a repetição de doses e de poder ser aplicado em combinação com outros agentes (Parker *et al.*, 2013). O objetivo principal do tratamento com rádio-223 não é aliviar sintomas, mas sim aumentar o tempo de sobrevivência. Assim, o grau dos sintomas não deve ser tido em conta no início do tratamento com este radiofármaco (Parker *et al.*, 2018).

II. Objetivos

O cancro da próstata é o tipo de cancro mais frequente em homens nos países desenvolvidos, sendo mesmo o segundo tipo de cancro mais frequente em homens a nível mundial e a quinta causa de morte que se encontra relacionada com o cancro. A progressão desta neoplasia devido ao insucesso dos tratamentos pode resultar numa fase em que surgem metástases ósseas, que normalmente indiciam um elevado nível de mortalidade e que se denomina por CPMRC (Sturge *et al.*, 2011).

Uma das opções terapêuticas com potencial que surgiu nos últimos anos para combater a metastização é o radiofármaco ^{223}Ra . Este é um emissor de partículas alfa com alta LET e com um poder fraco de penetração dada a baixa velocidade. Desta forma, os danos celulares são elevados, sendo estes englobados maioritariamente nos efeitos diretos. Assim, esta constitui-se como uma das principais vantagens pois permite minimizar os danos causados nos tecidos normais adjacentes (Nilsson, 2016). Como também é caracterizado por mimetizar o cálcio, o rádio-223 liga-se naturalmente à matriz óssea e forma complexos com a hidroxiapatite, nomeadamente em zonas de lesões osteoblásticas metastáticas, sendo esta a principal razão pela qual é utilizado no CPMRC (Liepe e Shinto, 2016; Marques *et al.*, 2018).

Anteriormente foi realizado um projeto no grupo de trabalho em que se caracterizou os efeitos do ^{223}Ra em linhas celulares do cancro da próstata, compreendendo o seu mecanismo de atuação em células tumorais (Marques, 2016). O principal objetivo deste projeto foi complementar essa informação e poder compreender os efeitos do ^{223}Ra em linhas celulares normais, ou seja, linhas celulares não cancerígenas. Para isso sujeitou-se as células à radiação e através de diferentes métodos e técnicas avaliou-se estes efeitos ao nível da captação, proliferação celular, sobrevivência celular e morfologia. Os resultados obtidos foram comparados com os correspondentes das linhas celulares tumorais. Outro dos objetivos deste projeto consistiu na obtenção de estruturas 3D obtidas com recurso a linhas celulares através da adaptação de um método inovador de levitação magnética, e sujeitá-las aos efeitos do ^{223}Ra para posterior análise morfológica. A linha celular utilizada nesta abordagem foi a linha celular PC3.

III. Materiais e Métodos

1. CULTURA CELULAR

De forma a realizar os estudos *in vitro* utilizou-se uma linha celular de tecido normal da próstata, a linha epitelial RWPE-1, e duas linhas celulares de cancro da próstata humanas, a linha celular LNCaP e a linha celular PC3. Todas estas linhas celulares foram adquiridas à American Type Culture Collection (ATCC®).

As células epiteliais RWPE-1 (ATCC® CRL-11609™) foram retiradas de um dador masculino caucasiano e derivam da zona periférica da próstata, sendo que foram imortalizadas com uma cópia única do vírus do papiloma humano 18 (HPV-18) formando assim a linha celular RWPE-1 (ATCC® CRL-11609™) (Bello *et al.*, 1997).

As linhas celulares LNCaP (ATCC® CRL-1740™) e PC3 (ATCC® CRL-1435™) são linhas de cancro da próstata e diferem na sua localização e na dependência hormonal. A linha LNCaP deriva de uma metástase linfática do carcinoma da próstata, obtida em 1977, por colheita a um doente caucasiano de 50 anos (Horoszewicz *et al.*, 1980). Estas células expressam recetores hormonais e PSA e o seu crescimento é inibido pela diminuição de androgénios, o que indica uma dependência hormonal (Tai *et al.*, 2011). A linha celular PC3 foi obtida de uma metástase óssea do cancro da próstata em 1979, retirada de um doente caucasiano de 62 anos (Kaighn *et al.*, 1979). Ao contrário das LNCaP, não são hormonodependentes e a sua proliferação é independente da presença de androgénios.

Após a devida receção de ambas as linhas procedeu-se ao seu descongelamento e posterior manutenção numa incubadora Binder® (Binder, Alemanha), numa atmosfera húmida a 37°C com 95% de ar e 5% de dióxido de carbono (CO₂), conforme recomendação do fornecedor. A linha celular RWPE-1 foi mantida em cultura utilizando o meio *Keratinocyte Serum-Free Growth* Medium (SFM), não sendo necessário suplementação.

O meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) foi utilizado para cultivar as linhas celulares do cancro da próstata. Este foi suplementado com soro bovino fetal (FBS) (*Sigma F7524*) de forma a perfazer a concentração de 10%, 100 µM de piruvato de sódio (*Gibco 11360*) e antibiótico (*Sigma A5955*) de forma a perfazer a concentração de 1%.

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

Tendo em conta que as linhas celulares utilizadas neste trabalho crescem em monocamada aderente, para preparar suspensões celulares foi necessário destacar as células da parede do frasco. Para isso começou-se por remover o meio de cultura e as células foram lavadas com PBS (*phosphate buffered saline*), uma solução tampão salina de fosfato, pH 7,4. O PBS foi descartado e para as células PC3 e LNCaP adicionaram-se 1,5 mL de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma, T4049), enquanto que no caso das células RWPE-1 utilizaram-se 1,5 mL de TrypLE™ Express (Gibco, 12605-028). Após cerca de 5 minutos de incubação, o efeito da tripsina e do tryple foi inibido pela adição de 4 mL do respetivo meio de cultura. Obtida a suspensão celular, determinou-se a sua concentração através do método de exclusão do azul tripano (Weisenthal *et al.*, 1983). Este método baseia-se no facto de que as células que mantêm a sua membrana celular intacta, ou seja, as células viáveis, possuem uma aparência brilhante, enquanto que as células não viáveis possuem citoplasma azul já que se tornam permeáveis ao corante, devido a alterações da membrana (Strober, 2015).

Na realização deste método homogeneizaram-se volumes iguais de suspensão celular e de azul de tripano na concentração de 0,02%, e numa câmara de *neubauer* foi efetuada a contagem das células brilhantes e das células azuis, com recurso a um microscópio ótico invertido (Motic AE31) com uma ampliação 100x. A viabilidade celular foi determinada segundo a Equação 1:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{\text{número de células vivas}}{\text{número de células vivas} + \text{número de células mortas}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

2. AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DO ²²³Ra

O primeiro passo na realização dos estudos de captação foi preparar suspensões celulares com concentração de 2×10^6 células/mL em frascos de 25 cm². Após esta fase as células permaneceram na incubadora durante 45 minutos, pois a ação química da tripsina induz stresse celular e é necessário um pequeno período de tempo de repouso para que as células recuperem. De seguida adicionou-se, a cada frasco, uma atividade de 0,5 µCi/mL de meio de cultura com ²²³Ra, valor esse que foi definido com base em estudos realizados anteriormente pelo grupo (Marques, 2016) e tendo em conta que o valor administrado na

prática clínica de atividade de ^{223}Ra , para uma pessoa adulta com 70kg, é de 94,5 μCi de dicloreto de rádio-223. Definiu-se que os tempos de incubação com o radiofármaco para cada suspensão foi de 5, 60 e 120 minutos, e após estes tempos foram-se retirando 200 μL para dois *ependorfs* que continham 500 μL de PBS gelado cada (experiência em duplicado para cada condição). Posteriormente procedeu-se à centrifugação a 10 000 rpm (Micro Star 12 VWR) de cada amostra durante 1 minuto com o intuito de separar o sobrenadante do *pellet*. De seguida efetuou-se outra lavagem do *pellet* com a mesma quantidade de PBS gelado, sendo que antes se tinha recolhido o sobrenadante para tubos de RIA identificados, e centrifugou-se mais uma vez, para assegurar a remoção de toda a atividade do radiofármaco não ligado às células ou internalizado. Por fim, todo o sobrenadante foi recolhido novamente para os mesmos tubos de RIA. A radioatividade tanto do *pellet* como do sobrenadante foi medida num contador de poço calibrado (Capintec, Inc. CRC, 25W) em unidades CPM (contagens por minuto). Os valores obtidos para as diferentes condições permitiram calcular a captação percentual de ^{223}Ra de acordo com a Equação 2.

$$\% \text{ Captação} = \frac{\text{CPM pellet}}{\text{CPM pellet} + \text{CPM sobrenadante}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Os resultados obtidos foram comparados com os correspondentes das linhas PC3 e LNCaP.

3. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DO AZUL DE TRIPANO

Para determinar a viabilidade celular de cada frasco utilizado nos estudos de cinética realizou-se o método de exclusão do azul tripano já acima descrito. O objetivo foi garantir que durante o período de tempo em que decorreu a experiência a células se mantinham viáveis e, conseqüentemente, a fiabilidade dos resultados obtidos foi garantida.

4. ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO ENSAIO DA SULFORODAMINA B

O ensaio colorimétrico da Sulforodamina B (SRB) foi utilizado na determinação da densidade celular pois é, sem dúvida, uma técnica sensível e adequada para medir a citotoxicidade que é induzida por um agente terapêutico (Vega-Avila e Pugsley, 2011). Baseia-se no princípio de que o corante se liga de forma eletrostática e dependente do pH ao conteúdo proteico de células fixadas. Assim, uma elevada síntese proteica indica uma alta densidade celular e, por isso, a absorvância medida pelo espectrofotómetro será maior, pois é proporcional à quantidade de corante extraído (Vichai e Kirtikara, 2006; Voigt, 2005).

Com o objetivo de avaliar o papel do ^{223}Ra na proliferação celular, as células da linha RWPE-1 foram plaqueadas em poços de uma placa de 24 poços, e os ensaios SRB foram realizados em dois períodos temporais diferentes: 48 h após a exposição, e 8 dias após a exposição.

Para os ensaios SRB realizados 48 h após a exposição ao ^{223}Ra , a concentração escolhida da suspensão celular foi de 5×10^4 células/mL, enquanto que para os realizados 8 dias após a exposição ao ^{223}Ra , a concentração foi de 2×10^4 células/mL.

De modo a irradiar internamente as células adicionou-se uma atividade A_0 variável num volume de suspensão celular de 0,2 mL, e foi necessário previamente calcular os tempos correspondentes às doses pretendidas (Tabela I), com base na Equação 3:

$$D = \frac{A_0}{\ln 2 M} \sum_i \alpha_i T_i \left[1 - e^{-\frac{\ln 2}{T_i} t} \right] \bar{E}_i \quad (\text{Equação 3})$$

em que D corresponde à dose absorvida (Gy), M é a massa (kg) da amostra que foi sujeita à irradiação, A_0 a atividade inicial (mCi), α_i a fração de energia do decaimento, T_i o período de semidesintegração (s) da porção i da cadeia de decaimento, t o tempo de irradiação (s) e \bar{E}_i a energia média (eV) por desintegração da porção i da cadeia de decaimento.

Tabela I: Tempo correspondente à irradiação de 0,2 mL de suspensão celular, calculado para uma atividade inicial variável, para as respectivas doses escolhidas

Dose (mGy)	A ₀ (μCi)	Tempo (s)
1	0,1	150
4	0,3	200
10	0,3	675

Imediatamente após a conclusão do tempo de exposição à radiação, o meio de cultura de cada poço foi descartado e substituído por 0,5 mL de meio novo. No fim deste processo as células foram incubadas.

Na realização do ensaio de SRB o primeiro passo correspondeu à lavagem das células com PBS após aspiração do meio de cultura, e de seguida fixaram-se as células com uma solução gelada de ácido acético a 1% em metanol. Após a fixação as células foram colocadas durante 2 horas a 4°C. No fim desse tempo a solução foi descartada e adicionaram-se 200 μL/poço de uma solução de SRB a 0,4% em ácido acético a 1%. As células de seguida foram incubadas no escuro e à temperatura ambiente durante duas horas. Todo o corante em excesso foi retirado e as placas foram lavados com água corrente de forma muito cuidadosa para não perder parte do conteúdo celular. Após a secagem completa adicionaram-se 200 μL/poço de uma solução de Tris.NaOH de modo a destacar as células, e as placas foram colocadas num agitador para melhor homogeneização. Por fim transferiu-se cada poço para uma placa de 96 poços, e fez-se a leitura das diferentes absorvâncias, utilizando um filtro de referência de 690 nm e o comprimento de onda de 540 nm, através de um espectrofotómetro ELISA (Biotek® Synergy HT).

No tratamento de dados a proliferação foi calculada em percentagem pelo quociente entre proliferação das células expostas ao ²²³Ra e as células controlo. Os resultados obtidos da proliferação celular de RWPE-1 para estas doses foram comparados com os resultados das linhas celulares PC3 e LNCaP.

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

5. ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA CELULAR PELO ENSAIO CLONOGÉNICO

O ensaio clonogénico é uma técnica que permite inferir e avaliar a viabilidade e a sobrevivência celular, baseando-se na capacidade de uma célula única originar uma colónia. Define-se que uma colónia é constituída por cerca de cinquenta células (Franken *et al.*, 2006), e é com base nesse princípio que se utiliza este ensaio para avaliar as agressões celulares e perceber os efeitos que a radiação ionizante pode ter a nível da formação de colónias.

A primeira fase do processo foi preparar uma suspensão celular de concentração 1×10^5 células/mL que se adicionou aos poços de uma placa de 24 poços (Starstedt AG & Co, Alemanha, Nümbrecht).

A atividade adicionada foi de 0,3 mCi num volume de suspensão celular de 0,2 mL, tendo estes valores sido constantes para todos os ensaios realizados. Foi necessário previamente calcular os tempos correspondentes às doses pretendidas (Tabela II), novamente com base na Equação 3.

Tabela II: Tempo correspondente à irradiação de 0,2 mL de suspensão celular, calculado para uma atividade inicial constante de 0,3 mCi, para as respetivas doses escolhidas

Dose (mGy)	Tempo (min)
1	0,67
4	3,33
10	11,25

À medida que o tempo de irradiação de cada condição ia concluindo adicionou-se em cada poço de placas de 6 poços um volume de células conhecido, correspondente ao número de células que aí pretendíamos colocar (número de células semeadas). Para todas as doses foram semeadas 1000 células.

Por fim fez-se cada poço com 2 mL de meio de cultura e as células foram incubadas em condições favoráveis ao seu crescimento e propagação durante 10 dias. Para se efetuar a

contagem das colónias resultantes, após este tempo, começou-se por remover o meio de cultura de cada poço e as células foram lavadas com PBS (pH 7,4). Depois da lavagem adicionou-se metanol em cada poço que fixou as colónias durante cerca de 1 hora. De seguida o metanol foi descartado, as placas secaram durante 15 minutos e, por fim, adicionaram-se 2 mL por poço de corante violeta de cristal em metanol a 0,5%, ficando a atuar durante 1 hora. Após este período de tempo o corante foi removido e as placas lavadas com a água tépida e de forma cuidadosa.

No final de todo o procedimento e após a secagem das placas efetuou-se a contagem das colónias. O fator de sobrevivência celular (FS) e a eficiência da placa (PE, do inglês *plate efficiency*) foram calculados utilizando as equações 4 e 5 respetivamente. (Franken *et al.*, 2006; Marques, 2016).

$$\text{Fator de sobrevivência (FS)} = \frac{\text{PE das células irradiadas}}{\text{PE das células de controlo}} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\text{Eficiência da placa (PE) (\%)} = \frac{\text{Número de colónias contadas}}{\text{Número de células semeadas}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Os resultados obtidos vão ser comparados com os obtidos com as células das linhas PC3 e LNCaP.

6. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA PELO MÉTODO MAY-GRÜNWARD GIEMSA

Com o intuito de avaliar o tipo de morte celular através das características morfológicas recorreu-se ao método de coloração celular com *May-Grünwald Giemsa* e posterior visualização num microscópio ótico. É um método simples, rápido e fácil de executar que permite observar a estrutura das células, em que o citoplasma aparece corado de rosa a azul e os núcleos de vermelho a violeta devido à ação dos corantes (Mendes, 2016).

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

O primeiro passo deste processo foi preparar uma suspensão celular da linha RWPE-1, transferir $0,5 \times 10^6$ células por poço para uma placa de 6 poços e perfazer cada poço com 2 mL de meio de cultura. Vinte e quatro horas depois procedeu-se à irradiação. Para isso adicionou-se uma atividade A_0 constante, de $0,5 \mu\text{Ci}$, e, novamente, foi necessário calcular os tempos correspondentes às doses pretendidas (Tabela III), baseando-se na Equação 3.

Tabela III: Tempos correspondentes à irradiação de 2 mL de suspensão celular, calculado para uma atividade inicial constante de $0,5 \mu\text{Ci}$, para as respectivas doses escolhidas.

Dose (mGy)	Tempo (min)
0,4	1,8
4	33,3

O início do protocolo foi realizado 48 horas após a irradiação. Retirou-se o meio de cultura de cada poço que continha as células mortas e transferiu-se individualmente para tubos devidamente identificados. De seguida o conteúdo celular de cada poço foi retirado e colocado em cada tubo correspondente, e centrifugou-se durante 5 minutos cada amostra a 2500 rpm para separar o *pellet* do sobrenadante. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com PBS, para serem novamente centrifugadas nas mesmas condições. O PBS foi removido e as células foram colocadas num *eppendorf* contendo 500 μL de PBS gelado.

Para poder observar as características morfológicas que nos indicam o tipo de morte celular através deste método de coloração realizaram-se vários esfregaços em lâminas contendo as células das condições testadas. O protocolo iniciou-se com a fixação das suspensões celulares em metanol durante cerca de 5 minutos. De seguida pipetaram-se 2 mL de solução *May-Grünwald* durante 3 minutos, e posteriormente adicionaram-se algumas gotas de solução de *Giemsa* diluído em água destilada na razão de 1 para 9 durante 8 minutos. Por fim lavaram-se as lâminas em água corrente e deixaram-se secar à temperatura ambiente.

As lâminas foram observadas num microscópio ótico Olympus U-D30 (Olympus, Tokyo, Japão) e fotografadas com uma câmara Olympus SC30 (Olympus, Tokyo, Japão).

7. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ^{223}Ra EM ESTRUTURAS 3D DE CANCRO DA PRÓSTATA

A cultura de células 2D *standard* em monocamada tem sido muito importante na investigação científica e absolutamente crucial para a realização de inúmeras descobertas e no desenvolvimento de novas metodologias. No entanto, é uma metodologia que tem algumas limitações que fazem com que a comunidade científica considere possíveis alternativas. Algumas destas desvantagens são a falta de sinalização e interação célula-célula e/ou célula-matriz extracelular, que é fundamental num ambiente real, já que esses sinais estão envolvidos na diferenciação e na proliferação celulares. Para além disso, não conseguem representar o ambiente dinâmico e complexo real, pois as células são obrigadas a ajustarem-se e aderirem a uma superfície plana e rígida, alterando o seu metabolismo e reduzindo a funcionalidade das células. Todas estas limitações levaram ao desenvolvimento de técnicas de cultura celular em três dimensões (3D) que possam fornecer às células um ambiente mais fidedigno e representativo da realidade, aumentando o potencial das abordagens científicas em estudo (Haisler *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2008; Breslin e O'Driscoll, 2013).

Na realidade as células existem em 3D com complexas e dinâmicas interações célula-célula e célula-meio ambiente. A investigação biomédica atual tem começado a utilizar métodos de desenvolvimento de cultura 3D de células de modo a simular, de forma mais real, o ambiente nativo das células. As culturas que se formam podem sintetizar matriz extracelular, têm elevada densidade e são passíveis de análise recorrendo às mesmas técnicas bioquímicas utilizadas na cultura de células (Haisler *et al.*, 2013).

Cultivar células em modelos 3D tem inúmeras vantagens relativamente à metodologia *standard*, como se pode ver na Figura 14. Comparativamente às células 2D, as células em cultura 3D mostraram melhorias ao nível da viabilidade, proliferação, diferenciação, morfologia, resposta a estímulos, expressão génica e síntese proteica (Antoni *et al.*, 2015). Para além de serem mais estáveis e permitirem uma descoberta mais rápida de mudanças morfológicas devido ao formato esférico, os agregados 3D podem ser cultivados durante mais tempo, não existindo a rápida confluência de células típica das culturas aderentes, o que sugere que sejam mais adequadas em estudos de sobrevivência a longo prazo (Antoni *et al.*, 2015).

A organização espacial das células é um fator muito importante a ter em conta, permitindo que estas se desenvolvam e comportem de uma forma muito mais aproximada à realidade e às suas condições naturais, o que torna mais fiável possíveis descobertas na transferência para aplicações *in vivo*.

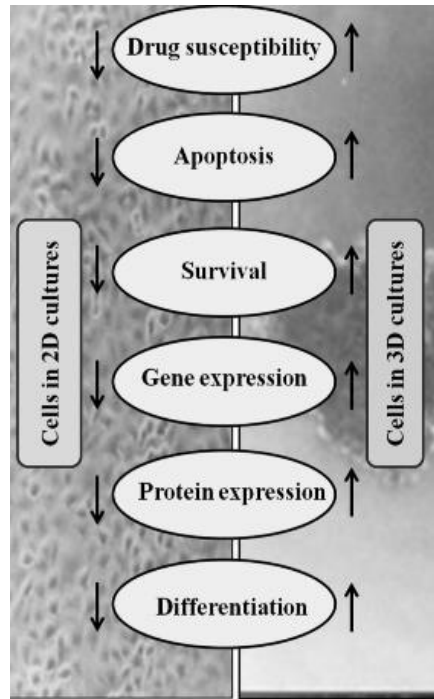


Figura 14: Vantagens da cultura 3D de células. Adaptado de (Ravi *et al.*, 2014)

A cultura 3D de células tem potencial para servir de ponte entre as culturas de monocamada e os estudos em modelos animais e é, sem dúvida, uma abordagem eficaz para estudos de citotoxicidade e agentes farmacológicos anticancerígenos, podendo ser também uma boa alternativa aos modelos de animais *in vivo* por razões de ordem financeira e ética (Ravi *et al.*, 2014; Breslin e O'Driscoll, 2013; Antoni *et al.*, 2015).

O protocolo utilizado para obter culturas 3D de células foi uma adaptação do método de levitação magnética (MLM), desenvolvido por Glauco Souza e colaboradores, tendo sido publicado em 2010 (Souza *et al.*, 2010). Baseia-se na incorporação pelas células de uma partícula magnética que lhes permite permanecer a levitar no meio de cultura através da ação de um campo magnético externo, agregando-se desta forma (Haisler *et al.*, 2013). O primeiro passo foi semear em placas de Petri a linha celular PC3 numa densidade de 2×10^6 células/mL. No dia seguinte procedeu-se à incubação com 50 μ L de uma suspensão de nanopartículas

metálicas em placas de Petri. O tempo de incubação foi de 6 horas, a 37°C no escuro, para que as células tivessem tempo de incorporar o metal. Após este tempo as células nas placas de Petri foram tripsinizadas e adicionaram-se 2×10^5 células por poço numa placa de 24 poços de baixa aderência, perfazendo cada poço com 250 μL de meio de cultura. No final colocou-se por cima da placa uma placa de levitação magnética, denominada *levitating drive* (Figura 15), constituída por ímanes que assentam em cada poço (mas não tocando) de modo a que as células que incorporaram as nanopartículas sejam atraídas pelo íman e, conseqüentemente, não adiram ao fundo do poço e permaneçam a levitar na interface ar-líquido, interagindo e agregando-se de modo a formar culturas 3D.



Figura 15: Placa de levitação magnética (*Biosciences, IncTM*).

O passo seguinte foi irradiar os poços com ^{223}Ra com uma determinada atividade A_0 . Segundo a Equação 3 os tempos correspondente à dose escolhida encontram-se na Tabela IV.

Tabela IV: Tempo correspondente à irradiação de 0,25 mL de suspensão celular, calculado para uma atividade inicial constante, para a respetiva dose escolhida

Dose (mGy)	A_0 (μCi)	Tempo (min)
10	0,3	15,1

Um aspeto crucial nesta fase da irradiação é que, quando se substitui o meio de cultura, é necessário colocar a placa de 24 poços por cima de uma placa especial, denominada *concentrating drive* (Figura 16), que contém 24 pequenos ímanes que assentam no centro de

cada poço, de modo a que ao aspirar cuidadosamente o meio, as células estejam atraídas magneticamente e não se percam, visto que não estão aderidas ao fundo do poço.

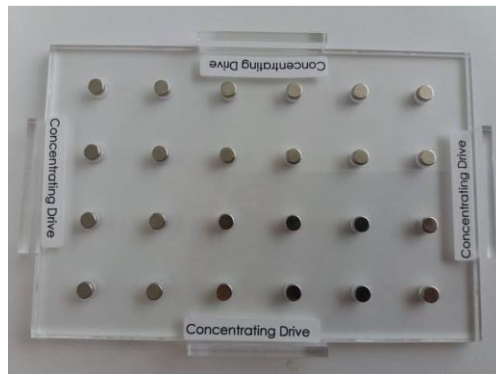


Figura 16: *Concentrating drive* (Biosciences, IncTM).

O protocolo foi realizado 48 horas após a irradiação, em que cada poço foi lavado com PBS utilizando novamente a *concentrating drive* para as células não serem descartadas. Repetiu-se este passo novamente e as culturas celulares foram transferidas para *ependorfs* devidamente identificados contendo 1,75 mL de etanol a 96%.

O objetivo deste ensaio consistiu na otimização desta metodologia para obtenção de estruturas 3D para estudar as características morfológicas na presença e na ausência de rádio-223. Para isso realizou-se um ensaio colorimétrico onde se fizeram vários esfregaços em lâminas, e deixou-se secar à temperatura ambiente. De seguida cada esfregaço foi corado com hematoxilina de Harris durante 30 segundos e, no fim, deste tempo lavou-se em água corrente. Posteriormente coraram-se os esfregaços novamente, desta vez com eosina a 1% durante 5 segundos, e o passo seguinte foi imediatamente desidratar as células nas lâminas em etanol. Por fim foi utilizado xilol com o objetivo de diafanizar os esfregaços e montou-se com meio de montagem sintético.

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com recurso ao software IBM® SPSS® 23.0 (IBM Corporation, Armonk, Nova Iorque, EUA), e os gráficos foram construídos através do

GraphPad Prism versão 7.0. A avaliação da normalidade de distribuição das variáveis quantitativas e da homogeneidade de variâncias foi feita de acordo com os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente.

Para os casos em que se verificou uma distribuição normal foram utilizados testes paramétricos e, caso contrário, testes não paramétricos. A comparação dos valores obtidos entre diferentes condições terapêuticas ou linhas celulares foi realizada segundo o teste paramétrico *Analysis of Variance* (ANOVA) de um fator ou o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*. As comparações múltiplas em caso de variâncias não presumidas foram realizadas segundo o teste de *Games-Howell* ou com a correção de *Tukey*, em caso contrário. Considerou-se uma significância de 0,05 para todas as comparações.

IV. Resultados*

* Resultados obtidos sob a supervisão, orientação e colaboração da Mestre Inês Marques.

1. AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DO ^{223}Ra

O objetivo da realização dos estudos de captação para a linha celular RWPE-1 foi caracterizar a cinética de entrada do ^{223}Ra nesta linha celular ao longo do tempo e comparar com a percentagem de captação de duas linhas celulares de cancro da próstata com valores previamente determinados, a linha celular PC3 e a linha celular LNCaP (Marques, 2016). Para isso foram definidos três períodos temporais (5, 60 e 120 minutos) com o objetivo de comparar as captações nos mesmos tempos entre as diferentes linhas celulares.

De acordo com o gráfico da Figura 17 observou-se um aumento significativo ($p < 0,001$) da captação de ^{223}Ra em relação ao tempo inicial. No entanto, esta diferença não assume significado biológico. Quando comparados entre si os diferentes tempos estudados, não existem diferenças na percentagem de captação com significado estatístico.

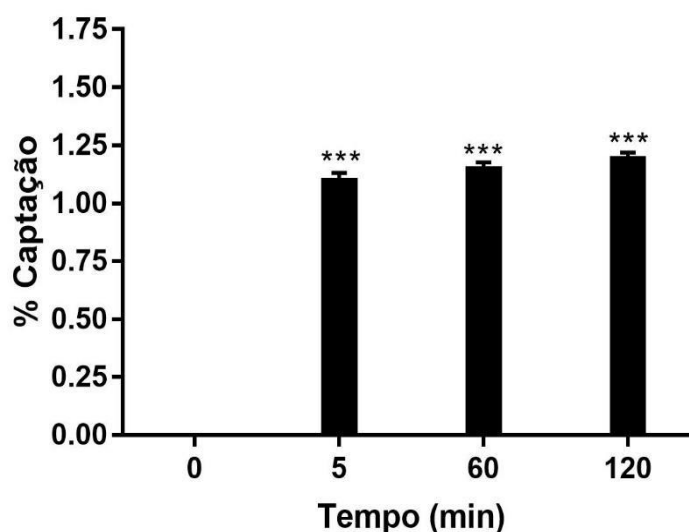


Figura 17: Avaliação da percentagem de captação de ^{223}Ra na linha celular de tecido normal da próstata, a linha celular epitelial RWPE-1. Os ensaios expressam a média percentual \pm erro padrão de pelo menos 6 experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas representam-se com *** para $p < 0,001$ quando comparados os diferentes tempos em relação à condição inicial $t=0$.

Quando comparadas as três linhas celulares (Figura 18), os resultados permitem-nos afirmar que a linha RWPE-1 aos 5 minutos é aquela que possui menor percentagem de captação ^{223}Ra , havendo diferenças com significado estatístico relativamente à linha PC3 ($p=0,018$). Quando avaliada a percentagem de captação 60 minutos após a incubação com ^{223}Ra , verificou-se que não existiam diferenças com significado estatístico entre as três linhas

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

celulares. Aos 120 minutos verificou-se que a captação da linha celular PC3 é significativamente superior à captação da linha celular RWPE-1 ($p < 0,001$). O mesmo acontece para a linha celular LNCaP, visto que a captação desta linha celular é significativamente superior à da linha celular RWPE-1 ($p < 0,001$).

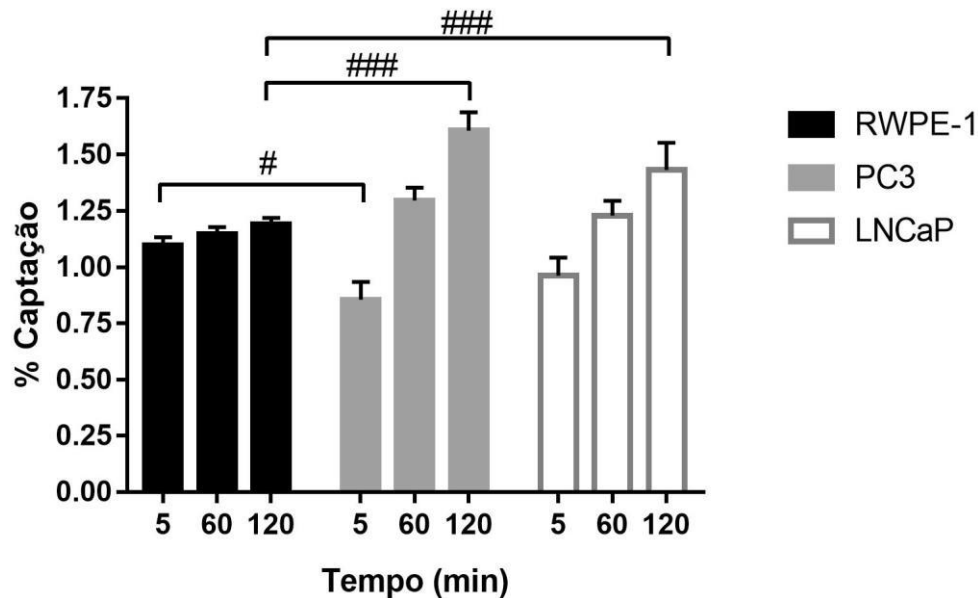


Figura 18: Avaliação da percentagem de captação de ^{223}Ra na linha celular de tecido normal da próstata, a linha celular epitelial RWPE-1, e das linhas celulares de cancro da próstata humanas, as linhas celulares LNCaP e PC3, para os tempos definidos de 5, 60 e 120 minutos. Os ensaios expressam a média percentual \pm erro padrão de pelo menos 6 experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas representam-se com # para $p < 0,05$ e ### para $p < 0,001$ quando comparados os tempos entre si.

A viabilidade celular para a linha RWPE-1 foi avaliada pelo método de exclusão do azul tripano, tendo sido obtido um valor superior a 90%.

2. ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO ENSAIO DA SULFORODAMINA B

O ensaio SRB é uma técnica que permite avaliar o conteúdo proteico total, que é proporcional à proliferação celular, avaliando desta forma o grau de citotoxicidade que um dado agente terapêutico pode induzir. O objetivo da sua realização foi avaliar o efeito celular

na linha celular RWPE-1 após exposição ao ^{223}Ra , nas doses 1, 4 e 10 mGy, e comparar com o efeito nas linhas celulares tumorais PC3 e LNCaP, avaliando e comparando as diferenças existentes a nível da proliferação celular, de acordo com o representado na figura 19.

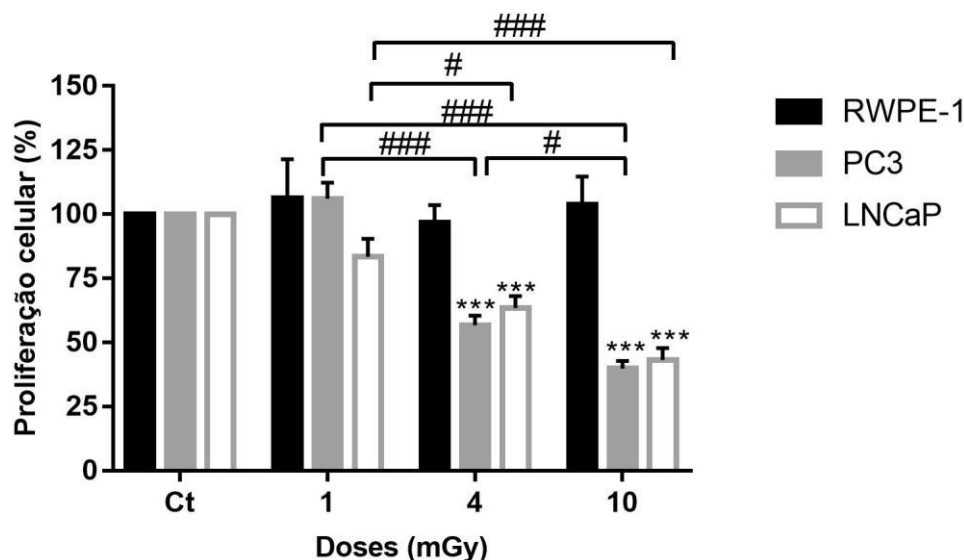


Figura 19: Avaliação da proliferação celular com recurso ao ensaio SRB da linha celular de tecido normal da próstata, a linha celular epitelial RWPE-1, e das linhas celulares de cancro da próstata humanas, as linhas celulares LNCaP e PC3, após irradiação com doses de 1, 4 e 10 mGy de ^{223}Ra . Os ensaios foram realizados 48h após a irradiação, expressando a média percentual \pm erro padrão de pelo menos 6 experiências independentes. A condição controlo foi normalizada a 100% e os resultados das restantes condições indicam a percentagem de proliferação relativamente ao controlo. As diferenças estatisticamente significativas representam-se com *** para $p < 0,001$ quando avaliada a percentagem de proliferação celular de cada dose em cada linha celular relativamente à condição controlo. As diferenças estatisticamente significativas representam-se com # para $p < 0,05$ e ### para $p < 0,001$ quando comparadas os valores de proliferação celulares entre as diferentes doses de irradiação.

No que diz respeito ao conteúdo proteico, na linha celular do epitélio da próstata RWPE-1 não se observaram diferenças com significado estatístico relativamente às células controlo, 48 horas após a irradiação. No que diz respeito à irradiação com a dose de 1 mGy de ^{223}Ra , verificou-se que as células mostram um valor de $106,36 \pm 15,05\%$, valor relativamente semelhante ao das células expostas à dose de 4 mGy, $96,69 \pm 6,91\%$, e à dose de 10 mGy, que foi de $103,69 \pm 10,99\%$.

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

No caso das linhas celulares tumorais PC3 e LNCaP, verificou-se claramente uma tendência de descida dos valores da proliferação celular à medida que a dose aumenta em relação ao controlo, diferente do que acontece com a linha celular RWPE-1. Assim, quando avaliada a percentagem de proliferação celular da linha celular PC3 nas diferentes doses, verifica-se uma diminuição significativa das percentagens da proliferação celular comparativamente com o controlo para as doses de 4 e 10 mGy ($p < 0,001$). O mesmo se observa com a linha celular LNCaP, ou seja, ocorre uma diminuição com significado estatístico com as doses de 4 e 10 mGy comparativamente com a condição controlo ($p < 0,001$). Para a linha celular PC3 a percentagem de conteúdo proteico após exposição a 10 mGy é de $39,82 \pm 2,95\%$, com diferenças estatisticamente significativas relativamente à dose de 1 mGy ($106,01 \pm 6,25\%$, $p < 0,001$) e de 4 mGy ($56,72 \pm 3,77\%$, $p = 0,045$). No que diz respeito à linha celular LNCaP a percentagem de conteúdo proteico após exposição a 10 mGy é de $43,20 \pm 4,60\%$, com diferenças estatisticamente significativas relativamente à dose de 1 mGy ($83,42 \pm 7,01\%$, $p < 0,001$) e de 4 mGy ($63,48 \pm 4,55\%$, $p = 0,113$).

Na comparação entre a linha celular RWPE-1 e as restantes PC3 e LNCaP (Tabela V), para a mesma dose de irradiação, é de notar as diferenças estatísticas significativas com a dose de 4 mGy ($p < 0,001$) entre as linhas celulares RWPE-1 e PC3 ($p < 0,001$) e as linhas celulares RWPE-1 e LNCaP ($p < 0,001$), verificando-se sempre uma percentagem de proliferação celular significativamente superior na linha celular RWPE-1.

Relativamente à dose de 10 mGy, existe igualmente uma menor proliferação celular com significado estatístico para ambas as linhas celulares tumorais, PC3 ($p = 0,004$) e LNCaP ($p = 0,004$).

Tabela V: Significância estatística na comparação entre linhas celulares para o ensaio SRB 48 horas após a irradiação

Dose (mGy)	Linhas celulares	Valor de p
1	RWPE-1 vs. PC3	1,000
	RWPE-1 vs. LNCaP	0,199
	PC3 vs. LNCaP	0,095
4	RWPE-1 vs. PC3	0,000
	RWPE-1 vs. LNCaP	0,000
	PC3 vs. LNCaP	0,528
10	RWPE-1 vs. PC3	0,004
	RWPE-1 vs. LNCaP	0,004
	PC3 vs. LNCaP	0,828

No gráfico da Figura 20 observam-se os resultados da proliferação celular relativos às linhas celulares em estudo 8 dias após a irradiação com ^{223}Ra . De acordo com o gráfico, verifica-se que a linha RWPE-1 apresenta, para a dose de 1 mGy, uma descida estatisticamente significativa em relação às células controlo, sendo esse valor de $42,04 \pm 5,35\%$ ($p < 0,001$). No entanto, esta diminuição não se verifica para as restantes doses, já que os valores da proliferação celular se mantêm semelhantes, não existindo assim diferenças com significado estatístico entre as várias doses. Para a dose de 4 mGy o valor foi de $35,04 \pm 5,19\%$, e para a dose de 10 mGy foi de $39,63 \pm 4,67\%$.

Observando os resultados das linhas celulares tumorais verifica-se que os valores da proliferação celular vão diminuindo à medida que a dose aumenta, semelhante ao ocorrido nos ensaios efetuados 48 horas após a irradiação. Assim, relativamente ao controlo, para ambas as linhas celulares PC3 e LNCaP obtiveram-se valores de proliferação significativamente inferiores para as doses de 4 e de 10 mGy ($p < 0,001$). Na linha celular PC3 os valores de proliferação celular foram de $60,06 \pm 2,87\%$ e $27,54 \pm 2,90\%$ para as doses de 4 e de 10 mGy respetivamente, enquanto que para a linha celular LNCaP foram de $63,87 \pm 3,78\%$ e $51,31 \pm 3,78\%$ respetivamente.

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

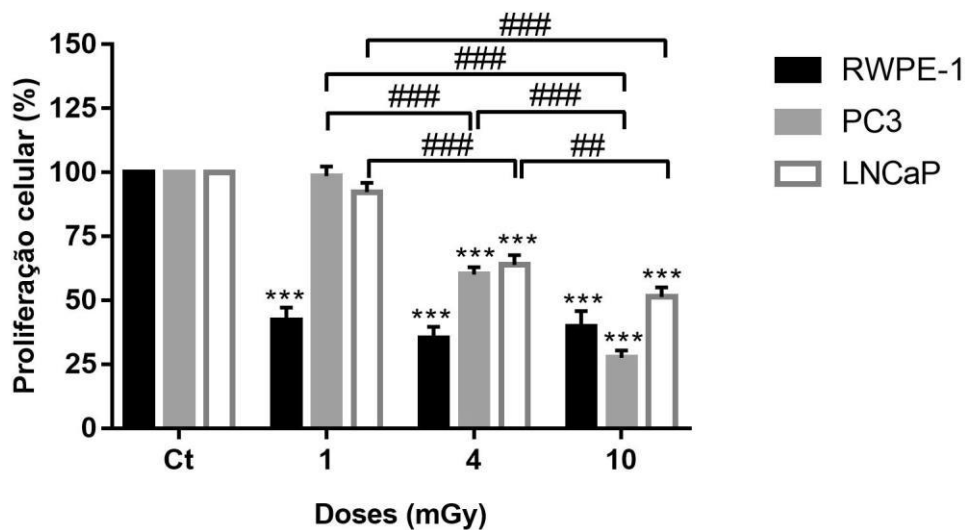


Figura 20: Avaliação da proliferação celular com recurso ao ensaio SRB da linha celular de tecido normal da próstata, a linha celular epitelial RWPE-1, e das linhas celulares de cancro da próstata humanas, as linhas celulares LNCaP e PC3, após irradiação com doses de 1, 4 e 10 mGy de ^{223}Ra . Os ensaios foram realizados 8 dias após a irradiação, expressando a média percentual \pm erro padrão de pelo menos 6 experiências independentes. A condição controlo foi normalizada a 100% e os resultados das restantes condições indicam a percentagem de proliferação relativamente ao controlo. As diferenças estatisticamente significativas representam-se com *** para $p < 0,001$ quando avaliada a percentagem de proliferação celular de cada dose em cada linha celular relativamente à condição controlo. As diferenças estatisticamente significativas representam-se com ## para $p < 0,01$ e ### para $p < 0,001$ quando comparadas os valores de proliferação celulares entre as diferentes doses de irradiação.

Quando avaliada a proliferação celular nas diferentes linhas celulares para a mesma dose de radiação, verificou-se que, de acordo com a tabela VI, após a irradiação com a dose de 1 mGy as linhas celulares tumorais, PC3 e LNCaP, possuem uma proliferação celular significativamente maior comparativamente com a linha celular normal RWPE-1 ($p < 0,001$).

Relativamente à dose de 4 mGy verificou-se o mesmo já descrito para a dose de 1 mGy, ou seja, nas linhas celulares PC3 e LNCaP observa-se uma proliferação maior com significado estatístico quando comparados com a linha celular normal RWPE-1 ($p < 0,001$).

Oito dias após a irradiação com ^{223}Ra com a dose de 10 mGy verificou-se que todas as linhas celulares possuíam uma proliferação menor ou igual a 50%. Verificou-se também que a linha celular com menor proliferação foi a linha celular PC3, com diferenças estatisticamente significativas relativamente à linha celular LNCaP ($p < 0,001$).

Tabela VI: Significância estatística na comparação entre linhas celulares para o ensaio SRB 8 dias após a irradiação

Dose (mGy)	Linhas celulares	Valor de p
1	RWPE-1 vs. PC3	0,000
	RWPE-1 vs. LNCaP	0,000
	PC3 vs. LNCaP	0,513
4	RWPE-1 vs. PC3	0,000
	RWPE-1 vs. LNCaP	0,000
	PC3 vs. LNCaP	0,726
10	RWPE-1 vs. PC3	0,081
	RWPE-1 vs. LNCaP	0,110
	PC3 vs. LNCaP	0,000

3. ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA CELULAR PELO ENSAIO CLONOGÉNICO

O ensaio clonogénico é utilizado para avaliar a capacidade de uma célula formar colónias após irradiação. O ^{223}Ra é um emissor de partículas alfa com elevado LET, caracterizando-se por provocar alterações na cadeia dupla da molécula de DNA e, conseqüentemente, influenciar a viabilidade celular, constituindo os efeitos diretos. O objetivo principal na utilização desta técnica consistiu em comparar a linha celular normal RWPE-1 no que diz respeito à capacidade de formar colónias após irradiação com ^{223}Ra com as linhas celulares de cancro da próstata LNCaP e PC3 já previamente avaliadas (Marques, 2016), e perceber as diferenças existentes.

A Figura 21 representa os fatores de sobrevivência obtidos para as linhas celulares RWPE-1, PC3 e LNCaP, após exposição a doses de ^{223}Ra de 1, de 4 e de 10 mGy. Um dos aspetos mais relevantes e facilmente identificáveis foi a diminuição significativa dos fatores de sobrevivência das células normais RWPE-1 relativamente ao controlo ($p < 0,001$), para todos os valores de dose avaliados. O valor para a exposição à dose de 1 mGy foi de $0,38 \pm 0,03$. Para as doses de 4 e de 10 mGy os valores foram de $0,39 \pm 0,02$ e $0,34 \pm 0,02$, respetivamente, não existindo diferenças significativas entre os diferentes fatores de sobrevivência para as diferentes doses.

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

Para a linha celular PC3 os dados obtidos mostraram uma diminuição significativa ($p < 0,01$; $p < 0,001$) do fator de sobrevivência à medida que a dose de radiação aumenta, em relação ao controlo. O valor obtido para a exposição a 10 mGy foi de $0,21 \pm 0,05$, com diferenças estatísticas em relação a 1 mGy ($0,81 \pm 0,02$; $p = 0,01$) e 4 mGy ($0,54 \pm 0,03$). No caso da linha celular LNCaP, para além da diminuição significativa do fator de sobrevivência com o aumento da dose ($p < 0,05$; $p < 0,001$), verificou-se uma elevada diminuição quando comparadas as doses de 1 e 4 mGy, em que o fator de sobrevivência passa de $0,93 \pm 0,01$ para $0,28 \pm 0,04$ ($p < 0,001$). Finalmente, para a dose de 10 mGy o fator de sobrevivência não sofreu alterações significativas em relação à dose anterior, sendo de $0,30 \pm 0,09$.

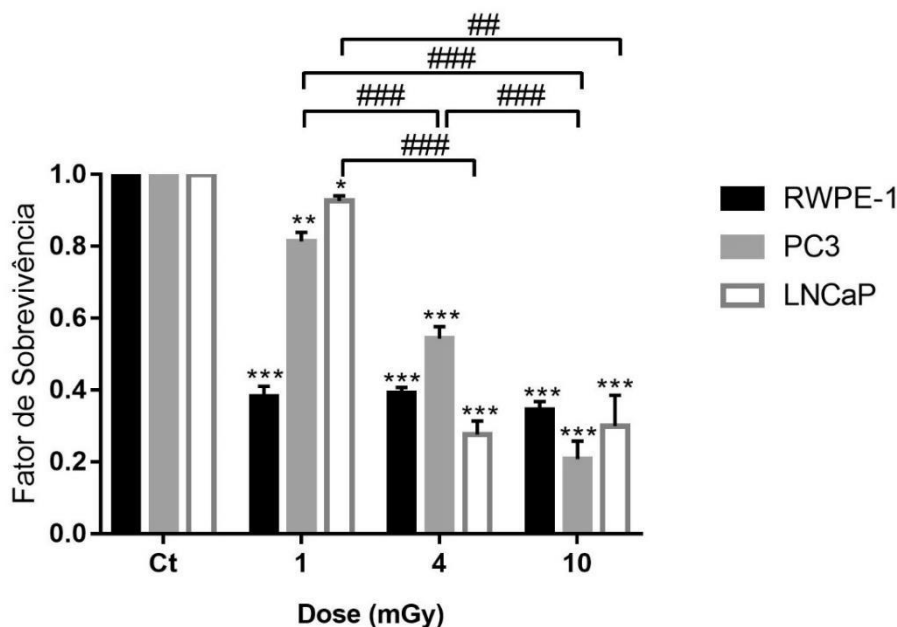


Figura 21: Análise da sobrevivência celular da linha celular de tecido normal da próstata, a linha epitelial RWPE-1, e das linhas celulares de cancro da próstata humano, as linhas celulares LNCaP e PC3, após irradiação com doses de 1, 4 e 10 mGy. Os gráficos expressam a média percentual \pm erro padrão de pelo menos 8 ensaios independentes. As diferenças estatisticamente significativas representam-se com * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$ quando avaliada a condição (dose) e respetivo controlo. As diferenças estatisticamente significativas representam-se com ## para $p < 0,01$ e ### para $p < 0,001$ quando comparados os valores dos fatores de sobrevivência entre as diferentes doses de irradiação.

Ao comparar os resultados da linha RWPE-1 com os resultados das restantes linhas celulares (Tabela 7), foi possível destacar diferenças com significado estatístico para 1 mGy ($p < 0,001$), quando comparada a linha celular RWPE-1 com ambas as linhas celulares tumorais.

Quando avaliados os resultados obtidos após irradiação com 4 mGy, o fator de sobrevivência da linha celular RWPE-1 foi significativamente inferior ao fator de sobrevivência da linha celular PC3 ($p=0,009$). Existem também diferenças entre as linhas celulares tumorais, verificando-se que a linha celular PC3 demonstrou um menor fator de sobrevivência, após irradiação com 4 mGy. Para o valor de dose de 10 mGy não existiram diferenças entre as linhas celulares.

Tabela VII: Significância estatística na comparação entre linhas celulares para o ensaio clonogénico

Dose (mGy)	Linhas celulares	Valor de p
1	RWPE-1 vs. PC3	0,000
	RWPE-1 vs. LNCaP	0,000
	PC3 vs. LNCaP	0,008
4	RWPE-1 vs. PC3	0,009
	RWPE-1 vs. LNCaP	0,060
	PC3 vs. LNCaP	0,000
10	RWPE-1 vs. PC3	0,353
	RWPE-1 vs. LNCaP	0,852
	PC3 vs. LNCaP	0,640

4. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA PELO MÉTODO MAY-GRÜNWARD GIEMSA

A morte celular poderá acontecer devido a diversos processos e cada um deles apresenta características morfológicas e bioquímicas próprias e distintas. A apoptose, a necrose, a autofagia ou a catástrofe mitótica são alguns exemplos de morte celular (Mendes, 2016).

A apoptose é geralmente um processo rápido relacionado com a morte celular programada, com participação ativa nos processos normais de desenvolvimento e de homeostasia. A apoptose desregulada está relacionada com muitas patologias, incluindo o cancro, e pode ocorrer também como consequência de danos celulares induzidos por agentes citotóxicos e/ou radiação ionizante, na atrofia de órgãos e na reposição a nível fisiológico de tecidos diferenciados (Mendes, 2016; Leze, 2011).

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

As características morfológicas identificativas da apoptose são a contração celular, provocando perda de aderência à matriz extracelular e às células em seu redor, e a condensação e fragmentação da cromatina, que se concentra na membrana celular. De seguida pode ocorrer o aparecimento de prolongamentos (*blebs*) na membrana, estruturas estas também designadas por corpos apoptóticos que contêm algum conteúdo celular no seu interior que se mantém íntegro, ocorrendo a desintegração do núcleo (Leze, 2011; Mendes, 2016; Elmore, 2007; Tait e Green, 2010).

Já a necrose refere-se a um tipo de morte relacionado com a perda do equilíbrio iónico, aumento do volume citoplasmático devido à entrada de água e, conseqüentemente, lise celular. Este processo provoca a saída de inúmeros constituintes celulares que, na maioria das vezes, está associado a uma resposta inflamatória (Fulda *et. al.*, 2010).

Através do ensaio *May-Grünwald Giemsa* e posterior visualização por microscopia ótica foi possível observar detalhes morfológicos das células. Em citologia estes aspetos são em grande parte fornecidos pelo detalhe da cromatina, mas também pela relação núcleo/citoplasma e pela forma dos grupos celulares.

Na Figura 22 estão ilustradas imagens representativas da morfologia das três linhas celulares utilizadas neste projeto após irradiação com ^{223}Ra com as doses de 0,4 e 4 mGy.

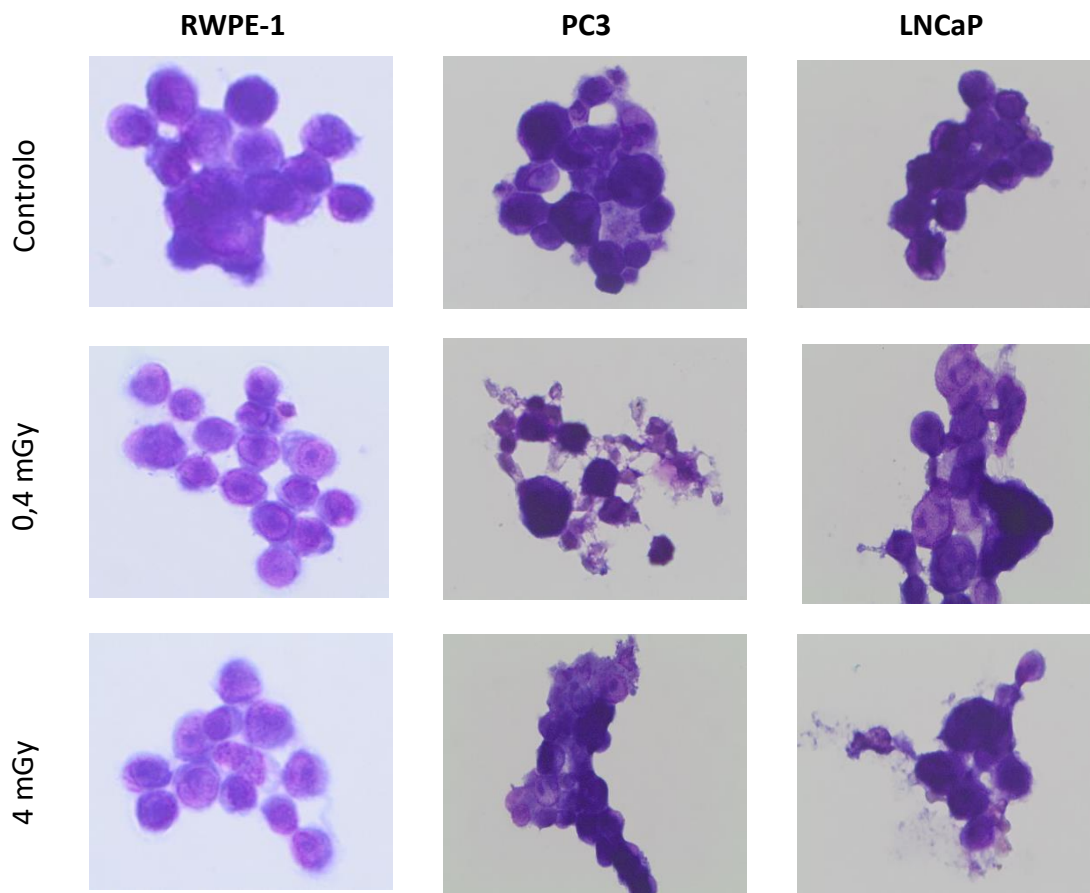


Figura 22: Análise morfológica das células RWPE-1, PC3 e LNCaP após coloração das células com recurso ao corante May-Grünwald-Giemsa. As linhas celulares foram expostas a doses de 0,4 e 4 mGy de ^{223}Ra , para além da ausência de exposição à radiação (Controlo). Os ensaios foram realizados 48h após a irradiação. As imagens foram obtidas com recurso a um microscópio ótico e apresentam-se com uma ampliação de 400x.

Para a linha celular RWPE-1, nas condições 0,4 mGy e 4 mGy, percebeu-se que há algum polimorfismo celular, cromatina a marginalizar e nucléolos, aspetos descritos como uma resposta das células a uma agressão, mas não é visível de uma forma clara os aspetos típicos que caracterizam a morte celular definidos anteriormente.

Para as linhas celulares LNCaP e PC3 é perceptível a existência de morte celular nas condições de irradiação de 0,4 e de 4 mGy. No entanto não existem sinais de ocorrência de apoptose sendo mais perceptível a necrose, já que se observa o extravasamento da membrana citoplasmática e aspetos celulares reativos, como a presença de nucléolos aumentados e aumento do tamanho nuclear.

5. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ^{223}Ra EM ESTRUTURAS 3D DE CANCRO DA PRÓSTATA

O microambiente tumoral tem um papel essencial na resposta dos tumores às diferentes abordagens terapêuticas, em particular à utilização de radiação ionizante. A realização deste ensaio teve como objetivo o desenvolvimento e a otimização de estruturas 3D de linhas celulares de cancro da próstata. Assim, com este projeto pretendeu-se utilizar o método de levitação magnética (MLM) para obter aglomerados de células com um formato 3D característico e, se possível, com o objetivo de estudar os efeitos do ^{223}Ra em estruturas 3D. Este consistiu num estudo preliminar, uma vez que esta técnica ainda não está completamente otimizada, para a linha celular PC3.

As imagens representativas obtidas para a linha celular PC3 encontram-se ilustradas na Figura 23. As células para o grupo controlo apresentam uma estrutura tridimensional com formato esférico bastante evidente, com uma organização espacial claramente identificativa deste tipo de cultura, totalmente diferente da cultura em monocamada aderente proporcionada pela cultura de células em frascos de cultura. É visível uma estrutura 3D com uma grande quantidade de células sem qualquer tipo de morte celular.

Quando analisada a morfologia das células expostas à dose de 10 mGy, embora não sejam visíveis evidentes aspetos de necrose, verifica-se uma elevada condensação da cromatina, o que é indicativo de uma resposta preliminar a uma agressão celular.

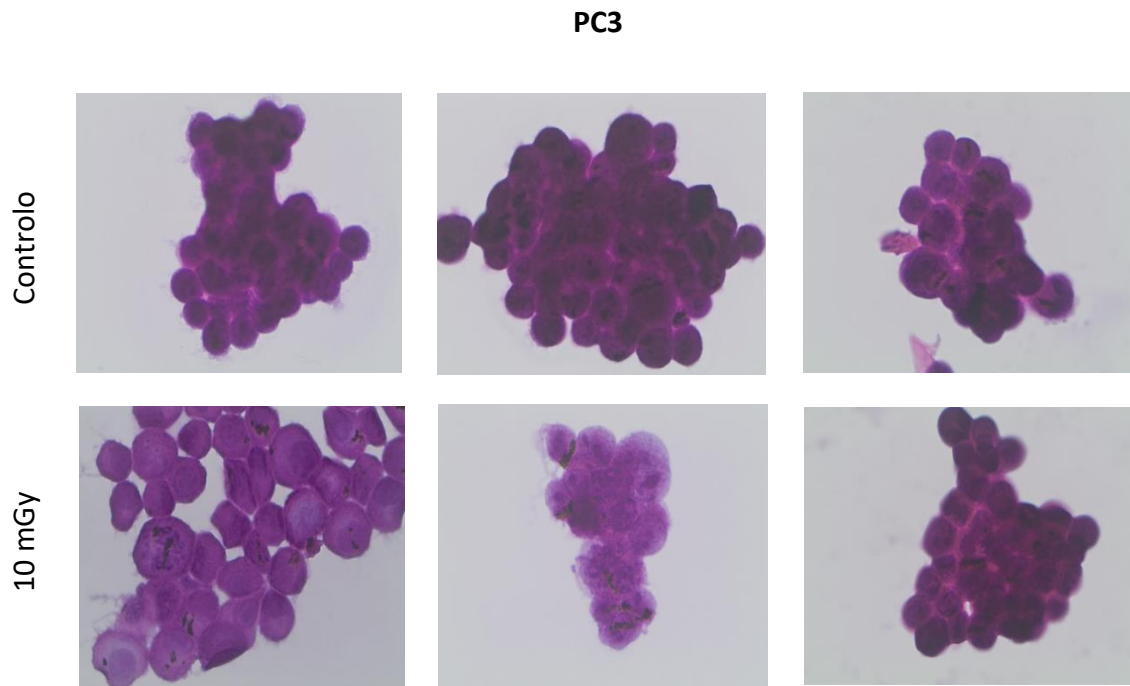


Figura 23: Análise morfológica da estrutura 3D das células PC3 após aplicação do método de levitação magnética. Os resultados foram obtidos expondo as linhas celulares à dose de 10 mGy de ^{223}Ra , para além da ausência de exposição à radiação (Controlo). Os ensaios foram realizados 48h após a irradiação. As imagens foram obtidas com recurso a um microscópio ótico e apresentam-se com uma ampliação de 400x.

V. Discussão

O cancro da próstata é o tipo de cancro mais comum na população idosa masculina na Europa. Esta neoplasia tem-se revelado um problema de saúde bastante preocupante atualmente, principalmente em países desenvolvidos que apresentam uma maior percentagem de idosos na sua população (Mottet *et al.*, 2014).

Com o conhecimento do papel crucial que os recetores de androgénio desempenham neste tipo de cancro, o termo “cancro da próstata resistente à castração” (CPRC) surgiu para descrever um estado clínico em que o recurso à terapia por privação de androgénios, com o intuito de diminuir drasticamente os níveis de testosterona, é totalmente ineficaz e existe uma progressão contínua da doença. Nesta fase da doença os doentes podem apresentar-se assintomáticos e não metastizados, em que a sua identificação é feita pelos níveis crescentes de PSA, ou então os tumores muito agressivos e caracterizam-se pela presença de metástases ósseas (Bishr e Saad, 2013). As metástases ósseas são responsáveis pela diminuição da qualidade de vida do doente, devido a sintomas graves como dor aguda e perda de mobilidade. A existência de metástases define um novo estágio da doença, designado por carcinoma da próstata metastático resistente à castração (CPMRC), que apresenta um elevado índice de mortalidade (Marques, 2016).

Tem sido preocupação generalizada conseguir encontrar fármacos que possam ser uma alternativa eficaz no combate nesta fase da patologia. Tendo em conta a informação conhecida, a utilização de agentes que tenham a capacidade de mimetizar o cálcio vem sendo uma das estratégias adotadas. O dicloreto de rádio-223 (^{223}Ra) surge assim como um radiofármaco aprovado pela EMA (do inglês, *European Medicines Agency*) utilizado no tratamento de doentes com carcinoma da próstata resistente à castração, sem metástases viscerais detetáveis e com metástases ósseas sintomáticas (Shirley e McCormack, 2014; Sartor *et al.*, 2014). Embora existam alguns fármacos, como o docetaxel e o cabazitaxel que revelaram eficácia no tratamento do CPRC, o ^{223}Ra apresenta a característica singular de ser um emissor de partículas alfa.

O ^{223}Ra tem um tempo de semi-desintegração de 11,4 dias. Por cada átomo de ^{223}Ra que decai são emitidas quatro partículas alfa, que representam cerca de 95% da energia total. O alcance das partículas deste radioisótopo é bastante curto (100 μm), o que faz com que provoque morte celular num pequeno volume de tecido e, assim, minimize possíveis lesões nos tecidos normais adjacentes, como é o caso da medula óssea (Nilsson, 2016).

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

A principal característica bioquímica do ^{223}Ra é mimetizar o cálcio e ter a capacidade de se ligar ao osso, com formação de complexos com a hidroxiapatite principalmente em metástases onde ocorre a formação de novo osso. Para além disso, esta forte ligação do ^{223}Ra ao osso leva a que os radionuclídeos filho fiquem retidos na matriz óssea. É um emissor de partículas alfa com utilização clínica aprovada para o tratamento do cancro da próstata resistente à castração em doentes com metástases ósseas sintomáticas. Desta forma, a sua grande vantagem é o aumento do tempo de sobrevida dos doentes ao atuar nas lesões do esqueleto. O elevado LET das partículas alfa provoca a quebra, geralmente irreparável, da cadeia dupla de DNA nas células tumorais, levando à sua morte em todas as fases do ciclo celular. Este radiofármaco apresenta um baixo nível de mielossupressão, ao contrário dos emissores de partículas beta (Coleman, 2016; McKay *et al.*, 2017).

O estudo ALSYMPCA, ensaio clínico de fase III, realizado em 2013 testou a eficácia do rádio-223 no CPMRC, e os resultados obtidos provaram que este radiofármaco aumentou em mais de três meses o tempo de sobrevida médio em comparação com a administração de placebo (Parker *et al.*, 2013).

No que diz respeito à realização de estudos *in vitro* existe já trabalho de investigação desenvolvido com o objetivo de estudar os efeitos deste radiofármaco, emissor de partículas alfa, em linhas celulares do cancro da próstata, a LNCaP proveniente de uma metástase linfática do cancro da próstata, e a PC3 derivada de uma metástase óssea do cancro da próstata (Marques, 2016), com foco especial na sobrevivência celular e na avaliação da cinética do ^{223}Ra . Assim, e de forma complementar, o grande objetivo do nosso trabalho consistiu em aprofundar o conhecimento acerca dos mecanismos de ação do ^{223}Ra numa linha celular de tecido epitelial normal da próstata, a linha celular RWPE-1, ou seja, uma linha celular não tumoral, com o recurso a diferentes tipos de ensaios. O facto de as células serem normais significa que, idealmente, devem sofrer o menos possível os efeitos da irradiação de modo a não existir ou minimizar danos nos tecidos saudáveis causados pela terapêutica com radiação ionizante.

Para podermos comparar os resultados obtidos com as duas linhas celulares tumorais seguiu-se metodologia semelhante. Assim, expuseram-se as células da linha celular normal a diferentes doses de radiação. Numa primeira fase efetuaram-se estudos de captação do ^{223}Ra

para compreender as diferenças na cinética das várias linhas celulares em estudo (normal e tumorais). De seguida, prosseguiu-se para uma avaliação da proliferação celular através do ensaio SRB, de modo a perceber a citotoxicidade que foi induzida pelo radiofármaco na linha normal por comparação com as outras linhas celulares já estudadas. No fim desta fase avaliou-se o efeito da radiação ionizante na sobrevivência celular através do ensaio clonogénico, com base no princípio da formação de colónias. Os fatores de sobrevivência obtidos para as diferentes doses na linha celular RWPE-1 foram comparados com os resultados existentes das linhas celulares de cancro da próstata. De forma a corroborar os resultados obtidos realizaram-se estudos de morfologia, de modo a avaliar a morte celular através do método de coloração com *May-Grünwald Giemsa*, para todas as linhas celulares em estudo. Por fim, e tendo em conta a influência do microambiente no desenvolvimento do tumor (Onuchic e Chammas, 2010), foi desenvolvido e otimizado a metodologia por levitação magnética (MLM) com o propósito de estabelecer culturas de cancro da próstata em 3 dimensões, utilizando a linha celular PC3. Tendo em conta algumas das desvantagens que a cultura celular 2D apresenta, nomeadamente não conseguir representar o ambiente dinâmico real no qual as células estão inseridas, têm surgido algumas técnicas inovadoras no sentido de obter estruturas tridimensionais e assim obter resultados dos efeitos dos agentes citotóxicos de modo mais fidedigno. Assim, o objetivo principal foi realizar estudos preliminares com recurso ao MLM, apenas para a linha celular PC3, de modo a verificar a viabilidade deste método na aglomeração tridimensional das células e também se os efeitos da radiação alfa se repercutiam na sua morfologia.

Todos os estudos de captação *in vitro* foram efetuados para os tempos definidos de 5, 60 e 120 minutos. De acordo com os resultados foi possível verificar que existe captação de ^{223}Ra por parte das células da linha RWPE-1, sendo que é na fase inicial que a captação é superior. O valor da percentagem de captação após 5 minutos de exposição é de $1,10 \pm 0,03\%$, um valor mais elevado comparativamente com a linha LNCaP ($0,96 \pm 0,08\%$) e com a linha PC3 ($0,86 \pm 0,08\%$). No entanto, ao fim de 120 minutos a linha RWPE-1 é a que apresenta menor valor de captação ($1,19 \pm 0,03\%$), com significância estatística ($p < 0,001$), comparativamente com a linha celular LNCaP ($1,43 \pm 0,12\%$) e com a linha celular PC3 ($1,61 \pm 0,08\%$). Assim, e de acordo com os resultados obtidos para os tempos iniciais, podemos concluir que o ^{223}Ra apresenta maior seletividade para as linhas tumorais do que para as células normais. As células

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

tumorais apresentam um comportamento completamente alterado em relação às células não tumorais. A linha celular PC3, que deriva uma metástase óssea, é aquela que apresenta maior captação. Estes dados confirmam as características do ^{223}Ra que mimetizam o comportamento do cálcio (Liepe e Shinto, 2016). Anteriormente foi provado que a utilização de um fármaco com capacidade de bloquear os canais de cálcio, o verapamil, provocou uma diminuição significativa na captação de ^{223}Ra em linhas celulares tumorais LNCaP e PC3, o que comprova a relação de dependência entre estes canais e a entrada de ^{223}Ra nas células (Marques, 2016).

Com o objetivo de esclarecer se o ^{223}Ra efetivamente entra nas células da linha celular RWPE-1, poderiam ser realizados outros estudos, nomeadamente estudos de internalização. Neste tipo de ensaios é necessário efetuar uma lavagem ácida do *pellet* com o objetivo de retirar a atividade que fica adsorvida à superfície da célula. Desta forma seria possível saber se a ligação ocorre por internalização ou de uma forma extracelular (Marques, 2016).

O ensaio SRB é utilizado para determinar a proliferação celular, baseando-se na massa proteica total (Neves, 2016). Este ensaio foi utilizado neste estudo com o objetivo de avaliar os efeitos nas três linhas celulares, 48 horas e 8 dias após exposição ao ^{223}Ra . As doses escolhidas foram de 1, 4 e de 10 mGy, e permitiram avaliar e estabelecer diferenças em relação à proliferação celular.

Quando comparadas as 3 linhas celulares verificou-se que, 48 horas após a irradiação, na linha celular RWPE-1 não ocorreram alterações na proliferação celular comparativamente com as linhas celulares tumorais PC3 e LNCaP, nas quais a proliferação celular diminuiu à medida que a dose aumentava. Em 1906, os franceses Bergonie e Tribondeau estabeleceram alguns pressupostos relacionados com a sensibilidade dos tecidos à radiação, afirmando que a sensibilidade de uma célula à radiação é dependente do seu grau de diferenciação e da sua atividade mitótica. Quanto menor for a diferenciação celular e maior for a taxa de multiplicação, mais sensível essa célula será à radiação (Araújo *et al.*, 2012).

No entanto, 8 dias após a irradiação o mesmo não se verifica, já que neste período a linha celular RWPE-1 sofre uma diminuição na proliferação celular que é acompanhada também por uma diminuição do fator de sobrevivência verificada através do ensaio clonogénico, comparativamente com as linhas celulares PC3 e LNCaP.

Os efeitos diretos são provocados após deposição de energia pela radiação na célula, e surgem em consequência da lesão em macromoléculas importantes, como o DNA ou certas proteínas e lípidos membranares. Quando os danos provocados nas estruturas não podem ser reparados resultam em mutações, aberrações cromossômicas ou, diretamente, em morte celular, afetando a sobrevivência da célula (Mendes, 2016). Este efeito tem maior probabilidade de ocorrer com radiação de alto LET, como é o caso das partículas alfa emitidas pelo ^{223}Ra (Marques *et al.*, 2018).

Para além disso, e tendo em conta a bibliografia, as células tumorais desenvolvem mecanismos de proteção comparativamente com as células normais. As células tumorais, ao contrário das células normais, adquirem alterações genéticas que alteram a funcionalidade das vias de sinalização que no caso das células tumorais do cancro da próstata estão dependentes de androgénios, permitindo a entrada de nutrientes que vão estimular a sobrevivência e o crescimento celulares (Abrantes, 2013). Assim, a possível justificação para estes resultados pode estar baseada nesta hipótese, ou seja, na linha celular RWPE-1, que possui maior tempo de duplicação, verifica-se uma maior radiosensibilidade comparativamente com as linhas celulares tumorais PC3 e LNCaP, que apresentam maior radorresistência e menor tempo de duplicação celular.

No entanto, e tendo em conta os métodos escolhidos, é necessário reconhecer no método do SRB algumas limitações, nomeadamente se a diminuição da atividade metabólica celular corresponde a uma redução do número de células (Neves, 2016). A análise da morfologia das três linhas celulares foi obtida através do método de coloração com *May-Grünwald Giemsa*. Enquanto que as células normais são todas iguais, têm a cromatina fina e regularmente distribuída pelo núcleo e a relação núcleo/citoplasma é pequena, as células neoplásicas são diferentes entre si no tamanho e apresentam grande relação núcleo/citoplasma. Já as células reativas apresentam quase sempre cromatina mais grosseira e formação de nucléolos, mas mantêm a relação núcleo/citoplasma pouco alterada. As células em processo de morte apresentam grande relação núcleo/citoplasma, cromatina grosseira, por vezes marginalizada à membrana nuclear, os limites citoplasmáticos podem apresentar-se por vezes indefinidos, por vezes com extravasamento do conteúdo representando aspetos morfológicos compatíveis com morte por necrose. Já a morte por apoptose é a mais fácil de

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

identificar quando se observam *blebs* (Marshall *et al.*, 1997; Baba e Câttoi, 2007; Mendes, 2016).

Neste trabalho procedeu-se à irradiação com doses de 0,4 e 4 mGy nas três linhas celulares, e os resultados foram obtidos 48 horas após a irradiação. Para a linha celular RWPE-1 não são visíveis aspetos típicos de morte celular, ao contrário das linhas celulares tumorais PC3 e LNCaP, em que é perceptível evidências de necrose, principalmente devido ao extravasamento da membrana citoplasmática. Estes factos corroboram os resultados do ensaio SRB, pois para a linha celular RWPE-1 não há diminuição da proliferação ao fim de 48 horas, ao contrário do que acontece nas linhas tumorais. Assim, todos estes dados permitem-nos inferir uma maior seletividade do ^{223}Ra para as células tumorais relativamente às células normais. Uma das formas de aprofundar este tema seria obter imagens morfológicas 8 dias após a irradiação de modo a caracterizar o tipo de morte celular que se observa e se os resultados corroboram os resultados do ensaio SRB correspondente.

A última abordagem efetuada neste trabalho foi o estudo da formação de estruturas celulares 3D com a linha celular PC3 e irradiação das mesmas com ^{223}Ra . A cultura de células 3D tem vindo a ser desenvolvida no sentido de ultrapassar algumas das desvantagens que a cultura em monocamada 2D apresenta. A cultura 2D não consegue representar de uma forma real o ambiente dinâmico e complexo onde as células se inserem, verificando-se uma diminuição na interação célula-célula / célula-matriz extracelular, cujos sinais estão envolvidos em processos de diferenciação e de proliferação celulares, e também reduz em parte a funcionalidade das células ao terem de se ajustar à superfície rígida do frasco de cultura (Lee *et al.*, 2008; Haisler *et al.*, 2013; Breslin e O'Driscoll, 2013).

O surgimento da técnica de cultura de células 3D aproximou a cultura de células às condições *in vivo*, diminuindo o intervalo que existe entre o sistema de cultura celular e a fisiologia real da célula (Ravi *et al.*, 2014). Como referido anteriormente, este tipo de cultura apresenta uma maior estabilidade e a sua forma esférica permite uma melhor caracterização morfológica, simulando as dinâmicas celulares de uma maneira mais real. As células em cultura 3D mostraram melhorias a nível de diversos parâmetros, como a morfologia, a viabilidade, a proliferação, a diferenciação e a síntese proteica. Para além disso também são mais adequadas para estudos a longo prazo (Antoni *et al.*, 2015).

Através das imagens representadas na figura 21 podemos concluir que o objetivo principal foi alcançado, pois é bem visível a organização espacial esférica das células, o que confere um aspeto tridimensional à cultura. Como referido anteriormente, este tipo de organização espacial é um fator fundamental no desenvolvimento celular já que permite que exista uma maior aproximação com o que acontece *in vivo*, simulando por isso de melhor forma as condições naturais da célula e permitindo desta forma melhorar os estudos a realizar.

A pouca literatura existente neste assunto indica que estudos recentes realizados demonstraram que a utilização de nanopartículas magnéticas não induziu uma resposta inflamatória nem afetou o metabolismo e a proliferação celulares, sendo estes indicadores positivos (Haisler *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2010; Tseng *et al.*, 2013). De acordo com os resultados uma das limitações do estudo foi não ser muito visível os aspetos morfológicos de morte celular esperados para uma dose tão elevada de ^{223}Ra . É notória a condensação da cromatina, mas não há lise celular típica do processo de necrose que foi encontrada no ensaio May-Grünwald-Giemsa. No entanto este foi apenas um ensaio preliminar, que garantiu a formação com sucesso de estruturas 3D mas que necessita de ser otimizado no futuro de modo a garantir o sucesso de todos os tipos de testes citotóxicos que sejam feitos.

Como referido anteriormente, a baixa velocidade das partículas alfa comparativamente com as partículas gama e beta faz com que estas apresentem um alcance muito curto, inferior a 100 μm (Nilsson, 2016). Biologicamente este valor traduz-se em menos de 10 diâmetros de células, e por isso sejam visíveis algumas alterações na célula, nomeadamente no núcleo.

Neste contexto poderá ser importante aumentar os períodos temporais que foram seguidos neste protocolo. Neste estudo a irradiação ocorreu 48 horas após a implementação do MLM nas células, e os ensaios morfológicos foram realizados 48 horas após a irradiação. Algumas das sugestões a adotar passam por deixar as células crescer durante mais tempo, obtendo assim um maior número de células na estrutura 3D, e só depois proceder à irradiação. Para além disso, de modo a obter de forma mais visível os efeitos morfológicos do ^{223}Ra em termos de morte celular, proceder à realização dos ensaios 8 dias após a irradiação, tal como se fez no ensaio SRB.

VI. Conclusões e Perspetivas Futuras

A realização deste trabalho laboratorial teve como principal objetivo sujeitar três linhas celulares à irradiação com o radiofármaco ^{223}Ra e avaliar os efeitos que surgem ao nível da captação, proliferação, sobrevivência e morfologia celular, utilizando diversas metodologias. Duas das linhas celulares eram de carcinoma da próstata, a LNCaP e a PC3, e a outra uma linha celular normal derivada do epitélio da próstata, não cancerígena, a RWPE-1, constituíram o objeto deste trabalho que visou o aprofundamento do conhecimento acerca dos efeitos da radioterapia metabólica utilizando Rádio-223 no CPMRC. Outro dos objetivos proposto consistiu na obtenção e otimização de estruturas tridimensionais de células tumorais da próstata.

A avaliação da cinética do ^{223}Ra com recurso aos estudos de captação permitiu-nos concluir que ocorre captação de ^{223}Ra nas células RWPE-1, sendo que esta ocorre de forma maioritária numa fase inicial. No entanto, e comparativamente com as células tumorais, o seu valor é inferior. No futuro poderão ser realizados estudos de internalização do ^{223}Ra , de modo a esclarecer se o radiofármaco efetivamente é internalizado nesta linha celular ou se a ligação acontece somente por adsorção à membrana citoplasmática. Para além disso a realização de estudos de efluxo seriam uma mais valia na compreensão dos mecanismos de efluxo do ^{223}Ra para o exterior da célula.

O ensaio SRB na linha celular RWPE-1, 8 dias após a irradiação, revelou uma diminuição na proliferação celular comparativamente com as linhas celulares PC3 e LNCaP. Estes dados são corroborados pelo ensaio clonogénico, pois também se verifica uma diminuição do fator de sobrevivência para a linha celular RWPE-1. Podemos concluir assim que se verifica uma maior radiosensibilidade para a linha celular RWPE-1 comparativamente com as linhas celulares tumorais PC3 e LNCaP, que apresentam maior radiorresistência e menor tempo de duplicação celular. Como perspetiva futura considera-se relevante quantificar o tipos de morte celular através da técnica de citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação com anexina V e com iodeto de propídeo.

Os ensaios morfológicos realizados com recurso ao método de coloração *May-Grünwald Giemsa* não revelaram evidências de morte celular para as células RWPE-1. Seria importante obter resultados morfológicos das três linhas celulares com aumento do período temporal após a exposição ao ^{223}Ra , isto é, avaliar a morfologia 8 dias após a irradiação e perceber se os resultados corroboram aqueles que foram obtidos pelo ensaio SRB.

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: Estudo dos efeitos em linhas celulares normais

Foi possível estabelecer o protocolo para obtenção de estruturas celulares 3D de cancro da próstata utilizando linha celular PC3. Esta linha celular é caracterizada por não expressar recetores hormonais. Desta forma seria importante realizar o mesmo ensaio recorrendo à utilização da linha celular LNCaP, sendo que esta expressa recetores hormonais. Para além disso, e tendo em conta a necessidade de estudar a influência do ambiente celular na resposta à radiação, a realização de culturas em 3D mistas, ou seja, com mais do que um tipo de células (tumerais e normais), poderia fornecer uma maior informação.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Aaron, L., Franco, O. E., & Hayward, S. W. (2016). Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urologic Clinics of North America*, 43(3), 279–288.
- Abrantes, A. (2013). Hipoxia Tumoral-Metabonómica e Imagem Estudo Experimental. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra.
- Adjakly, M., Ngollo, M., Dagdemir, A., Judes, G., Pajon, A., Karsli-Ceppioglu, S., ... Bernard-Gallon, D. (2015). Prostate cancer: The main risk and protective factors – Epigenetic modifications. *Annales d'Endocrinologie*, 76(1), 25–41.
- Alves, G. G., Kinoshita, A., Oliveira, H. F. de, Guimarães, F. S., Amaral, L. L., & Baffa, O. (2015). Accuracy of dose planning for prostate radiotherapy in the presence of metallic implants evaluated by electron spin resonance dosimetry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(7), 644–649.
- American Cancer Society (2016). What is Prostate Cancer? Copyright *American Cancer Society*.
- American Cancer Society (2016). Prostate Cancer Risk Factors? Copyright *American Cancer Society*.
- Amorim, V. M. S. L., Barros, M. B. de A., César, C. L. G., Goldbaum, M., Carandina, L., & Alves, M. C. G. P. (2011). Fatores associados à realização dos exames de rastreamento para o câncer de próstata: um estudo de base populacional. *Cadernos de Saúde Pública*, 27(2), 347–356.
- Andreoiu, M., & Cheng, L. (2010). Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications. *Human Pathology*, 41(6), 781–793.
- Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., & Noel, G. (2015). Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough *in Vivo*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 5517–5527.
- Araújo, D. N., Dantas, D. S. & Railda, R.S.T.R.N. (2012). Efeitos do exercício físico em mulheres com câncer de mama submetidas à radioterapia: uma revisão sistemática. *Arquivos Catarinenses de Medicina*, 41(1), 78-82.

Baba A.I., & Câtoi, C. (2007). *Comparative oncology. The Publishing House of the Romanian Academy*, Capítulo 3, Tumor Cell Morphology.

Bacelar Júnior, A. J., Menezes, C.S., Barbosa, C.A., Freitas, G.B.S., Silva, G.C., Vaz, P.S., ... Oliveira, T.M. (2015). Câncer de Próstata: Métodos de diagnóstico, prevenção e tratamento. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, 10(3), 40-46.

Bahl, A. (2013). Metastatic castration-resistant prostate cancer. Part 1: the challenges of the disease and its treatment. *European Journal of Oncology Nursing*, 17(1), S1–S6.

Bashir, M. N. (2015). Epidemiology of Prostate Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(13), 5137-5141.

Bastos, J., Botelho, F., Pina, F. & Lunet, N. (2011). Trends in prostate cancer mortality in Portugal (1980-2006). *Acta Médica Portuguesa*. 24, 499-504.

Bello, D., Webber, M. M., Kleinman, H. K., Wartinger, D. D. & Rhim, J. S. (1997). Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. *Carcinogenesis*, 18(6), 1215–1223.

Bishr, M., & Saad, F. (2013). Overview of the latest treatments for castration-resistant prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 10(9), 522–528.

Bosch, J. L. H. R., Tilling, K., Bohnen, A. M., Bangma, C. H., & Donovan, J. L. (2007). Establishing normal reference ranges for prostate volume change with age in the population-based Krimpen-study: Prediction of future prostate volume in individual men. *The Prostate*, 67(16), 1816–1824.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 0 (0), 1-31.

Breslin, S., & O’Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 18(5-6), 240–249.

- Center, M. M., Jemal, A., Lortet-Tieulent, J., Ward, E., Ferlay, J., Brawley, O., & Bray, F. (2012). International Variation in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates. *European Urology*, 61(6), 1079–1092.
- Cheetham, P. J., & Petrylak, D. P. (2012). Alpha particles as radiopharmaceuticals in the treatment of bone metastases: mechanism of action of radium-223 chloride (Alpharadin) and radiation protection. *Oncology Journal*, 26(4), 330-337, 341.
- Cheetham, P. J., & Petrylak, D. P. (2013). Tubulin-Targeted Agents Including Docetaxel and Cabazitaxel. *The Cancer Journal*, 19(1), 59–65.
- Cheng, L., Montironi, R., Bostwick, D. G., Lopez-Beltran, A., & Berney, D. M. (2011). Staging of prostate cancer. *Histopathology*, 60(1), 87–117.
- Coleman, R. (2016). Treatment of Metastatic Bone Disease and the Emerging Role of Radium-223. *Seminars in Nuclear Medicine*, 46(2), 99–104.
- Dall’Era, M. A., Cooperberg, M. R., Chan, J. M., Davies, B. J., Albertsen, P. C., Klotz, L. H., ... Carroll, P. R. (2008). Active surveillance for early-stage prostate cancer. *Cancer*, 112(8), 1650–1659.
- DeFode, B. P., Carson, C. C., & Kennelly, M. J. (2011) Postprostatectomy Erectile Dysfunction: The Role of Penile Rehabilitation. *Reviews in Urology*, 13(1): 6–13.
- Demanis, D. J., Martinez, A. A., Ghilezan, M., Hill, D. R., Schour, L., Brandt, D., & Gustafson, G. (2011). High-Dose-Rate Monotherapy: Safe and Effective Brachytherapy for Patients With Localized Prostate Cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics*, 81(5), 1286–1292.
- Du, Y., Carrio, I., De Vincentis, G., Fanti, S., Ilhan, H., Mommsen, C., ... Lewington, V. (2017). Practical recommendations for radium-223 treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 44(10), 1671–1678.
- Dunn, M. W., & Kazer, M. W. (2011). Prostate cancer overview. *Seminars in Oncology Nursing*, 27(4), 241–250.

- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- European Medicines Agency. (2013). Annex I Summary of Product Characteristics. Xofigo, pp.1-33.
- Florimonte, L., Dellavedova, L., & Maffioli, L. S. (2016). Radium-223 dichloride in clinical practice: a review. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 43(10), 1896–1909.
- Food and Drug Administration. (2013). Highlights of Prescribing Information. Xofigo (radium Ra 223 dichloride) Injection.
- Fowke, J. H., Signorello, L. B., Chang, S. S., Matthews, C. E., Buchowski, M. S., Cookson, M. S., ... Blot, W. J. (2006). Effects of obesity and height on prostate-specific antigen (PSA) and percentage of free PSA levels among African-American and Caucasian men. *Cancer*, 107(10), 2361–2367.
- Franken, N., A, P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319.
- Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., & Samali, A. (2010). Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *International Journal of Cell Biology*, 2010, 1–23.
- Graff, J. N., & Chamberlain, E. D. (2014). Sipuleucel-T in the treatment of prostate cancer: an evidence-based review of its place in therapy. *Core Evidence*, 1.
- Greene, K. L., Albertsen, P. C., Babaian, R. J., Carter, H. B., Gann, P. H., Han, M., ... Carroll, P. (2009). Prostate Specific Antigen Best Practice Statement: 2009 Update. *The Journal of Urology*, 189(1), S2–S11.
- Haisler, W. L., Timm, D. M., Gage, J. A., Tseng, H., Killian, T. C., & Souza, G. R. (2013). Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nature Protocols*, 8(10), 1940–1949.

- Hammerich, K. H., Ayala, G. E., & Wheeler T.M. (2009). Anatomy of the prostate gland and surgical pathology of prostate cancer. *Cambridge University Press*, pp.1-14.
- Handy, C. E., & Antonarakis, E. S. (2018). Sipuleucel-T for the treatment of prostate cancer: novel insights and future directions. *Future Oncology*, 14(10), 907–917.
- Heidenreich, A., Bastian, P. J., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., van der Kwast, T., ... Mottet, N. (2013). EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Advanced, Relapsing, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *European Urology*, 65(2), 467–479.
- Heidenreich, A., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., Mason, M., Matveev, V., ... Zattoni, F. (2011). EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Treatment of Clinically Localised Disease. *European Urology*, 59(1), 61–71.
- Heinlein, C. A., & Chang, C. (2004). Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Endocrine Reviews*, 25(2), 276–308.
- Helsen, C., Van den Broeck, T., Voet, A., Prekovic, S., Van Poppel, H., Joniau, S., & Claessens, F. (2014). Androgen receptor antagonists for prostate cancer therapy. *Endocrine Related Cancer*, 21(4), T105–T118.
- Hogle, W. (2009). Prostate cancer screening, risk, prevention and prognosis. *Prostate Cancer*, pp.19-33.
- Horoszewicz, J. S., Leong S. S., Chu T. M., Wajzman Z. L, Friedman, M., Papsidero, L., ... Sandberg, A. A. (1980). The LNCaP cell line—a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Progress in Clinical and Biological Research*, 37, 115–132.
- Hoskin, P. J., Rojas, A. M., Bownes, P. J., Lowe, G. J., Ostler, P. J., & Bryant, L. (2012). Randomised trial of external beam radiotherapy alone or combined with high-dose-rate brachytherapy boost for localised prostate cancer. *Radiotherapy and Oncology*, 103(2), 217–222.
- Huggins, C., Hodges, C. V. (1941). Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *American Association for Cancer Research*, 1:293–297.

- Júnior, V. J. (2017). Associação da radioterapia externa com braquiterapia de alta taxa de dose no tratamento de câncer de próstata. Tese de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de Campinas.
- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., Jones, L.W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative Urology*, 17(1), 16-23.
- Kassis, A. I. (2008). Therapeutic Radionuclides: Biophysical and Radiobiologic Principles. *Seminars in Nuclear Medicine*, 38(5), 358–366.
- Klotz, L. (2013). Active Surveillance for Prostate Cancer: Overview and Update. *Current Treatment Options in Oncology*, 14(1), 97–108.
- Knudsen, K. E., & Penning, T. M. (2010). Partners in crime: deregulation of AR activity and androgen synthesis in prostate cancer. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(5), 315–324.
- Lacher, D. A., & Hughes, J. P. (2015). Total, free, and complexed prostate-specific antigen levels among US men, 2007–2010. *Clinica Chimica Acta*, 448, 220–227.
- Liepe, K., & Shinto, A. (2016). From palliative therapy to prolongation of survival: ²²³RaCl₂ in the treatment of bone metastases. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 8(4), 294–304.
- Lee, J., Cuddihy, M. J., & Kotov, N. A. (2008). Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14(1), 61–86.
- Leze, E. M. J. (2011). A leptina regula a proliferação celular e a apoptose na próstata humana. Tese de Mestrado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- Lewis, R., & Hornberger, B. (2017). Beyond the PSA test. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 30(8), 51–54.

- Li, L., Wang, L., Feng, Z., Hu, Z., Wang, G., Yuan, X., ... Hu, D. (2013). Prostate cancer magnetic resonance imaging (MRI): multidisciplinary standpoint. *Quantitative Imaging in Medicine Surgery*, 3(2):100-12.
- Liu, J., Prager–van der Smissen, W. J. C., Schmidt, M. K., Collée, J. M., Cornelissen, S., Lamping, R., ... Hollestelle, A. (2016). Recurrent HOXB13 mutations in the Dutch population do not associate with increased breast cancer risk. *Scientific Reports*, 6(1), 1-6.
- Loeb, S., Carter, H. B., Catalona, W. J., Moul, J. W., & Schroder, F. H. (2012). Baseline Prostate-Specific Antigen Testing at a Young Age. *European Urology*, 61(1), 1–7.
- Lonergan, P. E., Tindall, D. J. (2011). Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of Carcinogenesis*, 10, 20.
- Magalhães, R. P. F. (2014). Tratamento do Carcinoma da Próstata Resistente à Castração. Dissertação de Mestrado. Universidade do Porto.
- Marangoni, K. (2011). Desenvolvimento e caracterização de aptâmeros ligantes específicos ao gene PCA3 e implicações na modulação da expressão gênica de células tumorais transfectadas. Universidade Federal de Uberlândia.
- Marshall, L. M., Cason Z., Cabaniss, D. E., Lemos, L. B., & Benghuzzi, H. A. (1997). Reactive cell change in cervicovaginal smears. *Biomedical Sciences Instrumentation*, 33, 298-304.
- Marques, I. A. (2016). Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático. Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra.
- Marques, I.A., Neves, A. R., Abrantes, A.M., Pires, A.S., Tavares-da-Silva, E., Figueiredo, A., & Botelho, M.F. (2018). Targeted alpha therapy using Radium-223: From physics to biological effects. *Cancer Treatment Reviews*, 68, 47–54.
- McKay, R. R., Jacobus, S., Fiorillo, M., Ledet, E. M., Cotogna, P. M., Steinberger, A. E., ... Taplin, M.-E. (2017). Radium-223 Use in Clinical Practice and Variables Associated With Completion of Therapy. *Clinical Genitourinary Cancer*, 15(2), e289–e298.

McNeal, J. E. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate*, 2(1), 35–49.

Mendes, F. J. (2016). Caracterização celular e molecular dos efeitos da radiação em neoplasias: Estudo experimental em linfoma e carcinoma do pulmão de pequenas células. Coimbra, Portugal: Escola Superior de Tecnologia da saúde de Coimbra.

Mohler, J., Babaian, R. J., Bahnson, R. R., Boston, B., D'Amico, A., Eastham, J.A., ... Walsh, P. C. (2007). Prostate cancer. Clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 5(7), 650-83.

Mohler J., Bahnson, R. R., Boston, B., Busby, J.E., D'Amico, A., Eastham, J.A., ... Walsh, P. C. (2010). NCCN clinical practice guidelines in oncology: prostate cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 8(2), 162-200.

Montironi, R., Hammond, E. H., Lin, D. W., Gore, J. L., Srigley, J. R., Samaratunga, H., ... Amin, M. B. (2014). Consensus statement with recommendations on active surveillance inclusion criteria and definition of progression in men with localized prostate cancer: the critical role of the pathologist. *Virchows Archiv*, 465(6), 623–628.

Morrison, B. F., Aiken, W. D., & Reid, M. E. (2011). Impact of the National Health Fund policy on hormone treatment for prostate cancer in Jamaica. *Revista Panamericana de Salud Publica*, 29(6), 404-8.

Mottet, N., Bastian, P. J., Bellmunt, J., van den Bergh, R. C. N., Bolla, M., van Casteren, N.J., ... Wiegel, T. (2014). Guidelines on Prostate Cancer. *European Urology*, 65(1), 124-37

Muruve, N. A. (2017). Prostate Anatomy. Copyright Medscape.

Nilsson, S. (2016). Radium-223 Therapy of Bone Metastases in Prostate Cancer. *Seminars in Nuclear Medicine*, 46(6), 544–556.

Neves, A. R. (2016). Terapia fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: uma abordagem no retinoblastoma? Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra

- Onuchic, A. C., & Chammas, R. (2010). Câncer e o microambiente tumoral. *Revista De Medicina*, 89(1), 21-31.
- Paller, C. J., & Antonarakis, E. S. (2011). Cabazitaxel: a novel second-line treatment for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, 117-124.
- Parker, C., Heidenreich, A., Nilsson, S., & Shore, N. (2018). Current approaches to incorporation of radium-223 in clinical practice. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 21(1), 37–47.
- Parker, C., Nilsson, S., Heinrich, D., Helle, S. I., O’Sullivan, J. M., Fosså, S. D., ... Sartor, O. (2013). Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 369(3), 213–223.
- Phillips, J. M., Catarinicchia, S., Krughoff, K., & Barqawi, A. B. (2014). Cryotherapy in prostate cancer. *Journal of Clinical Urology*, 7(5), 308–317.
- Placer, J., & Morote, J. (2011). Usefulness of prostatic specific antigen (PSA) for diagnosis and staging of patients with prostate cancer. *Archivos Españoles de Urología*, 64 (8), 659-680.
- Prohaska, J., & Bermudez, R. (2018). Cryotherapy. Copyright StatPearls Publishing LLC.
- Powell, I. J., Vigneau, F. D., Bock, C. H., Ruterbusch, J., & Heilbrun, L. K. (2014). Reducing Prostate Cancer Racial Disparity: Evidence for Aggressive Early Prostate Cancer PSA Testing of African American Men. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 23(8), 1505–1511.
- Pritchard, C. C., Mateo, J., Walsh, M. F., De Sarkar, N., Abida, W., Beltran, H., ... Nelson, P. S. (2016). Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(5), 443–453.
- Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., & Solomon, F. D. P. (2014). 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology*, 230(1), 16–26.
- Rodrigues, S., et al. (2014). Carcinoma da próstata metastático resistente à castração - novas abordagens terapêuticas. *Acta Urológica Portuguesa*, 31(1-2), 36-40.

- Rodriguez-Vida, A., Chowdhury, S., Sternberg, C., Rudman, S., & Galazi, M. (2015). Enzalutamide for the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 3325-3339.
- Ryan, C. J., Smith, M. R., de Bono, J. S., Molina, A., Logothetis, C. J., de Souza, P., ... Rathkopf, D. E. (2013). Abiraterone in Metastatic Prostate Cancer without Previous Chemotherapy. *New England Journal of Medicine*, 368(2), 138–148.
- Santos, A. F., Huang, H., & Tindall, D. J. (2004). The androgen receptor: a potential target for therapy of prostate cancer. *Steroids*, 69(2), 79–85.
- Sartor, O., Coleman, R., Nilsson, S., Heinrich, D., Helle, S. I., O’Sullivan, J. M., ... Parker, C. (2014). Effect of radium-223 dichloride on symptomatic skeletal events in patients with castration-resistant prostate cancer and bone metastases: results from a phase 3, double-blind, randomised trial. *The Lancet Oncology*, 15(7), 738–746.
- Shah, R. B., & Zhou, M. (2016). Recent advances in prostate cancer pathology: Gleason grading and beyond. *Pathology International*, 66(5), 260–272.
- Shore, N. D. (2015). Radium-223 Dichloride for Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer: The Urologist’s Perspective. *Urology*, 85(4), 717–724.
- Shimizu, H., Ross, R., Bernstein, L., Yatani, R., Henderson, B., & Mack, T. (1991). Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *British Journal of Cancer*, 63(6), 963–966.
- Shirley, M., & McCormack, P. L. (2014). Radium-223 Dichloride: A Review of Its Use in Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer with Symptomatic Bone Metastases. *Drugs*, 74(5), 579–586.
- Soylu, F. N., Eggener, S., & Oto, A. (2012). Local staging of prostate cancer with MRI. *Diagnostic and Interventional Radiology*, 18(4): 365-73.

- Souza, G. R., Molina, J. R., Raphael, R. M., Ozawa, M. G., Stark, D. J., Levin, C. S., ... Pasqualini, R. (2010). Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nature Nanotechnology*, 5(4), 291–296.
- Spickett, Ingrid & Robertson, John. (2010). Prostate cancer: the ongoing challenge. *Primary Health Care*, 20, 16-21.
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, 111, A3.B.1–A3.B.3.
- Sturge, J., Caley, M. P., & Waxman, J. (2011). Bone metastasis in prostate cancer: emerging therapeutic strategies. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(6), 357–368.
- Sverrisson, E., Jones, J.S., & Pow-Sang, J.M. (2013). Cryosurgery for prostate cancer: a comprehensive review. *Archivos Españoles de Urología*, 66(6), 546-56.
- Sweeney, C. J., Chen, Y.-H., Carducci, M., Liu, G., Jarrard, D. F., Eisenberger, M., ... DiPaola, R. S. (2015). Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 373(8), 737–746.
- Tabesh, A., Teverovskiy, M., Pang, H.-Y., Kumar, V. P., Verbel, D., Kotsianti, A., & Saidi, O. (2007). Multifeature Prostate Cancer Diagnosis and Gleason Grading of Histological Images. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 26(10), 1366–1378.
- Tai, S., Sun, Y., Squires, J. M., Zhang, H., Oh, W. K., Liang, C.-Z., & Huang, J. (2011). PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *The Prostate*, 71(15), 1668–1679.
- Tait, S. W. G., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), 621–632.
- Teles, A. C. V. S. C. (2015). “Estado de arte” no tratamento do carcinoma da próstata. Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra.

- Tharmalingam, S., Sreetharan, S., Kulesza, A. V., Boreham, D. R., & Tai, T. C. (2017). Low-Dose Ionizing Radiation Exposure, Oxidative Stress and Epigenetic Programming of Health and Disease. *Radiation Research*, 188(4.2), 525–538.
- Tseng, H., Gage, J. A., Raphael, R. M., Moore, R. H., Killian, T. C., Grande-Allen, K. J., & Souza, G. R. (2013). Assembly of a Three-Dimensional Multitype Bronchiole Coculture Model Using Magnetic Levitation. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 19(9), 665–675.
- Vega-Avila, E. & Pugsley, M. K. (2011). An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 54, 10-4.
- Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112–1116.
- Voigt, W. (2005). Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity. *Methods in molecular medicine*, 110, 39–45.
- Weisenthal, L. M., Marsden, J. A., Dill, P. L., Macaluso, C. K., Cindy, K. M. (1983). A Novel Dye Exclusion Method for Testing in Vitro Chemosensitivity of Human Tumors. *Cancer Research*, 43(2), 749-757.
- Welsh, M., Moffat, L., Belling, K., de França, L. R., Segatelli, T. M., Saunders, P. T. K., ... Smith, L. B. (2011). Androgen receptor signalling in peritubular myoid cells is essential for normal differentiation and function of adult Leydig cells. *International Journal of Andrology*, 35(1), 25–40.
- Zeigler-Johnson, C. M., Spangler, E., Jalloh, M., Gueye, S. M., Rennert, H., & Rebbeck, T. R. (2008). Genetic susceptibility to prostate cancer in men of African descent: implications for global disparities in incidence and outcomes. *The Canadian Journal of Urology™*, 15(1), 3872–3882.
- Zelefsky, M. J., Eastham, J. A., Cronin, A. M., Fuks, Z., Zhang, Z., Yamada, Y., ... Scardino, P. T. (2010). Metastasis After Radical Prostatectomy or External Beam Radiotherapy for Patients With Clinically Localized Prostate Cancer: A Comparison of Clinical Cohorts Adjusted for Case Mix. *Journal of Clinical Oncology*, 28(9), 1508–1513.

