

Inês Alexandra Figueira Marques

Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático

Estudo dos mecanismos de atuação

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

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.

Capa

Células tumorais de carcinoma da próstata, LNCaP, derivada de metástases linfáticas. Imagem obtida por microscopia ótica. Ampliação total 100x.

*“Life is not easy for any of us. But what of that?
We must have perseverance and, above all, confidence in ourselves.
We must believe we are gifted for something and that this thing, at whatever cost,
must be attained.”*

Marie Curie

Agradecimentos

O culminar desta etapa não seria possível apenas com o esforço individual, mas sim graças a toda uma equipa multidisciplinar, da qual é para mim uma grande honra fazer parte. Sem o vosso empenho, esforço e colaboração não seria possível alcançar o fim desta etapa. Apesar de estas linhas não serem suficientes para descrever toda a minha gratidão, não poderia deixar de prestar aqui os mais sinceros agradecimentos a todas as pessoas que das mais variadas formas me inspiraram, ensinaram e apoiaram, contribuindo de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e diretora da Unidade de Biofísica da mesma instituição, por me ter acolhido na sua equipa e demonstrado a importância do rigor e do cuidado para o desenvolvimento de um trabalho. Agradeço todo o apoio, disponibilidade, partilha de conhecimentos e experiência científica e, ainda, por todas as críticas e conselhos na revisão do manuscrito.

À Professora Doutora Ana Margarida Abrantes, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, orientadora desta dissertação, obrigado por ter aceite o desafio de me orientar. Sem dúvida a minha fonte de inspiração para ingressar na área da radiobiologia. Agradeço também por todas as críticas construtivas e ajuda na revisão deste manuscrito. Pela partilha de conhecimento e experiência, pela prática com que enfrenta as adversidades, pela paciência, empenho e incentivo demonstrado ao longo destes anos. Um muito obrigado pela confiança em mim depositada. Sobretudo por ser muito mais que uma chefe, um bem-haja por todo o apoio e amizade.

Ao Professor João Nuno Moreira, Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, orientador interno desta dissertação, pelos seus ensinamentos e disponibilidade.

À Mestre Ana Salomé Pires, por todo o apoio incondicional, por toda a disponibilidade mesmo quando o tempo era escasso, pela dedicação, pelo entusiasmo e pela contribuição essencial neste trabalho. Por ser uma pessoa incansável, por todo o incentivo perante os fracassos e pela partilha de conhecimentos e experiência, um muito obrigado. Certamente serão ensinamentos que guardarei para sempre. Agradeço também a ajuda na revisão deste manuscrito, mesmo quando isso implicou um acréscimo de trabalho. Acima de tudo, por toda a simpatia, espírito positivo e amizade um bem-haja.

Gostaria também de agradecer ao Serviço de Medicina Nuclear do Centro Hospitalar e Universitário da Universidade de Coimbra pela doação dos radiofármacos ^{223}Ra e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP.

Um especial agradecimento ao Núcleo Regional do Centro da Liga Portuguesa Contra o Cancro e ao Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia pela atribuição da bolsa individual NRC LPCC/ CIMAGO (2015) no âmbito do projeto “*Rádio-223 no carcinoma da próstata metastático. Estudo dos mecanismos de atuação*”.

À Dr^a Gracinda Costa, diretora do Serviço de Medicina Nuclear do Centro Hospitalar e Universitário da Universidade de Coimbra, por todo o apoio, ajuda, disponibilidade e entusiasmo. A partilha de ideias e conhecimentos foi sem dúvida uma mais valia para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Mestre Edgar Tavares da Silva, médico do serviço de urologia do Centro Hospitalar e Universitário da Universidade de Coimbra, por todos os ensinamentos, disponibilidade, apoio e simpatia demonstrado ao longo dos anos. A ele devo o entusiasmo e inspiração pelo estudo do carcinoma da próstata. Obrigado por toda a transmissão de conhecimentos e pela ajuda crítica na revisão deste manuscrito.

Ao Professor Doutor Francisco Caramelo, Professor Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, obrigado pela disponibilidade, pela simpatia, e pela preciosa ajuda na análise estatística e ajustes matemáticos dos resultados deste trabalho.

À Doutora Mafalda Laranjo, também um exemplo de dedicação e empenho, pela disponibilidade constante, pela partilha de conhecimentos tão pertinentes e valiosos. Todos os ensinamentos transmitidos serão sempre uma mais valia. Obrigado por todo o apoio e simpatia.

Ao Mestre Ricardo Teixeira por todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos. Pela sua prontidão sempre em ajudar, pela simpatia, amizade e dia-a-dia partilhados. Não posso também deixar de agradecer toda a paciência e ajuda no tratamento da análise estatística.

À Mestre Ana Catarina Mamede por ter sido a primeira pessoa a acolher-me nesta unidade, ainda na licenciatura, e por toda a transmissão dos ensinamentos base. Obrigado por toda a disponibilidade mesmo a longa distância.

Ao Nuno, Gonçalo e Beatriz, por partilharem o gabinete e tornarem o meu dia-a-dia muito mais leve e animado. Por todo o incentivo, ajuda, preocupação, companheirismo e também por todos os momentos de descontração. Um obrigado sobretudo pela amizade.

Um obrigado também à Ritinha, ao Rafael e ao João por partilharem comigo o dia-a-dia e o tornarem muito mais divertido e descontraído. Ao Pedro, Nuno Tiago, Andreia, Juliana e Célia um muito obrigado por toda a ajuda na realização de alguns destas técnicas.

Aos Doutores Fernando Mendes, Ana Brito e Maria João e ao Mestre Rui Oliveira por toda a simpatia, disponibilidade e partilha de conhecimento.

À Sra. Cláudia Caridade, secretária da Unidade de Biofísica, pela sua disponibilidade, simpatia e apoio demonstrado.

À Inês e à Liliana, colegas de casa, por terem tornado estes anos muito mais fáceis. Obrigado por todo o apoio, companheirismo e sobretudo pela amizade.

À minha grande e eterna amiga Ana Luísa, que me viu crescer e apesar da distância, me viu tornar na pessoa que sou hoje, um muito obrigado.

Não posso claro deixar de agradecer àqueles que me acompanham desde a licenciatura, que me ajudaram ao longo dos anos e que tornaram certos momentos inesquecíveis. Ao grupo BB um muito obrigado pela amizade. À Rute, para quem explicações são desnecessárias, obrigado por tudo! À Sofia, por ser a minha eterna companheira ao longo de todo o percurso e por poder partilhar contigo todas as preocupações, mas também todas as felicidades.

Às pessoas que o mestrado se encarregou em colocar no meu caminho, Joana e Inês, um muito obrigado por partilharem estes últimos anos comigo.

Ao Tiago, por toda a paciência, por todo o amor, carinho e compreensão. Sobretudo por todas as palavras de incentivo e de força nos momentos mais difíceis. Não tenho como agradecer todo o apoio incondicional.

Um agradecimento especial aos meus pais, Rosalina e Carlos, por me terem proporcionado todo este percurso. Sem vocês nada seria possível. Obrigado por todos os valores que me transmitiram e que ajudaram a tornar-me na pessoa que sou hoje. Pelo apoio incondicional em todas as decisões e pela ajuda na escolha do meu caminho. Por me ouvirem e apostarem sempre mim. Este é o meu sonho, mas também é o vosso! Um eterno obrigado por tudo.

À minha avó Glória por ser uma segunda mãe e por partilhar comigo a felicidade de todo o sucesso alcançado. Obrigado por tudo e por ajudares a tornar-me na pessoa que sou hoje. Palavras nunca serão suficientes para agradecer.

À minha família, que mesmo à distância estiveram sempre lá. Porque a família é sempre a base de tudo, um muito bem-haja.

Por último, mas não menos importantes, àqueles que fisicamente já não se encontram comigo, mas para sempre permanecerão na memória. Aos meus avós João e António, a quem a idade não permitiu que acompanhassem todo o meu percurso. E ao meu padrinho José, que partiste cedo demais, mas que tenho a certeza que ficarias muito feliz por ver terminada esta etapa que acompanhavas de tão perto.

A todos vós um bem-haja.

Resumo

O carcinoma da próstata (CaP) é a neoplasia sólida maligna mais frequente no género masculino e a segunda causa de morte por cancro. O maior desafio em termos terapêuticos está associado ao cancro da próstata metastático resistente à castração (CPMRC). Não existem tratamentos curativos para este estado avançado da doença, no entanto, entre as armas terapêuticas disponíveis no mercado destaca-se o uso do radiofármaco rádio-223 (^{223}Ra). Segundo alguns estudos já realizados, este apresenta-se como um mímico do cálcio e apresenta redução da dor e aumento do tempo de sobrevivência do doente.

Perante estes factos e a relativa ausência de informação das vias moleculares responsáveis pelos efeitos do ^{223}Ra nas células das metástases de carcinoma da próstata, este projeto tem como objetivo principal estudar os efeitos do ^{223}Ra em linhas celulares de cancro da próstata e estudar o seu modo de ação nas células tumorais. Também o estudo de uma possível aplicabilidade do ^{223}Ra a outras áreas foi tido em conta, nomeadamente para o osteossarcoma (OS).

Para tal, foram realizados estudos com o objetivo de avaliar o perfil cinético e o modo de ação de dois radiofármacos, o ^{223}Ra e o $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$, em três linhas celulares distintas, duas de carcinoma da próstata (LNCaP e PC3) e uma de osteossarcoma (MNNG/HOS). Os estudos foram iniciados pela determinação do fator de sobrevivência para as linhas celulares LNCaP e PC3, com irradiação das células com doses até 10 mGy com o radiofármaco ^{223}Ra . Posteriormente realizaram-se estudos de captação, internalização e retenção dos radiofármacos ^{223}Ra e $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ nas linhas celulares de CaP e OS, de modo a avaliar a cinética dos radiofármacos. Também o uso de um bloqueador dos canais de cálcio foi utilizado para avaliar diferenças de captação com ou sem a sua presença.

Verificou-se que as células LNCaP apresentam uma maior radiosensibilidade ao ^{223}Ra do que as células PC3. O radiofármaco ^{223}Ra demonstrou ser captado, internalizado (inclusive a nível do núcleo) e retido por todas as linhas celulares, salientado valores superiores apresentadas pelas células PC3. As células LNCaP demonstraram um perfil cinético semelhante às células PC3. Também as células MNNG/HOS, de osteossarcoma, apresentam uma cinética semelhante às linhas celulares de carcinoma da próstata, mas com percentagens inferiores. O uso do bloqueador verapamil demonstrou que, na sua presença, há uma diminuição significativa da captação do ^{223}Ra pelas linhas celulares em estudo, postulando que o mecanismo de atuação do radiofármaco ^{223}Ra é dependente dos canais de cálcio.

Desta forma, os resultados apresentados e obtidos ao longo desta dissertação, apontam o uso do radiofármaco ^{223}Ra como uma mais-valia no tratamento de doentes de carcinoma da próstata metastático resistente à castração e como uma possível aplicação terapêutica em níveis mais precoces do estadio desta patologia, podendo ainda possivelmente ser aplicável como terapêutica noutros tumores malignos, como é o caso do osteossarcoma.

Abstract

Prostate cancer (PCa) is the most common malignant solid tumor in males and the second leading cause of death by cancer. The biggest challenge, in therapeutic terms, is associated with metastatic castration-resistant prostate cancer. No curative treatments are available for this advanced stage of the disease, however, the use of the radiopharmaceutical Radium-223 (^{223}Ra) is among the therapeutic weapons available on the market. According to previous studies, ^{223}Ra acts as a mimic of calcium and it demonstrated to reduce pain and increase patient survival.

Given these facts and the relative lack of knowledge about molecular pathways responsible for the effects of ^{223}Ra in the cells of metastatic prostate cancer, this project aims to study the effects of ^{223}Ra in prostate cancer cell lines and to study its mechanisms of action in tumor cells. The study of a possible applicability of the ^{223}Ra to other areas was also taken into account, particularly to osteosarcoma (OS).

For this, *in vitro* studies were performed to evaluate the kinetic profile of two radiopharmaceuticals, ^{223}Ra and $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$, in three cell lines, two of prostate cancer (LNCaP e PC3) and one of osteosarcoma (MNNG/HOS). Studies were initiated by determining the effect of ^{223}Ra on LNCaP and PC3 cells survival. For that, cells were irradiated with doses up to 10 mGy. Subsequently, uptake, internalization and retention studies of ^{223}Ra and $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ in PCa and OS cell lines were performed, in order to access the radiopharmaceuticals kinetics. It was also used a calcium channel blocker to assess uptake differences with or without its presence.

Results show that LNCaP cells show an increased radiosensitivity for ^{223}Ra compared to PC3 cell line. ^{223}Ra influx was observed, as well as its internalization and accumulation in cytosol but also in the nucleus, in all cell lines. Higher value in all studies were showed for PC3 cell line. LNCaP cells showed a kinetics profile similar to that of PC3 cells. MNNG/HOS cells (osteosarcoma) also showed a similar kinetics profile, but with lower percentages in all studies. The use of verapamil blocker showed that, in its presence, there is a significant decrease in ^{223}Ra uptake by all cell lines under study, allowing us to postulate that the radiopharmaceutical ^{223}Ra mechanism of action is dependent on calcium channels.

Thus, the results achieved and presented in this manuscript, point out the use of the ^{223}Ra radiopharmaceutical as an added value in the treatment of patients with metastatic

castration-resistant prostate cancer and as a possible therapeutic application in the earliest stages of this pathology. Its therapeutic application to other malignant tumors, such as osteosarcoma, should also be considered.

Índice

Introdução	- 1 -
1.1 Cancro da Próstata	- 3 -
1.1.1 A Próstata	- 3 -
1.1.2 Epidemiologia	- 5 -
1.1.3 Diagnóstico e estadiamento	- 8 -
1.1.4 Terapêutica	- 11 -
1.2 Carcinoma da Próstata Avançado	- 14 -
1.2.1 O papel dos Recetores de Androgénios	- 14 -
1.2.2 A resistência à Castração	- 17 -
1.3 Carcinoma da Próstata Metastático Resistente à Castração	- 19 -
1.3.1 Terapêutica	- 24 -
1.4 ²²³ Ra no tratamento do CPMRC	- 27 -
Objetivos	- 31 -
Materiais e Métodos	- 35 -
3.1 Cultura celular	- 37 -
3.2 Ensaio Clonogénico	- 38 -
3.3 Estudo de cinética dos radiotraçadores	- 41 -
3.3.1 Estudos de Captação	- 42 -
3.3.2 Estudos de captação na presença de verapamil	- 43 -
3.3.3 Estudos de Internalização	- 44 -
3.3.4 Estudos de Retenção	- 45 -
3.4 Viabilidade Celular	- 46 -
3.5 Análise estatística	- 47 -
Resultados	- 49 -
4.1 Avaliação da sobrevivência celular	- 51 -

4.2	Estudos de cinética dos radiotraçadores.....	- 53 -
4.2.1	Estudos de captação.....	- 53 -
4.2.2	Estudos de captação na presença de verapamil.....	- 59 -
4.2.3	Estudos de internalização	- 62 -
4.2.4	Estudos de retenção	- 65 -
	Discussão.....	- 71 -
	Conclusão e Perspetivas Futuras	- 81 -
	Bibliografia.....	- 85 -

Lista de Abreviaturas e Símbolos

¹⁵³Sm-EDTMP: Ácido etilenodiaminotetrametileno difosfórico ligado ao Samário-153

¹⁸F-FDG: Fluorodeoxyglucose marcada com flúor 18

¹⁸F-FHC: Fluorocolina marcada com flúor-18

¹⁸F-NaF: Fluoreto marcado com flúor-18

²²³Ra: Rádio-223

⁸⁹Sr: Estrôncio-89

^{99m}Tc-HMDP: Tecnécio-99m ligado a hidroximetileno difosfonato

AA: Acetato de Abiraterona

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADT: *Androgen-Deprivation Therapy*

ARN: Ácido ribonucleico

BRCA1: *Breast cancer 1, early onset*

BRCA2: *Breast cancer 2, early onset*

CaP: Carcinoma da Próstata

CaPm: CaP metastático

CPMRC: Carcinoma da Próstata Metastático Resistente à castração

CPRC: Carcinoma da próstata resistente à castração

DES: Dietilstilbestrol

DHEA: Dehidroepiandrosterona

DHT: 5a-dihidrotestosterona

DL50: Dose letal média

EMA: *European Medicines Agency*

ET: Ecografia transretal

FDA: *Food and Drug Administration*

Gy: Gray

GnRH: *Gonadotropin-Releasing Hormone*

H₂O₂: Peróxido de Hidrogénio

HBP: Hiperplasia benigna prostática

HGPIN: *High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia*

HIFU: *High-Intensity Ultrasound*

HOXB13: Homeobox gene B13

H_T: Dose equivalente

KeV: elétron-volt

LET: Linear Energy Transfer

LGPIN: *Low-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia*

LH: *Luteinizing Hormone*

LHRH: *Luteinizing hormone-releasing hormone*

MRI: *Magnetic resonance imaging*

PET: *Positron emission tomography*

PSA: *Prostate-specific antigen*

PTHrP: *Parathyroid hormone related peptide*

RA: Recetor de androgénios

RANK: Receptor activator of nuclear κ B

RANKL: Receptor activator of nuclear κ B ligand

SREs: *skeletal-related events*

Sv: Sievert

T_{1/2}: Período de semi-desintegração

TC: Tomografia Computorizada

O₂: Oxigénio

Introdução

As neoplasias malignas caracterizam-se pelo crescimento descontrolado e pela disseminação de células cancerígenas, que se deixamos evoluir em função da sua história natural pode resultar na morte do portador (Harvey Lodish *et al* , 2013). Este processo não é restrito apenas a um único conjunto de células em proliferação, mas sim a um tecido complexo composto por múltiplos tipos distintos de células que interagem entre si e com o microambiente envolvente (Abrantes, 2013). Existem diversos fatores, tanto externos como internos, que podem conduzir ao desenvolvimento desta doença, entre eles, o tabaco, as dietas pouco saudáveis, as mutações genéticas hereditárias ou as condições imunológicas do hospedeiro. Em todo o mundo, em 2012, detetaram-se 14,1 milhões de novos casos e ocorreram 8,2 milhões de mortes, considerando-se a segunda causa de morte em países de altos rendimentos (precedido pelas doenças cardiovasculares). No mesmo ano, em Portugal, registaram-se 49,2 milhares de novos casos de cancro (American Cancer Society, 2015).

I.1 Cancro da Próstata

I.1.1 A Próstata

A próstata é um órgão músculo-glandular localizado no interior da pélvis, imediatamente por baixo da bexiga e envolvente da uretra. A principal função deste órgão, como glândula acessória da reprodução, é secretar um fluido alcalino que constitui parte do ejaculado e que ajuda na mobilidade e na nutrição dos espermatozoides (Dunn e Kazer, 2011). A próstata não apresenta exatamente uma arquitetura lobular, contudo, John E. McNeal (McNeal, 1969; McNeal, 1981; McNeal, 1998) desenvolveu, durante vários anos, um modelo anatómico da próstata, dividindo-a em várias zonas, que continua a ser aceite e usado na prática clínica. Neste modelo encontram-se descritas quatro zonas anatómicas distintas, como podemos ver representado na Figura 1.

Distinguem-se três zonas glandulares, a zona periférica, a zona central e a zona de transição. A zona periférica ocupa cerca de 70% do volume da porção glandular da próstata e está associada, frequentemente, ao desenvolvimento de patologias como o carcinoma. A zona central corresponde a cerca de 25% do volume e rodeia os canais ejaculatórios. A zona de transição ocupa apenas cerca de 5% do volume desta glândula e é constituída por dois pequenos lóbulos. Para além das zonas glandulares, é também descrito por McNeal uma zona não glandular – zona fibromuscular anterior (ou estroma), que corresponde a cerca de um

terço de toda a glândula. Esta zona é composta por músculo liso e por tecido fibroso. (Dunn e Kazer, 2011; McNeal, 1969; Mcneal, 1981; McNeal, 1998; Shen e Abate-Shen, 2010; Verma e Rajesh, 2011).

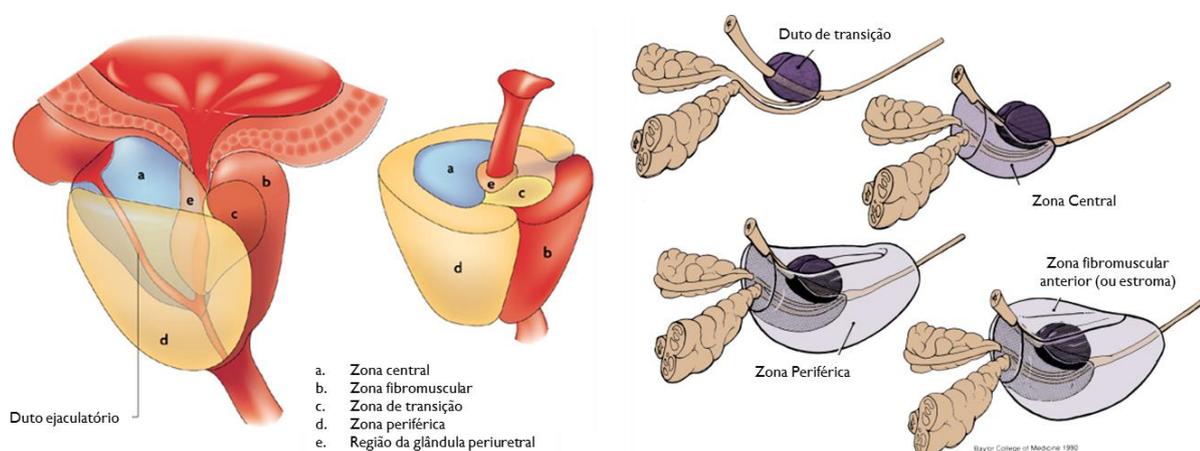


Figura 1: Representação esquemática de um plano sagital da próstata, evidenciando as diferentes zonas [Adaptado de (Marzo *et al.*, 2007) e Baylor College of Medicine 1980]

O epitélio da próstata é constituído por três grandes tipos de células, as células secretoras, as células basais e as células neuroendócrinas. As células secretoras são responsáveis pelas secreções fisiológicas, as células basais são as menos abundantes e estão posicionadas sobre a membrana basal adjacente das células secretoras. A ausência destas pode ser um marcador determinante de carcinoma da próstata (CaP). Por sua vez, as células neuroendócrinas estão dispersas por toda a glândula e acredita-se que estão envolvidas na regulação da atividade secretora da próstata e do crescimento celular (Joshua *et al.*, 2008; Shen e Abate-Shen, 2010).

A glândula prostática pode ser afetada por várias patologias que demoram muitos anos a se desenvolver e a se manifestar. Entre as mais comuns encontra-se a prostatite e a HBP. Destaca-se a hiperplasia benigna prostática (HBP), na qual se verifica um aumento do número de células epiteliais e do estroma e, conseqüentemente, um aumento do volume da próstata que, por sua vez, desencadeia sintomas no trato urinário. Esta hiperplasia surge mais frequentemente na zona de transição, estando dependente de androgénios para o seu desenvolvimento (Roehrborn, 2008; Sciarra *et al.*, 2008).

A lesão que mais frequentemente se associa ao desenvolvimento do carcinoma da próstata é a neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau (do inglês, *high-grade prostatic intraepithelial neoplasia* - HGPIN). Ambas apresentam várias semelhanças, tais como a localização preferencial na zona periférica, as transições morfológicas, as semelhanças moleculares e fenotípicas, entre outras (Cardoso, 2013). Postulou-se que HGPIN surge a partir de uma lesão de baixo grau (LGPIN - do inglês, *low-grade prostatic intraepithelial neoplasia*). Evidências mostram que a maioria das alterações na expressão dos genes envolvidos ocorre na transição do epitélio normal para o HGPIN e não na transição de HGPIN para o carcinoma. As lesões de HGPIN caracterizam-se por diferentes padrões de arquitetura que se correlacionam com o desenvolvimento de CaP. Esta evolução é a base para a proposta de um modelo de progressão do epitélio normal para o CaP apresentado na Figura 2 (Joshua *et al.*, 2008; Sciarra *et al.*, 2008; Shen e Abate-Shen, 2010).

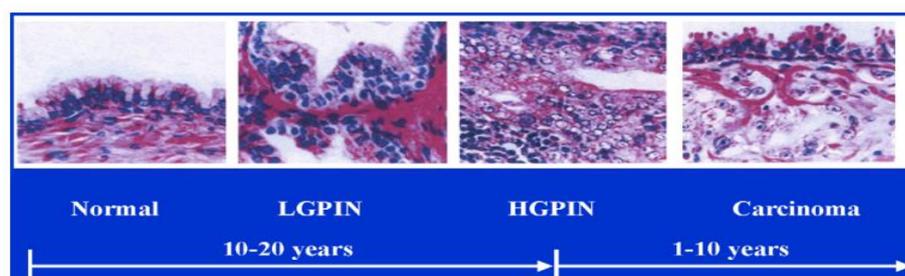


Figura 2: Representação histológica da evolução do epitélio normal até ao desenvolvimento do carcinoma da próstata, evidenciando o tempo de progressão. [Adaptado de (Sciarra *et al.*, 2008)]

Os índices de incidência de carcinoma da próstata pelas zonas anteriormente descritas são de 68% para a zona periférica, de 24% para a zona de transição, e de 8% para a zona central (Sarkar e Das, 2016). , sendo o tipo histológico mais frequente o adenocarcinoma acinar (AJCC, 2012).

1.1.2 Epidemiologia

O carcinoma da próstata é o segundo tipo de neoplasia mais frequentemente diagnosticado no homem assim como a quinta causa de morte, registando-se, no ano de 2012, 1,1 milhões de novos casos em todo o mundo (Figura 3), dos quais cerca de 70% ocorrem em países economicamente desenvolvidos. No mesmo ano registaram-se 307 milhares de mortes por esta patologia (American Cancer Society, 2015).

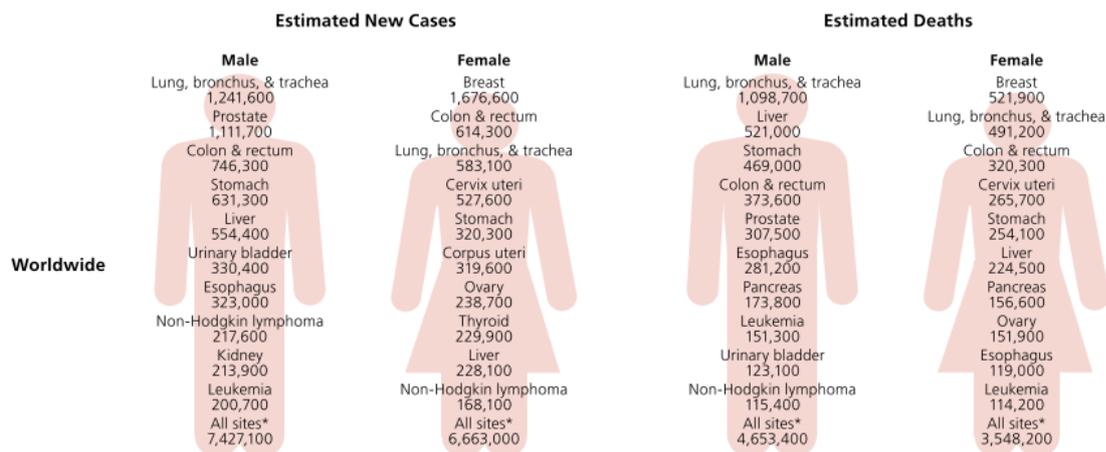


Figura 3: Estimativa do número de novos casos e de mortes, em todo o mundo, por tipo de cancro e por género. [Adaptado de (American Cancer Society. *Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition*)]

A incidência de carcinoma da próstata é maior na Europa do Norte e Ocidental, na América do Norte e na Oceânia, apresentando igualmente uma incidência elevada em zonas menos desenvolvidas como as Caraíbas, a África do Sul e a América do Sul. Estas variações podem dever-se ao facto das técnicas de diagnóstico precoce utilizadas não serem uniformes para todos os países, sendo mais utilizadas em zonas economicamente desenvolvidas (Ferlay *et al.*, 2015).

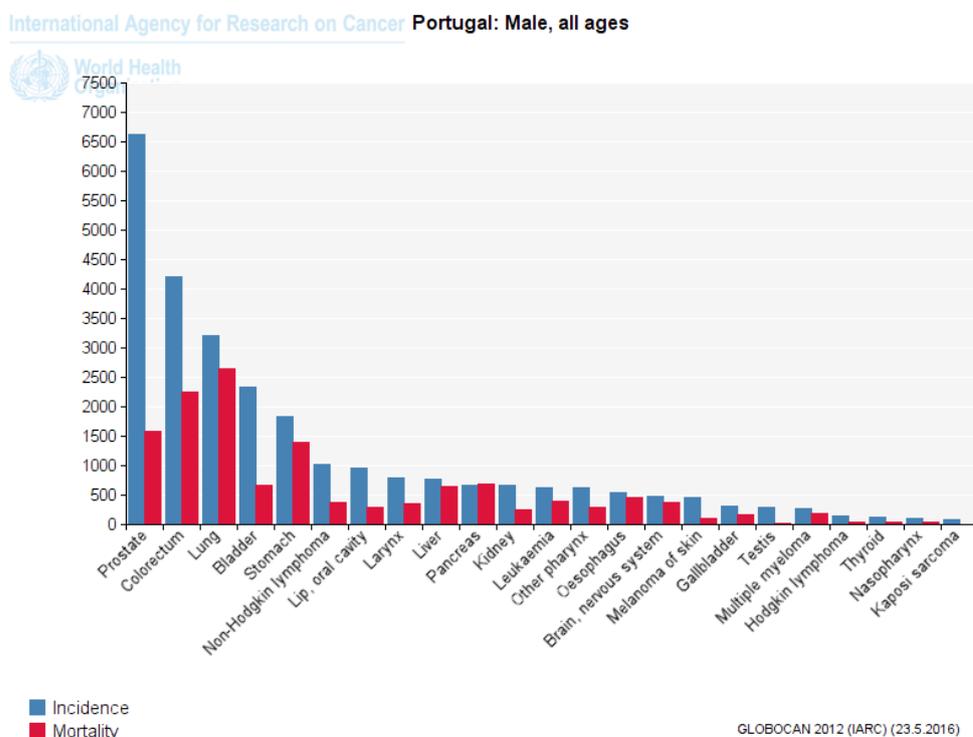


Figura 4: Representação da incidência e da mortalidade por cancro, em Portugal, para ambos os géneros. A cor vermelha corresponde à mortalidade e o azul à incidência. [Adaptado de (GLOBOCAN,2012)]

Em Portugal, as estatísticas indicam que o carcinoma da próstata é a neoplasia com maior incidência e a terceira causa de morte oncológica (Figura 4). Por ano, a incidência desta patologia ascende a 6622 casos, sendo atribuídas cerca de 1500 mortes a este tumor (GLOBOCAN 2012).

O desenvolvimento de carcinoma da próstata está associado a três principais fatores de risco, a faixa etária, a raça/etnia e a predisposição familiar (Gann, 2002). Contudo, entre eles, o fator mais significativo é o envelhecimento. Com o avanço da idade, a taxa de incidência aumenta drasticamente até atingir o seu pico máximo por volta dos 80 anos. São raros os registos de ocorrência de cancro da próstata antes dos 40 anos de idade (Pedrosa, 2012).

A etnia também faz variar as taxas de incidência de carcinoma da próstata. Os homens de raça negra estão associados a um maior risco de cancro da próstata avançado e agressivo, em idade jovem, sendo afetados por esta patologia cerca de 2-3 anos mais cedo que os homens caucasianos (Hussein, Sattunwar e Kwast, 2015). As razões para estas diferenças ainda não estão completamente esclarecidas, mas pressupõe-se que sejam devido a alterações na expressão de genes associados à manutenção dos níveis de testosterona em circulação, reportados como mais elevados nos indivíduos com descendência africana. Assim, genes que codificam enzimas que se encontram envolvidas na ativação ou na inativação da testosterona, tal como gene 5 alfa redutase do tipo 2 (SRD5A2), responsável por codificar a proteína conversora de testosterona, e os citocromos p450 cYP3A4, CYP3A5 e CYP3A43, envolvidos na hidroxilação da testosterona, são suscetíveis a alterações genéticas de acordo com a etnia (Zeigler-Johnson *et al.*, 2008) Estas alterações também podem ser justificadas pelas modificações ambientais, pelas variações na dieta e pelas alterações epigenéticas, que cada vez mais têm sido associadas ao aumento do risco de cancro da próstata (Adjakly *et al.*, 2015).

Outro fator determinante é a predisposição familiar que é responsável por 5-10% dos casos desta patologia. Homens cujos familiares de primeiro grau tenham sido diagnosticados com carcinoma da próstata, antes dos 60 anos têm um risco quatro vezes superior de desenvolverem a doença, comparativamente à população em geral (Adjakly *et al.*, 2015). As condições hereditárias estão associadas ao Síndrome de Lynch e a mutações dos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *HOXB13* (Tabela 1). Portadores de mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2* têm demonstrado estar associados a carcinoma da próstata em idades mais jovens e mais agressivo, caracterizado por uma elevada taxa de metastização ganglionar e à distância, aquando da deteção e, conseqüentemente, elevada mortalidade, comparado com os não portadores deste tipo de mutações (Attard *et al.*, 2015; Hussein, Sattunwar e Kwast, 2015). Mutações no gene

HOXB13 também estão associadas a carcinoma da próstata, no entanto, o exato mecanismo desencadeado por esta mutação na carcinogénese ainda não se encontra esclarecido, sabendo-se apenas que este gene interage com o recetor de androgénios (RA) e que promove o desenvolvimento e a diferenciação da próstata normal em carcinoma (Attard *et al.*, 2015; Hussein, Sattunwar e Kwast, 2015; Patel e Klein, 2009).

	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>HOXB13</i>
Genomic location	17q21	13q12.3	17q21–22
Relative risk of prostate cancer	1.8–4.5 for age <65 years	23 for age <55 years 2.5–8.6 for age <65 years	Eightfold for age <55 years
Ethnic predominance	Ashkenazi Jewish, Norwegian, Dutch and Icelandic people	Ashkenazi Jewish, Norwegian, Dutch and Icelandic people	Finnish, Swedish
Specific mutation associated with young-age prostate cancer	–	<i>BRCA2</i> 999del5 (Icelandic founder mutation)	<i>HOXB13</i> G84E, rs138213197
Characteristic histological features	–	Intraductal carcinoma in 42%	Pseudohyperplastic features in 45%
Prognosis	Unfavourable	Unfavourable	Favourable
Other associated cancers	Breast and ovary	Breast and ovary	Breast

Tabela 1: Representação das mutações mais comuns associadas a CaP familiar (Hussein, Sattunwar e Kwast, 2015)

1.1.3 Diagnóstico e estadiamento

Na última década a incidência de carcinoma da próstata aumentou, porém, a taxa de mortalidade diminuiu. Esta diminuição no número de mortes por esta patologia está relacionada com vários fatores, nomeadamente, a deteção e o diagnóstico mais precoces, aparecimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e uma maior abrangência geográfica dos testes de diagnóstico precoce (Pedrosa, 2012). O diagnóstico precoce do carcinoma da próstata, quando determinado numa fase inicial da doença, antes do aparecimento de sintomas, aumenta o número de opções terapêuticas disponíveis.

Os exames de diagnóstico precoce comumente utilizados são a pesquisa do antigénio específico da próstata (PSA – do inglês, *prostate-specific antigen*) e o toque retal. A ecografia transretal (ET) também pode ser utilizada permitindo determinar, através de imagem, as dimensões da glândula prostática, a anatomia regional e as eventuais lesões cancerígenas (Turkbey, Pinto e Choyke, 2009). Se o resultado destes exames apresentar anomalias poderá estar indicada a realização de biópsia ou o uso de outras técnicas de imagem ou analíticas (Stavridis *et al.*, 2010).

O PSA é uma glicoproteína secretada pelo epitélio prostático, concentrando-se nestes tecidos, pelo que apresenta baixas concentrações no soro (Ingle, Ramona e Suresh, 2013). Perturbações na arquitetura da próstata normal desencadeiam um aumento dos níveis de PSA na circulação geral. Contudo, o PSA é expresso tanto pelas células normais como pelas células do carcinoma da próstata e, portanto, não pode ser considerado um marcador específico de doença. Os níveis de PSA no soro também podem estar aumentados por outros fatores, incluindo a HBP, a prostatite e o aumento do volume da próstata associado à idade. De acordo com a idade e com a etnia foram determinados valores de referência para a PSA livre no soro, que são apresentadas na Figura 5. Em grande parte da Europa considera-se que concentrações séricas de PSA maiores ou iguais a 4 ng/mL são anormais e recomenda-se a biópsia da próstata. Este exame rotineiro revela muito pouca especificidade para estas concentrações, sendo que apenas 20-30% dos homens com concentrações de PSA entre os 4 e os 10 ng/mL revelam ter carcinoma da próstata, no entanto o seu valor para o diagnóstico é incontestável (Greene et al., 2009; Ingle, Ramona e Suresh, 2013; Miller et al., 2007).

Age Range	Reference Range		
	Asian-Americans	African-Americans	Whites
40–49 yr	0–2.0 ng/mL	0–2.0 ng/mL	0–2.5 ng/mL
50–59 yr	0–3.0 ng/mL	0–4.0 ng/mL	0–3.5 ng/mL
60–69 yr	0–4.0 ng/mL	0–4.5 ng/mL	0–4.5 ng/mL
70–79 yr	0–5.0 ng/mL	0–5.5 ng/mL	0–6.5 ng/mL

Figura 5: Concentrações de referência de PSA para intervalos etários, de acordo com a etnia dos doentes. [Adaptado de (Greene et al., 2009)]

O grau de diferenciação histológica é essencial para aceder à agressividade do tumor, para prever o resultado da terapêutica e também para a escolha da melhor terapêutica. Para permitir a análise histopatológica é necessário recolher amostras por biópsias guiadas por ET (Cardoso, 2013; Hoeks et al., 2011). A escala de Gleason é um sistema de classificação histopatológica desenvolvido por Donald F. Gleason em 1966 que continua a ser amplamente utilizada na prática clínica. Este baseia-se no padrão da arquitetura globular do tumor e divide-

se em cinco graus de diferenciação, em que o grau 1 corresponde ao mais diferenciado e o grau 5 ao mais indiferenciado, tal como que se pode observar na

Figura 6 (DeMarzo et al. 2003; Humphrey 2004; Maygarden & Pruthi 2005; Gordetsky & Epstein 2016; Shah & Zhou 2016;).

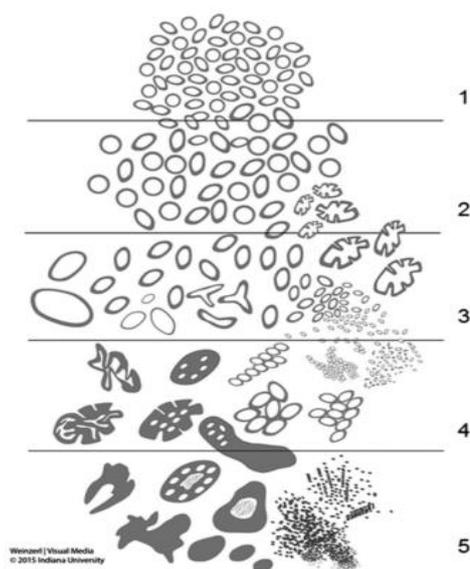


Figura 6: Nova escala de Gleason, modificada em 2015 pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica. [Adaptado de (Shah e Zhou, 2016)]

As técnicas de obtenção de imagem são de extrema relevância para determinar a extensão do tumor e o estadiamento da doença. Para determinar a extensão da doença localizada a imagem por ressonância magnética (MRI, do inglês *magnetic resonance imaging*) é a mais utilizada. A tomografia computadorizada (TC) é recomendada para doentes com concentrações de PSA elevadas, de modo a avaliar a possibilidade de linfadenopatia ou do envolvimento de órgãos sólidos (como metástases no fígado ou no pulmão). A cintigrafia óssea com bifosfonatos marcados com tecnécio 99 metastável é amplamente utilizada para a deteção de metástases ósseas. Existe ainda, a tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *positron emission tomography*) com fluorodeoxiglicose marcada com flúor 18 (^{18}F -FDG, do inglês, *fluorodeoxyglucose*), um marcador do metabolismo da glicose, capaz de dar informação acerca da carcinogénese que apesar de não ser eficaz no diagnóstico do carcinoma da próstata localizado, é bastante útil em doentes que demonstram uma não dependência androgénica. Assim é mais comum utilizar-se PET com colina, sendo esta um componente importante dos fosfolípidos da membrana celular que se encontram em elevados valores nas células do

carcinoma da próstata (Bouchelouche, Choyke e Capala, 2010; Turkbey, Pinto e Choyke, 2009).

O sistema de estadiamento mais usado é o TNM a [tumor primário (T); gânglios linfáticos (N) e metástases à distância (M)], no os doentes são estratificados de acordo com os métodos de diagnóstico apresentados previamente. Esta classificação é composta por várias subdivisões dentro da classificação TNM que permitem dar a informação das zonas afetadas pelo tumor, tal como se pode observar na Figura 7, bem como agrupar os doentes em grupos de prognóstico semelhante. Assim, é possível classificar a doença em três grandes grupos: localizada, quando se encontra confinada apenas à próstata; localmente avançada quando a doença se estende para a região para-prostática; e por último, o carcinoma da próstata metastático (CaPm) definido pela presença de tumor noutras zonas do organismo, normalmente os gânglios linfáticos e o osso (Cheng *et al.*, 2012; Hoeks *et al.*, 2011; Moul *et al.*, 2015; NCCN, 2016).

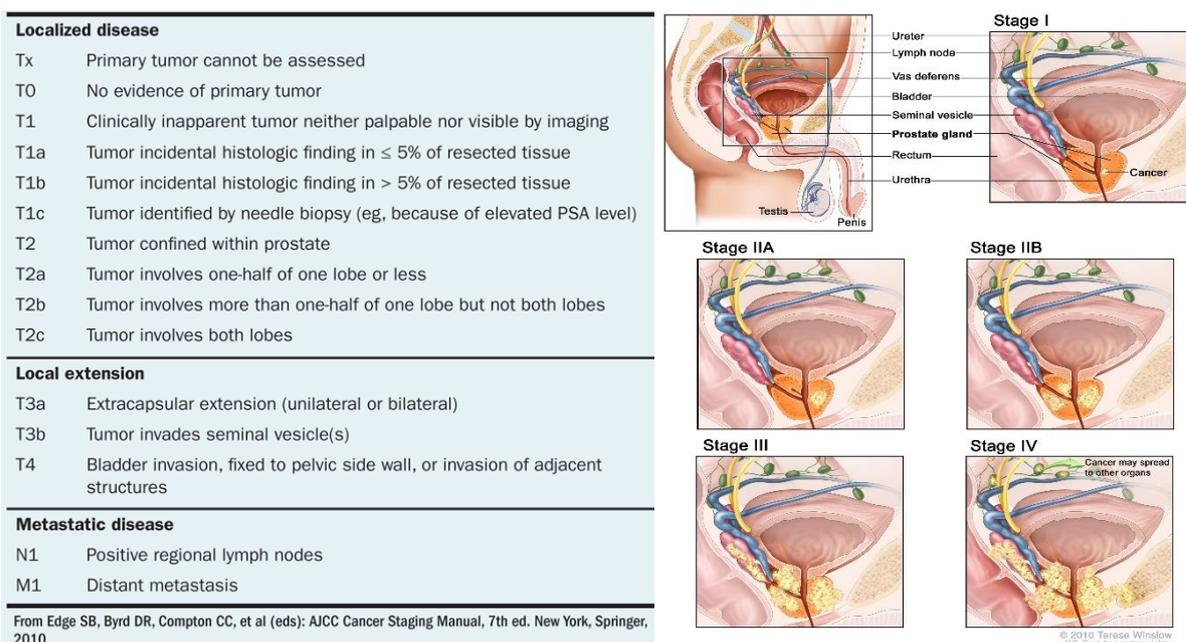


Figura 7: Representação do sistema de classificação TNM de 2010 para CaP à esquerda, com imagem ilustrativa da evolução da patologia. [Adaptado de (Moul *et al.*, 2015) e (Cancer Research UK, 2016)]

1.1.4 Terapêutica

Homens diagnosticados com carcinoma da próstata localizado podem ter diferentes prognósticos e têm acesso a um vasto leque de opções terapêuticas. Não existem evidências que permitam identificar o melhor tratamento para o carcinoma da próstata. Na Figura 8

apresentam-se as abordagens mais utilizadas nos diferentes escalões etários. (Attard *et al.*, 2015; Siegel *et al.*, 2012).

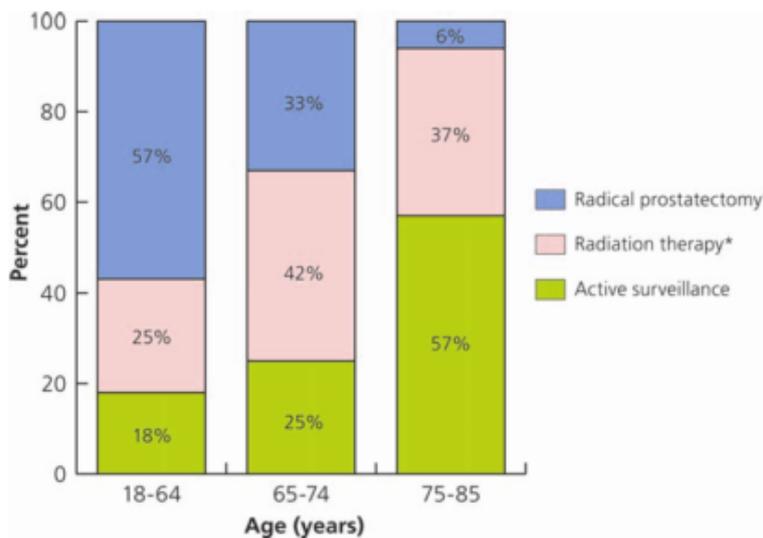


Figura 8:. Primeira opção de tratamento dos doentes com CaP de acordo com a idade, em 2008. A cor azul corresponde a prostatectomia radical, a cor-de-rosa a radioterapia e a cor verde a vigilância ativa. [Adaptado de (Siegel *et al.*, 2012)]

A. Vigilância Ativa

Se o doente for classificado com doença de muito baixo risco de é possível propor-se uma estratégia de vigilância ativa, não necessitando de ser submetido, nesta fase, a tratamentos desgastantes e potencialmente prejudiciais (Attard *et al.*, 2015). São candidatos doentes com carcinoma da próstata localizada, com grau de Gleason inferior a 6, com no máximo dois cores positivos na biópsia, nenhum dos quais com mais de 5% de neoplasia e com uma esperança de vida maior do que 10 anos. Estes doentes devem ser acompanhados com medições de PSA e com biópsias regulares e são descritos com um tempo de sobrevida livre de doença durante 5 a 10 anos (Ramon e Denis, 2007).

B. Prostatectomia Radical

É uma técnica cirúrgica de intuito curativo que envolve a remoção de todo o tecido prostático e dos gânglios linfáticos regionais, nas situações em que a linfoadenectomia está indicada. Esta terapêutica está preconizada para doentes com adenocarcinoma localizado à próstata e com uma esperança de vida maior que 10 anos (Monteiro, 2006; Ramon e Denis, 2007).

C. Radioterapia

É cada vez mais comum o uso de radioterapia como forma de tratamento para a doença localizada. Existem duas modalidades, a irradiação por fonte externa e a braquiterapia. A primeira é apresentada como a mais convencional e surge como uma alternativa à prostatectomia radical, com resultados comparáveis em termos de sobrevida e na qualidade de vida (Monteiro, 2006). A inovação e a melhoria nas técnicas com a implementação do uso da radioterapia conformacional 3D e da radioterapia de intensidade modulada reduziram os efeitos secundários mais comuns, desencadeados pela irradiação de tecidos vizinhos do órgão alvo. Este tipo mais inovador de radioterapia permite que sejam depositadas doses mais altas de radiação no tumor, minimizando os danos agudos ou tardios nos tecidos vizinhos. A combinação de radioterapia com bloqueio androgénico permite melhorar os resultados obtidos em casos de doentes de cancro da próstata de alto risco (Heidenreich *et al.*, 2011; Monteiro, 2006; Ramon e Denis, 2007).

A braquiterapia consiste na colocação transperineal de pequenas sementes, implantes radioativos intraprostáticos, guiada por ecografia. Estes implantes podem ser permanentes ou temporários. É uma técnica segura e eficiente que permite a administração de doses maiores de radiação com menor morbilidade associada. Os critérios de seleção que têm sido adotados para os doentes consideram pequeno volume da próstata, cancro da próstata localizado, baixa diferenciação histológica (Gleason <7), baixas concentrações séricas de PSA (<10 ng/mL), volumes prostáticos inferiores a 60 cm³ e IPSS (do inglês, *International Prostate Symptom Score*) ligeiro a moderado (Heidenreich *et al.*, 2011; Monteiro, 2006; Pedrosa, 2012)

D. Outros tratamentos localizados

Além dos tratamentos já descritos, há outras técnicas ainda em fase de investigação. O tratamento por ultrassons focados de alta intensidade (HIFU do inglês *high-intensity ultrasound*) apresenta-se como uma técnica minimamente invasiva. A chave deste tratamento consiste em fornecer a quantidade de energia necessária para aumentar a temperatura do tecido a um nível citotóxico (> 60°C), o que provoca morte celular por necrose de coagulação. Os doentes devem apresentar baixas concentrações séricas de PSA e um grau de Gleason favorável. Estudos demonstram uma taxa livre de doença de 89,6% após 10 anos (Hsiao *et al.*, 2016; Zhou, 2011).

Também a crioterapia tem surgido como uma técnica minimamente invasiva para o tratamento do cancro da próstata através do congelamento e descongelamento dos tecidos cancerígenos, o que induz morte celular por apoptose. Este tratamento poderá estar indicado para estadios iniciais da doença e nas recidivas após radioterapia (Sverrisson, Jones e Pow-Sang, 2013).

1.2 Carcinoma da Próstata Avançado

Entre 20 a 30% dos doentes com carcinoma da próstata localizado irão desenvolver metástases à distância, para além de cerca de 10 a 20% dos doentes que já as apresentam aquando do diagnóstico inicial (Bahl, 2013). Neste estadio mais avançado da doença, as células tumorais já se disseminaram da próstata para as áreas adjacentes ou para outras regiões do organismo, mais frequentemente para os gânglios linfáticos e para o osso. Em 1941, Charles Huggins e Clarence Hodges provaram que o desenvolvimento e a expansão do carcinoma da próstata é dependente da atividade hormonal (Bahl, 2013; Calais da Silva, 2013; Felici, Pino e Carlini, 2012).

1.2.1 O papel dos Recetores de Androgénios

O desenvolvimento e normal funcionamento da próstata é dependente de androgénios e das suas funções sobre as moléculas alvo (como fatores de crescimento) através da via de sinalização pelos recetores de androgénios (RA). Assim, os androgénios são críticos na manutenção das células da próstata e contribuem para a sua diferenciação e crescimento. Todavia, em condições anormais, contribuem também para o desenvolvimento e para a progressão do carcinoma da próstata, apresentando um papel fulcral na sua carcinogénese (Pedrosa, 2012; Santos, Huang e Tindall, 2004).

Os androgénios, tal como a testosterona, são sintetizados maioritariamente pelas células de Leyding nos testículos, sobre regulação da hormona luteinizante (LH, do inglês *luteinizing hormone*) produzida na glândula pituitária anterior e, em pequena quantidade, pelas glândulas suprarrenais. Por sua vez, a secreção de LH é regulada pela hormona libertadora de gonadotropinas (GnRH, do inglês *gonadotropin-releasing hormone*). A maioria da testosterona produzida circula no soro ligada à globulina transportadora de hormonas sexuais (SHBG, do

inglês *sex hormone-binding globulin*). Apenas a forma livre penetra as células da próstata, onde é convertida num metabolito de testosterona, pela 5 α -reductase, a 5 α -dihidrotestosterona (DHT). O DHT liga-se aos RA, devido à elevada afinidade por estes promovendo o crescimento, a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência das células da próstata, tal como se pode observar na Figura 9 (Chandrasekar *et al.*, 2015; Huang e Tindall, 2002; Javidan *et al.*, 2005; Ning *et al.*, 2014; Pedrosa, 2012; Tan *et al.*, 2014).

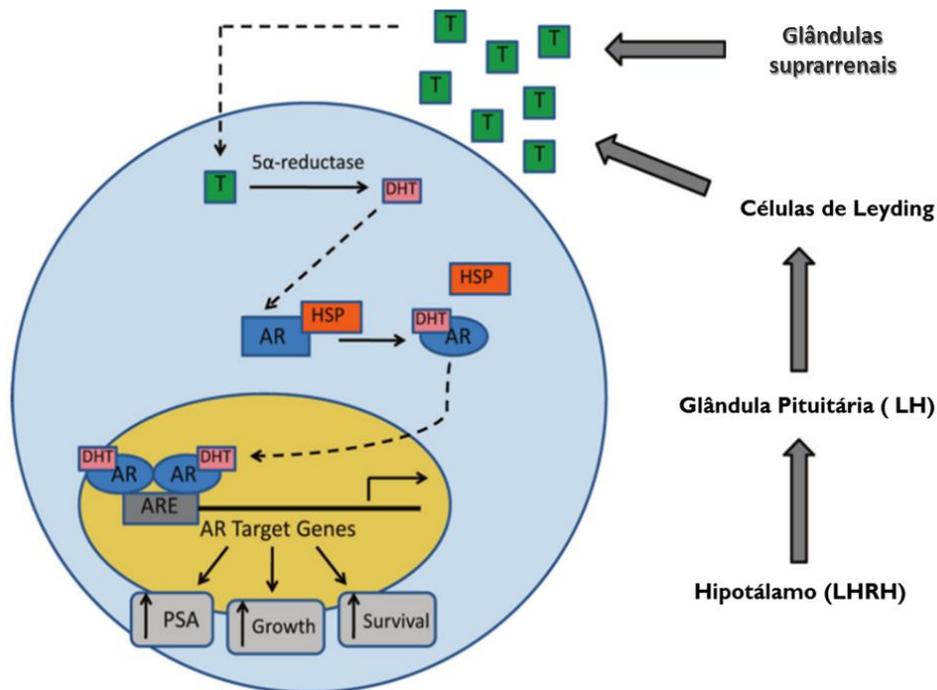


Figura 9: Mecanismo de ação dos androgénios e via de sinalização dos RA nas células da próstata. T indica testosterona; HSP, proteína de choque do calor; AR, recetor de androgénios; ARE, elemento responsivo a androgénios; LH, hormona luteinizante; PSA, antígeno específico da próstata. [Adaptado de (Saraon, Jarvi e Diamandis, 2011)]

Os RA são recetores nucleares com peso molecular de 110 kDa, constituídos por 919 aminoácidos e codificados por um gene localizado no cromossoma Xq11-12. No estado não ligado, o RA está predominantemente localizado no citoplasma, ligado às proteínas de choque do calor (HSP). Quando se conecta ao ligando, o RA transloca-se para o núcleo ligando-se a elementos androgénio dependentes na região promotora. Aqui interage com elementos do genoma e recruta moléculas que aumentam (coativadores) ou reprimem (correpressores) a transcrição génica. Existem múltiplas formas de coativar esta função através de processos de fosforilação, de metilação, de acetilação ou de ubiquitinação em vários locais. Estas

modificações permitem interatuar com outras vias de sinalização (ex: cinases, fosfatases, histonas, acetiltransferases e desacetilases) e explicam a enorme plasticidade do sinal do RA.

Atendendo a esta dependência androgénica do carcinoma da próstata na fase inicial, a terapia hormonal ou a terapia de privação androgénica (ADT, do inglês *androgen-deprivation therapy*) é considerado o tratamento *standard* para estes doentes (Calais da Silva, 2013). Esta descoberta valeu, em 1966, a Huggins e Hodges a atribuição do prémio nobel da Fisiologia e da Medicina. Deste modo, esta terapêutica pode ser realizada de modos diferentes, expostos seguidamente.

A. Castração Cirúrgica

A orquidectomia bilateral é a forma clássica de terapêutica hormonal, consistindo na remoção cirúrgica de ambos os testículos, a maior fonte de androgénios, com obtenção rápida de concentrações muito baixas de testosterona. Os doentes sujeitos a este tratamento apresentam uma redução da testosterona em circulação de 90% nas primeiras 24h. Assim, obtêm-se concentrações de testosterona sérica da ordem dos 15 ng/dL. Classificado como um tratamento permanente, é uma modalidade atualmente pouco utilizada (Calais da Silva, 2013).

B. Castração médica

Níveis séricos de testosterona similares aos anteriores também podem ser obtidos através do uso de produtos químicos, nomeadamente através da administração de estrogénios, de análogos da hormona libertadora de hormona luteinizante (LHRH, do inglês *luteinizing hormone-releasing hormone*) ou de antagonistas da LHRH.

Os estrogénios proporcionam um “*feedback*” negativo sobre o hipotálamo reduzindo a secreção de LHRH e, conseqüentemente, diminuem a secreção de LH e de testosterona. Por outro lado, também atuam diretamente sobre as células de Leyding suprimindo a produção de testosterona ou inibindo os androgénios. Os estrogénios sintéticos, tal como o dietilstilbestrol (DES), têm um efeito, supostamente, citotóxico direto sobre o epitélio prostático e sobre o dihidroepiandrosterona (DHEA) que impedem a produção de androgénios pela glândula suprarrenal. Contudo, as doses consideradas necessárias para a diminuição dos níveis séricos de testosterona apresentam risco de morbilidade cardiovascular significativa que os destrona como abordagem de primeira linha.

Os agonistas da LHRH têm como função induzir a inibição funcional da glândula pituitária e das gónadas, desencadeando uma diminuição no número de recetores e a disrupção da tradução de sinal, ou seja, uma dessensibilização gonadotrópica, para além da marcada redução nos níveis séricos de LH e de testosterona. O resultado da aplicação destes agonistas, traduz-se por um estado de castração médica, caracterizado pela inibição endócrina completa das gónadas, dos tecidos extra-gonadais detentores de recetores de LHRH e queda das concentrações séricas das hormonas sexuais.

Por outro lado, os antagonistas LHRH atuam através de um mecanismo de inibição competitiva pelos recetores de GnRH, promovendo uma imediata e irreversível supressão da hormona LH, da FSH e, conseqüentemente, da testosterona (Calais da Silva, 2013).

A inibição da ligação da DHT aos recetores de androgénio da célula alvo, pode ser efetuada com recurso à terapêutica com antiandrogénios não esteroides ou esteroides. Os primeiros atuam de modo a bloquear a translocação do complexo DHT-RA para o núcleo da célula e a ligação deste ao recetor da célula alvo. Relativamente aos segundos, além de promoverem o bloqueio da interação entre os androgénios e o seu recetor, diminuem também a produção de LH pelas glândulas suprarrenais (Calais da Silva, 2013)

Podem ser também utilizados inibidores da síntese de androgénios, como por exemplo o cetozonazol, um inibidor do citocromo P450; anti-androgénios de nova geração, tal como a enzalutamida que vai atuar a nível da translocação do RA para o núcleo; e ainda novos inibidores da síntese dos androgénios, como exemplo o acetato de abiraterona que inibe a atividade da CYP17 e diminui os níveis circulantes de testosterona, o mais importante ligando do RA (Calais da Silva, 2013; Hammerer e Madersbacher, 2012; Moul *et al.*, 2015).

1.2.2 A resistência à Castração

A ADT, tal como apresentado, é considerado o tratamento *standard* desde há vários anos, contudo apesar de se observar uma resposta favorável durante a fase inicial do tratamento, esta apresenta normalmente um curto período de eficácia. Entre 12 a 18 meses após o seu início do tratamento, as células malignas tornam-se resistentes a esta terapêutica hormonal (castração). Esta condição avançada de resistência é designada pela comunidade científica por cancro da próstata resistente à castração (CPRC) (Rodrigues *et al.*, 2014).

A resistência à castração define-se pela presença de progressão radiológica (aparecimento de duas ou mais metástases ósseas ou de uma metástase num órgão sólido)

e/ou bioquímica (quando se verificam três aumentos consecutivos da concentração sérica do PSA) da doença, num doente com valores de testosterona em níveis de (<50 ng/dL) (Chandrasekar et al., 2015).

Apesar de os mecanismos de resistência à castração ainda serem pouco claros, admite-se que pode ser através de alterações mutagénicas no RA, de amplificação deste, do envolvimento de co-reguladores ou até mesmo pela ativação dos RA não dependente de ligandos. Pressupõe-se ainda que a existência de modificações pós translacionais, de alterações na produção dos esteroides ou de variações de *splicing* nos RA possam ainda contribuir para o desenvolvimento de CPRC. Deste modo, não se pode afirmar apenas um mecanismo como o promotor da resistência, mas sim que o conjunto de vários fatores, tal como pode observar-se na Figura 10, potencia o seu desenvolvimento (Chandrasekar et al., 2015; Devlin e Mudryj, 2009; Javidan et al., 2005; Katsogiannou et al., 2015; Rodrigues et al., 2014).

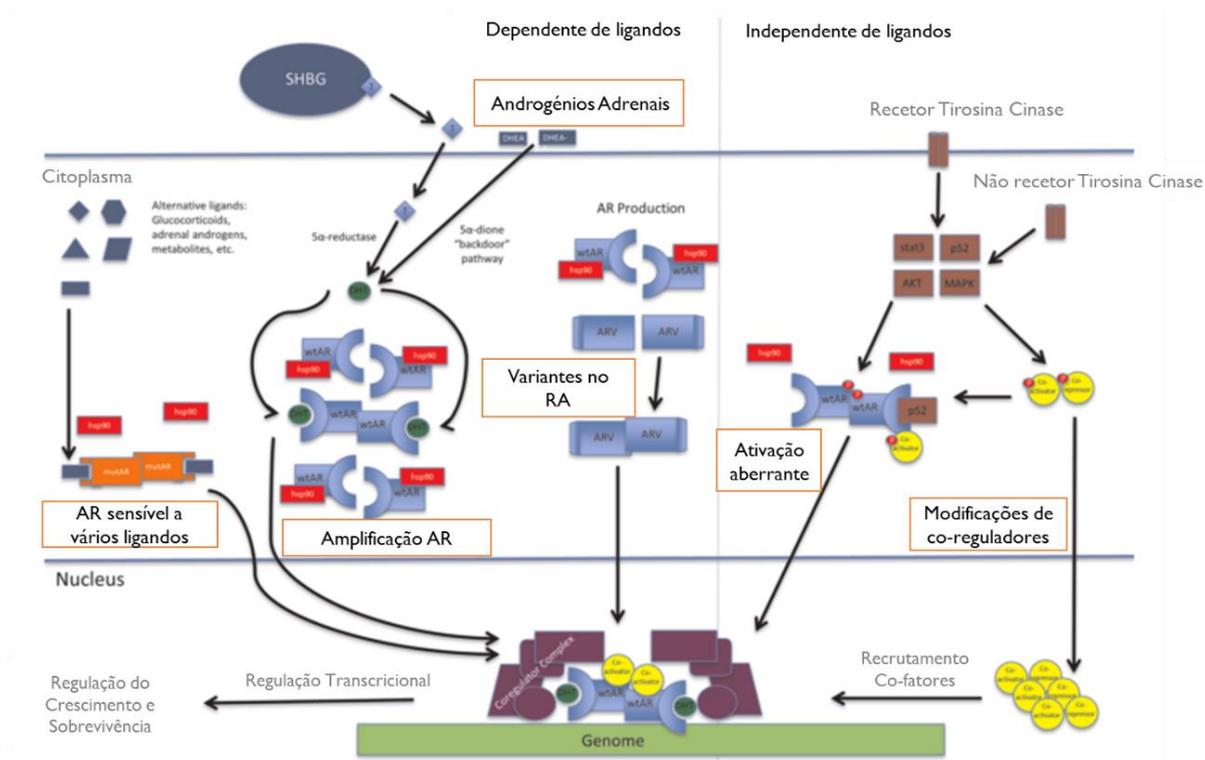


Figura 10: Mecanismo de resistência a androgénios dependente de recetores, no CaP hormonal natural, condutor da resistência à castração. wtAR, RA *wild-type*; ARV, variante do RA; mutAR, RA mutado; T, testosterona; DHT, dihidrotestosterona; SHGB, hormona sexual ligada à globulina. [Adaptado de (Chandrasekar et al., 2015)]

1.3 Carcinoma da Próstata Metastático Resistente à Castração

As células do carcinoma da próstata que adquirem resistência à castração tornam-se altamente invasivas, induzindo a rápida progressão da doença para outras zonas do organismo. Tal como em outros tumores sólidos, o carcinoma da próstata pode metastizar para órgãos distantes, como o fígado, o pulmão, o cérebro, ou os gânglios linfáticos, mas tem especial tendência para metastizar para o osso. Em doentes com cancro da próstata localizado a sobrevivência 5 anos após o diagnóstico é aproximadamente de 50%, contudo, em doentes com metastização esta taxa decresce para 31% (Jin, Dayyani e Gallick, 2011; Logothetis e Lin, 2005).

A metastização engloba, de um modo sucinto, um processo através do qual as células tumorais malignas extravasam o tumor primário e difundem para o sistema circulatório, através do qual alcançam locais distantes onde irão estabelecer um tumor secundário, de acordo com o ilustrado na Figura 11. É um processo complexo que engloba várias etapas sequenciais e interações com o microambiente (Arya *et al.*, 2006). A disseminação pode ocorrer através de uma das seguintes vias: 1) disseminação por contiguidade; 2) disseminação por via linfática; ou 3) disseminação por via hematogénica. Após o extravasamento das células tumorais para órgãos secundários, as células disseminam-se de acordo com o novo microambiente, formando colónias que podem permanecer longos tempos em dormência e posteriormente voltarem a proliferar (Dai *et al.*, 2016; Kumar, Abbas e Aster, 2015).

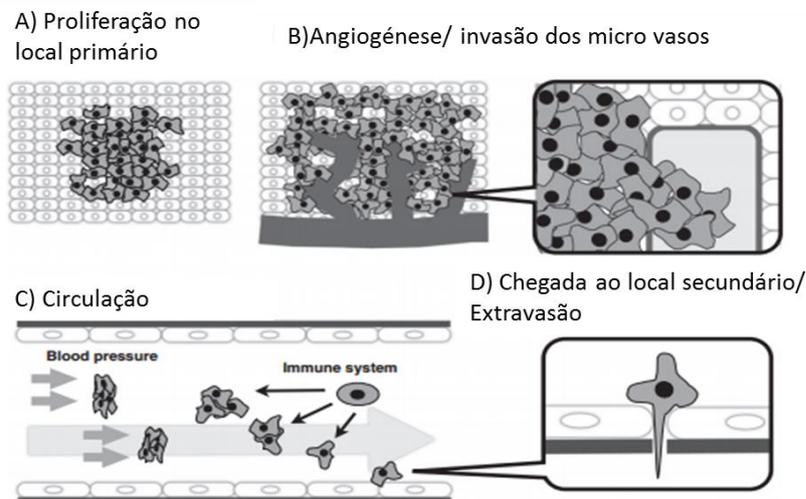


Figura 11: Cascata metastática [Adaptado de (Futakuchi, Fukamachi e Suzui, 2015)]

A presença de metástases em gânglios linfáticos tem sido observada em 5 a 12% dos doentes com carcinoma da próstata, todavia apenas a sua presença não conduz a uma condição fatal (Datta *et al.*, 2010).

Curiosamente, a função imune dos gânglios linfáticos fica amplamente comprometida pelo cancro mesmo antes das células disseminarem. Isto prende-se com o facto de, previamente à colonização dos gânglios linfáticos, as células tumorais induzirem alterações na arquitetura dos gânglios adjacentes à neoplasia, através da redução da densidade de células dendríticas apresentadoras de antígenos e das zonas paracorticais dos gânglios linfáticos com linfócitos T. As células endoteliais linfáticas estão ligadas a membranas extracelulares através de filamentos fixadores especializados, que ajudam na abertura dos vasos e na sua função durante o aumento da pressão no tecido. Assim, com o aumento da pressão tecidular, há um aumento da permeabilidade do tecido a fluídos e a células, o que permite às células tumorais e a outras moléculas invadirem o sistema linfático. Consequentemente, estes podem circular livremente neste sistema e alcançar os gânglios linfáticos regionais e, a partir daí, seguirem por via linfática até à circulação sanguínea, promovendo a capacidade de metastização para órgãos distantes (Datta *et al.*, 2010).

A maioria (~ 90%) de doentes com CPRC apresentam evidências radiológicas de presença de metástases ósseas, sendo este o primeiro local de metastização para cerca de 80% dos doentes (Dai *et al.*, 2016).

O osso apresenta uma composição muito heterogénea, composto por uma fase mineral, hidroxiapatite, uma fase orgânica e água. Na matriz extracelular do osso existem diversas proteínas, entre elas, moléculas sinalizadoras, proteínas estruturais e especializadas. Na fase mineral, a hidroxiapatite, constituída essencialmente por cálcio e fosfato, é o componente principal. Variações na distribuição e na composição mineral do osso são indicativos de possíveis doenças associadas. A integridade normal do osso é mantida por um ciclo contínuo de reabsorção óssea pelos osteoclastos e de formação de novo osso pelos osteoblastos (Body, Casimiro e Costa, 2015; Boskey, 2013). Os osteoclastos são células especializadas com a capacidade única de reabsorção óssea. A formação dos osteoclastos é controlada pelo recetor ativador do ligando nuclear κ B (RANKL) e o fator estimulador de colónias de macrófagos. A reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos ocorre num microambiente fechado, na área oposta à matriz óssea. Durante o ciclo de reabsorção, os osteoclastos ligam à matriz óssea para formar um vacúolo de reabsorção, há acidificação por iões H^+ e secreção de enzimas proteolíticas, resultando na exposição da matriz óssea às

enzimas proteolíticas e, conseqüentemente, na dissolução do mineral ósseo. Este processo desencadeia a libertação de fatores de crescimento ativadores de osteoblastos, proteínas morfogénicas, entre outros reguladores do crescimento e de diferenciação dos osteoblastos. A formação osteoblástica de osso resulta da proliferação de células estaminais esqueléticas primitivas, diferenciadas em percursos de osteoblastos e posteriormente maturadas a osteoblastos que vão formar a matriz óssea e mineralizar. Assim, a atividade dos osteoclastos e osteoblastos é altamente coordenada no tempo e no espaço, ocorrendo uma remodelação óssea não sincronizada em locais distintos (Body, Casimiro e Costa, 2015; Boskey, 2013; Croucher, McDonald e Martin, 2016).

O mecanismo de metástases ósseas é complexo e envolve interações cooperativas entre células tumorais, osteoblastos, osteoclastos e a matriz óssea mineralizada (constituída pela hidroxiapatite), ao longo de várias etapas. Primeiramente, no esqueleto, ocorre o desenvolvimento das metástases com a colonização da matriz óssea pelas células tumorais, onde formam pequenos nichos que se conseguem evadir ao sistema imune. Neste local, as células adaptam-se ao novo microambiente e podem ficar em dormência durante longos períodos de tempo. Após este tempo ocorre uma reativação e proliferação tumoral que conduz à formação de micrometástases. Por último, ocorre um crescimento descontrolado das células tumorais, já independente do microambiente, modificando as características do osso, tal como se pode elucidar pela Figura 12 (Croucher, McDonald e Martin, 2016).

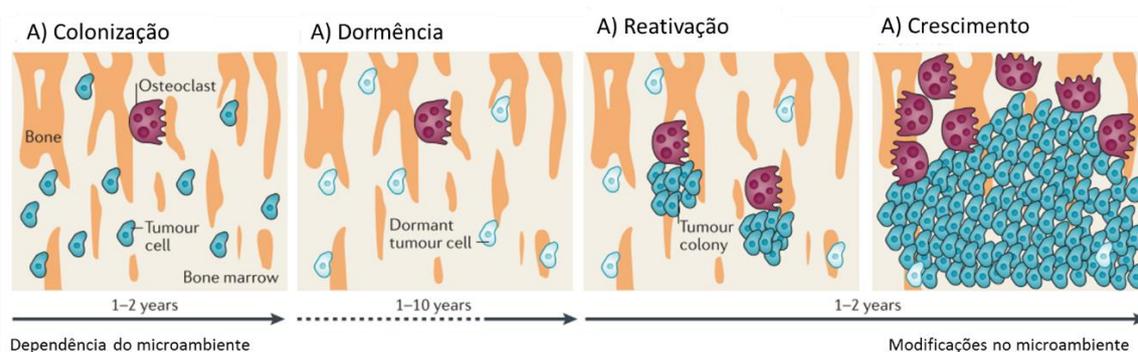


Figura 12: Processo de desenvolvimento de metástases ósseas através de várias etapas. [Adaptado de (Croucher, McDonald e Martin, 2016)]

O conjunto de todas estas interações traduz-se num “círculo vicioso” de reabsorção óssea. Os fatores secretados por estas células aquando da chegada ao novo microambiente, tal como o péptido relacionado com a hormona paratiroideia (PTHrP, do inglês *parathyroid hormone related peptide*) vão estimular os osteoblastos que, por sua vez, aumentam a expressão

do membro da família TNF, o RANKL. O RANKL, ao ligar-se ao seu recetor RANK, demonstra a sua importância na mediação da ativação dos osteoclastos que irão degradar a matriz óssea e induz a libertação de fatores de crescimento que estimulam o crescimento do tumor, repetindo-se o ciclo constantemente, como se pode visualizar na Figura 13 (Coleman *et al.*, 2008; Futakuchi, Fukamachi e Suzui, 2015; Hensel e Thalmann, 2016).

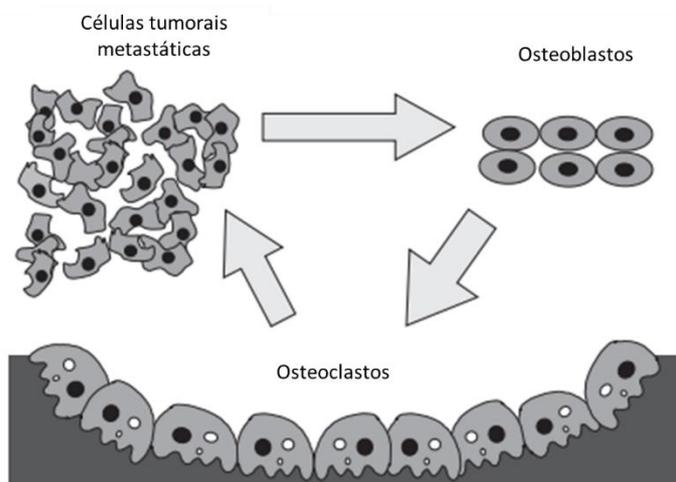


Figura 13: Hipótese do mecanismo de círculo vicioso para as metástases ósseas [Adaptado de (Futakuchi, Fukamachi e Suzui, 2015)]

O fenótipo das lesões ósseas desencadeadas pelo cancro da próstata é determinado com base no balanço da atividade entre os osteoblastos (células formadoras de osso) e os osteoclastos (células destruidoras do osso). As metástases ósseas resultantes do cancro da próstata apresentam uma tipologia de lesões osteoblásticas, isto é, são locais de elevada renovação óssea resultante da estimulação dos osteoblastos ou inibição dos osteoclastos, podendo também resultar do conjunto de ambos os processos. Esta classificação é suportada pelo aumento dos valores de marcadores de proliferação osteoblástica detetados, tais como a fosfatase alcalina específica do osso, em doentes de cancro da próstata metastático. A fosfatase alcalina atua na remodelação óssea, facilitando a formação de lesões osteoblásticas. No interior dos osteoclastos, o cálcio e o fósforo atuam a nível da hidroxiapatite, induzindo o crescimento do cristal e a formação óssea, visível na Figura 14. Isto vai induzir maior libertação de fosfatase alcalina e proteínas estruturais ósseas para o sangue, que podem ser utilizados como marcadores do cancro da próstata metastático (Bok e Small, 2002; Boskey, 2013).

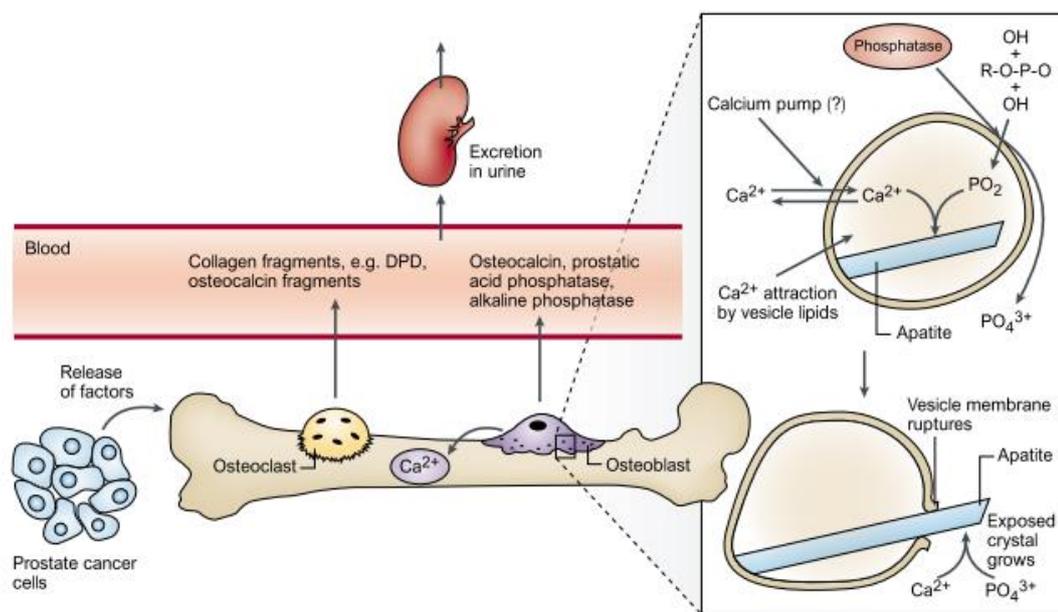


Figura 14: Interações entre as células tumorais de CaP e as células ósseas na formação das metástases ósseas. [Adaptado de (Bok e Small, 2002)]

Os locais mais comuns para o aparecimento das metástases ósseas são as costelas, as vértebras e a pélvis, surgindo ocasionalmente nos ossos longos. Estas lesões ósseas induzem alterações na estrutura e na integridade óssea, que podem originar complicações, como fracturas, dando origem a eventos relacionados com o esqueleto (SREs, do inglês *skeletal-related events*). Estes SREs destaca-se a dor severa e a fragilidade óssea, indutores de fraturas patológicas e de compressão na medula espinhal. A presença destes eventos, maioritariamente incuráveis, traduz-se na diminuição do tempo de sobrevivência e da qualidade de vida dos doentes e, como tal, é de extrema importância tentar reduzir a sua incidência ou prolongar o tempo até ao seu aparecimento (Benjamin *et al.*, 2015; Body, Casimiro e Costa, 2015; Logothetis e Lin, 2005)

O diagnóstico por imagem é crucial para determinar a presença e a extensão das metástases ósseas e, conseqüentemente, essencial para determinar a melhor terapêutica. A imagem molecular utilizando a medicina nuclear, nomeadamente com a realização da cintigrafia óssea e da PET, são os exames mais utilizados. Ambos recorrem ao uso de radiofármacos para determinar, através de diferentes métodos, as lesões metastáticas. Para a realização da cintigrafia óssea recorre-se ao uso de hidroximetileno difosfonato (^{99m}Tc -HMDP) ligado ao radionuclídeo Tecnécio-99m (^{99m}Tc), apresentando este um período de semi-desintegração de seis horas e desintegra-se emitindo raios gama com um pico de energia de 140 e 142 keV (do inglês, *elétron-volt*). O ^{99m}Tc -HMDP apresenta elevada afinidade para a hidroxiapatite do osso,

e para o cálcio, em zonas aumentadas de mineralização óssea, normalmente associadas a zonas de lesões malignas (Fogelm, 1987; Wong e Piert, 2013). Relativamente ao PET os mais comumente utilizados são as marcações com flúor-18 ligado ou à fluorocolina (^{18}F -FCH), sendo este o exame mais preciso para estadiar o carcinoma da próstata de risco médio ou alto, ou então ao flúor-18 ligado fluoreto (^{18}F -NaF) que é altamente sensível na deteção de metástases ósseas (Calais da Silva, 2013).

1.3.1 Terapêutica

Até à aprovação pela EMA e pela FDA do agente quimioterapêutico docetaxel, em 2004, as opções terapêuticas para os doentes com cancro da próstata metastático resistente à castração eram limitadas. O docetaxel é um taxano que atua nos microtúbulos através da sua ligação às subunidades da tubulina, pelo que impede a ligação aos microtúbulos, alterando a mitose e provocando morte celular. Contudo, a resistência à terapêutica com docetaxel também pode surgir, dificultando o tratamento. Em 2011, foi aprovado um novo medicamento, o cabazitaxel. É um taxano semissintético desenvolvido para ultrapassar a resistência ao docetaxel, que atua do mesmo modo a nível da inibição da dinâmica dos microtúbulos, induzindo bloqueio mitótico e desencadeando apoptose (Paller e Antonarakis, 2011; Rodrigues *et al.*, 2014; Zustovich e Fabiani, 2014).

Desde 2012 que algumas alternativas terapêuticas, com evidências de aumento da sobrevivência, têm sido aprovadas, entre elas novos agentes hormonais (Bahl, 2013). Referências mais antigas defendem que o tratamento hormonal após o estado de castração seria inútil, contudo, atualmente reconhece-se a persistência da sinalização do recetor de androgénio após este estado. A continuação desta sinalização pelo RA, após a castração, pode dever-se ao facto de os locais extragonadais, como as suprarrenais, manterem a produção contínua de baixos níveis de androgénios, ou ainda, devido à capacidade que alguns tumores adquirem de converter os esteroides adrenais em androgénios. Estas baixas concentrações seriam suficientes para manter os níveis de ativação dos RA. Assim, foram desenvolvidos, com aprovação pela FDA e pela EMA, alguns fármacos que visam diminuir a sinalização dos recetores de androgénios como o acetato de abiraterona (AA) e a enzalutamida. O acetato de abiraterona é um inibidor seletivo da biossíntese androgénica, que bloqueia de forma potente o citocromo P450 c17 (CYP17) e, conseqüentemente, inibe a conversão do colesterol em testosterona e em dihidrotestosterona. Por outro lado, a enzalutamida é um antagonista

do recetor de androgénios capaz de bloquear a ligação da testosterona ao recetor, impossibilitando o seu movimento para o núcleo das células prostáticas neoplásicas e, deste modo, a ligação ao ADN, o que conduz à apoptose celular (Bahl, 2013; Merseburger *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2014).

Em 2013, foi aprovado pela EMA a única vacina terapêutica em oncologia, a sipuleucel-T. É uma vacina de terapia baseada em células dendríticas autólogas, desenvolvida com a intenção de estimular as células T a desencadear uma resposta imune contra o antigénio expresso pelas células tumorais de carcinoma da próstata, a fosfatase ácida prostática. A grande limitação do uso desta vacina centraliza-se no seu elevado custo económico e complexidade clínica associada (Bahl, 2013; Merseburger *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2014).

Foram também aprovadas terapias dirigidas para o osso, tais como o ácido zoledrónico e o denosumab. O ácido zoledrónico é o único bifosfonato que demonstrou eficácia e benefício clínico na prevenção de SREs. Os bifosfonatos apresentam uma estrutura química similar ao componente da matriz óssea pirofosfato, permitindo a fácil absorção e ligação aos cristais de hidroxiapatite, promovendo a inibição da reabsorção óssea pelos osteoclastos. O maior efeito adverso é a nefrotoxicidade associada a este tratamento. Por outro lado, o denosumab é um anticorpo monoclonal dirigido contra o RANKL que se liga à superfície das células osteoclásticas, impedindo a ligação do RANKL ao recetor que, conseqüentemente, diminui a reabsorção óssea e aumenta a massa óssea (Bahl, 2013; Birtle, 2013; Hathaway, Baker e Sonpavde, 2015; Merseburger *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2014; Zustovich e Fabiani, 2014).

A radioterapia dirigida com recurso a radioisótopos terapêuticos é um avanço comparativamente aos tratamentos de radioterapia de fonte externa. Os radiofármacos permitem uma deposição mais específica da energia nos tecidos alvo e/ou no tumor, evitando que os tecidos normais circundantes sejam afetados. Os radiofármacos utilizados na terapêutica podem ser emissores de partículas β ou α . As partículas β são eletrões carregados negativamente emitidos pelo núcleo de um átomo radioativo em decaimento, com variadas energias e, por isso, um espectro contínuo de energia. Após a emissão, o núcleo filho fica com mais um próton e menos um neutrão em relação ao núcleo pai. Estas partículas carregadas negativamente apresentam uma transferência linear de energia (LET, do inglês *linear energy transfer*) muito baixa ($\sim 0,2$ keV/ μm), como tal, para o seu uso terapêutico são necessárias elevadas concentrações no tecido alvo. Ao passarem através do tecido, as partículas β ejetadas interagem com os átomos do meio, maioritariamente moléculas de água, produzindo átomos

ionizados e excitados assim como radicais livres que são responsáveis por causar danos nas células e induzir danos numa das cadeias do ADN.

As partículas α são constituídas por dois prótons e dois neutrões, sendo comparáveis a um núcleo de hélio. Uma destas partículas produz milhares de ionizações em zonas localizadas, perdendo energia cada vez que a partícula interage. São partículas com curto alcance no ar (1-2 cm) e que podem ser travadas por uma folha de papel. Os emissores de partículas α com período de semi-desintegração reduzido estão atualmente a ser propostos para o uso na terapêutica tumoral, devido ao limitado percurso livre no tecido (50–80 μm) e elevada LET (100 keV/ μm) que são capazes de induzir quebras irreparáveis na cadeia dupla de ADN, com extensos danos cromossómicos. (Abi-Ghanem, McGrath e Jacene, 2015; Hamoudeh *et al.*, 2008; Kassis e Adelstein, 2005) (Mendes 2015)

Em lesões osteoblásticas associadas ao cancro da próstata metastático resistentes à castração, radiofármacos emissores beta (β) têm sido utilizados com efeito paliativo para o tratamento da dor, como o estrôncio-89 (^{89}Sr) e o ácido etilenodiaminotetrametileno difosfórico ligado ao samário-153 ($^{153}\text{Sm-EDTMP}$). Os derivados dos fosfonatos são conhecidos como “*bone seeking*” devido às semelhanças na estrutura química com o cálcio, característica facilitadora da incorporação no osso nos locais metastáticos de elevada atividade osteoblástica. Estes agentes terapêuticos são geralmente acompanhados, quando marcados com emissores β , por efeitos adversos sobre a medula óssea, tal como a mielossupressão. Contudo, apesar da sua eficácia no alívio da dor provocada pelas metástases, ajuda na redução do consumo de analgésicos e na melhoria da qualidade de vida, no entanto, não apresentam resultados no que respeita ao aumento do tempo de sobrevivência dos doentes (Zustovich e Fabiani, 2014). O recente emissor α rádio-223 (^{223}Ra), é um radiofármaco bastante promissor dirigido para os locais de elevada renovação óssea associados às metástases ósseas, cujas características serão apresentadas seguidamente. Na Figura 15 é possível visualizar um esquema referente a todos os locais de ação dos agentes terapêuticos apresentados anteriormente (Hathaway, Baker e Sonpavde, 2015; Zustovich e Fabiani, 2014).

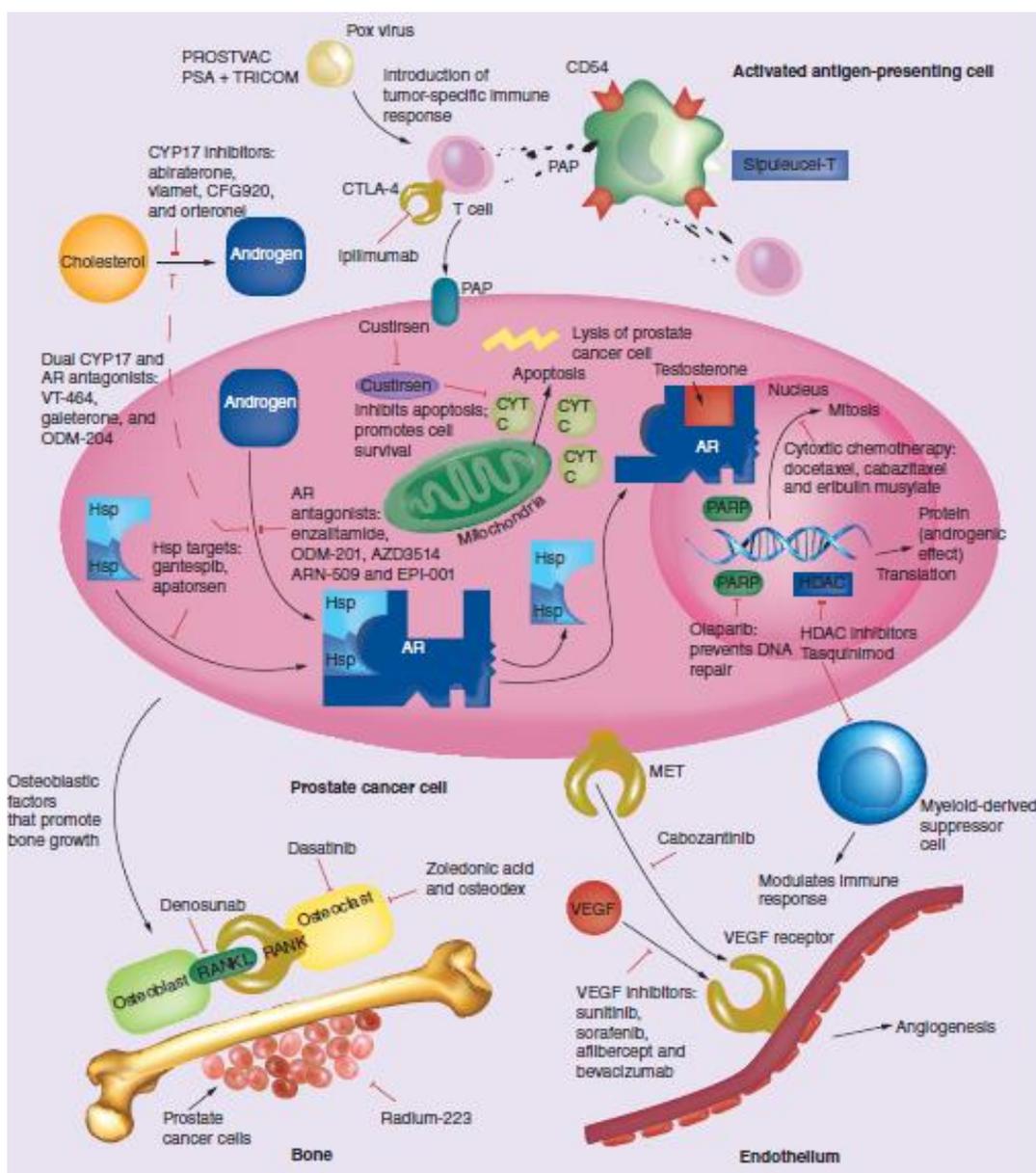


Figura 15: Terapias dirigidas para o CaPMRC e seus locais de ação. [Adaptado de (Hathaway, Baker e Sonpavde, 2015)]

1.4 ²²³Ra no tratamento do CPMRC

Xofigo® (Bayer Pharma, Berlin, Germany) é uma solução de dicloreto de rádio-223 (²²³Ra) para administração intravenosa em doentes com carcinoma da próstata metastático resistente à castração, sem metástases viscerais conhecidas, aprovado em 2013 pela EMA e FDA (El-Amm e Aragon-Ching, 2015; EMA, 2013) Aquando da produção tem uma atividade específica de 1100 kBq/mL. É um radiofármaco que emite partículas α citotóxicas que apresentam elevada afinidade para a matriz óssea. Com o tratamento verifica-se um aumento

do tempo de sobrevivência em 4 meses e uma diminuição da dor e dos eventos SREs (El-Amm e Aragon-Ching, 2015; Pandit-Taskar, Larson e Carrasquillo, 2014)

O isótopo mais comum e estável na natureza é o ^{226}Ra , com um período de semi-desintegração ($T_{1/2}$) de 1600 anos. O ^{223}Ra tem um $T_{1/2}$ de 11,4 dias e também pode ser encontrado na natureza, no entanto é muito menos comum. Este radiofármaco pode ser produzido artificialmente através do decaimento do actínio-227 ($T_{1/2}$ 21,7 anos) usando um sistema de gerador actínio-227-tório-227 ($^{227}\text{Ac}/^{227}\text{Th}$). ^{223}Ra decai em seis fases, visíveis na Figura 16, até chumbo-207, através de isótopos-filhos de curta duração, acompanhado de emissão de radiação distribuída pelas seguintes frações: 95,3% de partículas α , 3,6% de partículas β e 1,1% de radiação γ , com uma elevada emissão de energia (cerca de 28 MeV) (El-Amm e Aragon-Ching, 2015; Maffioli *et al.*, 2015).

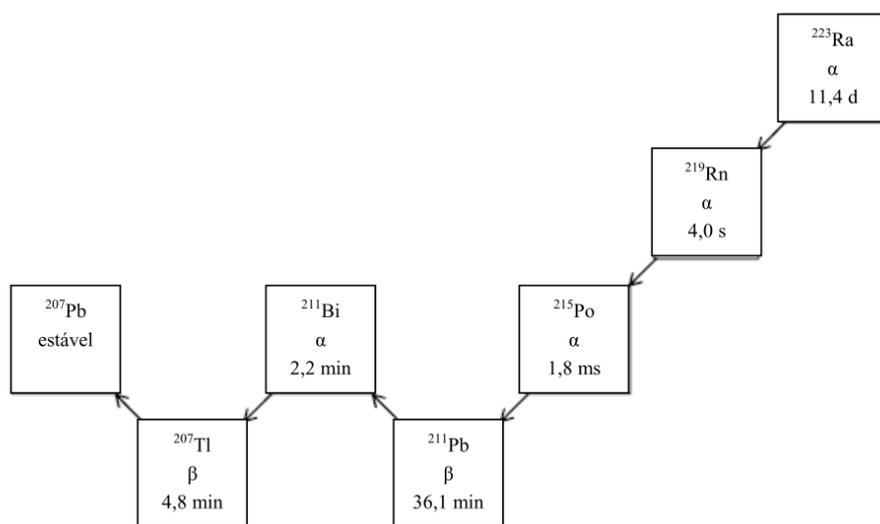


Figura 16: Esquema de decaimento do ^{223}Ra . [Adaptado de Infarmed]

O ^{223}Ra é um elemento alcalino-terroso e como tal apresenta propriedades para o osso similares aos elementos cálcio, estrôncio e bário. É aconselhada uma administração de uma injeção com a atividade de 55 kBq/kg de massa corporal com intervalos de quatro semanas, perfazendo o total de seis injeções. Ao ser administrado, concentra-se nos locais de lesão osteoblástica devido a inclusão na matriz de hidroxiapatite, onde substitui o cálcio durante o processo de formação óssea. O processo de intercalação do ^{223}Ra nas metástases ósseas ainda não se encontra completamente esclarecido, como se pode observar na Figura 17, as proteínas e mediadores envolvidos no processo ainda não são conhecidos. Nestes locais, o radiofármaco vai emitir as suas partículas que apresentam uma elevada LET e um reduzido alcance no tecido

(menos de 0,1 mm), comparativamente ao das partículas β , minimizando assim o tecido afetado. A quantidade de ^{223}Ra que não se liga ao osso (61% fica na zona óssea) é excretada do organismo, maioritariamente por via intestinal. Após 4h, apenas 4% da atividade injetada permanece no sangue sem captação significativa por outros órgãos e, passadas 24h resta somente 1% da atividade administrada. O ^{223}Ra é um isótopo que decai e não é metabolizado no organismo, não demonstrando toxicidade hematológica nem mielossupressão durante o tratamento (Liepe e Shinto, 2016; Maffioli *et al.*, 2015).

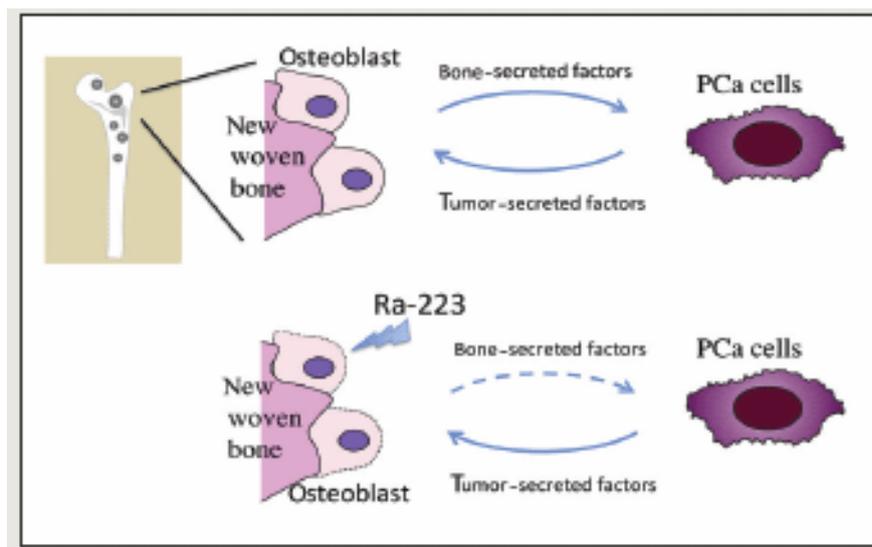


Figura 17: Mecanismo da atividade do ^{223}Ra nas metástases de CaPMRC.[Adaptado de (Tu, Bilen e Lin, 2015)]

A terapêutica com radiação ionizante tem como objetivo depositar uma dose de radiação elevada em todo o volume tumoral, de forma a induzir a morte celular no alvo, tendo sempre em conta a minimização de lesões nos tecidos envolventes. A dose absorvida pelas células é calculada sem ter em conta o tipo de radiação em uso, nem o material e a unidade do sistema internacional (SI) que a quantifica chama-se Gray (Gy). Contudo, também é relevante a dose equivalente (H_T) que é calculada com a ponderação dos diferentes tipos de radiação e a radiosensibilidade dos tecidos. A unidade do SI que a quantifica chama-se Sievert (Sv) (Joiner e Kogel, 2009).

A interação da radiação com a matéria promove a ionização de átomos e de moléculas que, por sua vez, inicia processos de reatividade química nas moléculas irradiadas que poderão causar danos biológicos. Estes danos biológicos variam de acordo com a radiosensibilidade das células o que, de acordo com a Lei de Bergonie e Tribondeau, significa que as células em

elevada atividade mitótica apresentam maior sensibilidade. Após desencadear a lesão físico-química, podem passar longos períodos de latência até ao aparecimento de danos biológicos, sendo comum o aparecimento tardio de sintomatologia. As interações da radiação com a células podem ser extremamente lesivas, em especial quando interage com o material genético ou com moléculas essenciais para a replicação e a manutenção celular (Kassis e Adelstein, 2005).

Os efeitos biológicos a nível celular provocados pela radiação podem ser diretos ou indiretos. Os efeitos diretos englobam danos no ADN, ARN ou outras moléculas relevantes para a célula (como proteínas ou fosfolípidos membranares) que, se não forem reparados, podem terminar em morte celular, em mutações ou em aberrações cromossómicas. Em relação aos efeitos indiretos, uma das moléculas mais importantes é a da água pois encontra-se em abundância no meio. A radiação ao interagir com esta molécula promove a radiólise da água que conduz à formação de radicais livres e de iões extremamente reativos quimicamente. Estes, por sua vez, podem combinar-se e formar peróxido de hidrogénio (H_2O_2) que é responsável por grande parte das lesões induzidas pela radiação e por stresse oxidativo indutor de morte celular. Após a agressão, a célula pode promover a ativação de várias vias de sinalização que visam o bloqueio do ciclo celular, mecanismos de reparação ou a indução de morte (Joiner e Kogel, 2009; McParland, 2010; Mendes, 2016; Podgorsak, 2005).

No caso do ^{223}Ra , a radiação α é dotada da capacidade de percorrer apenas num pequeno comprimento (<10 células) com elevada LET o que lhe permite provocar danos diretos e irreparáveis a nível da cadeia dupla de ADN. A elevada LET resulta numa maior eficácia biológica, comparativamente à emissão β , e dá origem a citotoxicidade independente da dose, da fase do ciclo celular e da concentração de oxigénio. Esta quebras nas duas cadeias do ADN vão ativar sistemas de reparação de danos no ADN que podem promover a reparação ou, caso isso seja impossível, a induzir a morte celular (Anderson, Subbiah e Rohren, 2014; Nilsson, 2016; Pandit-Taskar, Larson e Carrasquillo, 2014).

Objetivos

O carcinoma da próstata é a segunda neoplasia mais frequente no homem e a quinta causa de morte a nível mundial relacionada com o cancro. Entre os casos diagnosticados com esta patologia, o maior desafio em termos terapêuticos está associado ao cancro da próstata metastático resistente à castração. Entre as várias opções terapêuticas disponíveis no mercado, o uso do radiofármaco ^{223}Ra é, dentro da sua classe, o mais destacado, com evidências comprovadas de redução da dor e aumento do tempo de sobrevivência do doente (Parker *et al.*, 2013). O ^{223}Ra é um emissor predominantemente de partículas alfa, emitindo também partículas beta e radiação gama (Shirley e McCormack, 2014). Comporta-se como um análogo do cálcio e liga-se seletivamente ao osso, particularmente nas áreas de metastização, onde forma complexos com a hidroxiapatite. No entanto, os seus mecanismos de ação não estão completamente esclarecidos (Parker *et al.*, 2013).

O uso terapêutico do ^{223}Ra poderá alargar-se a outro tipo de tumores, nomeadamente ao osteossarcoma (OS). Estudos recentes demonstram a sua elevada eficácia como agente direcionado para o OS pelo mesmo mecanismo de associação à hidroxiapatite (Anderson e Rohren, 2015; Anderson, Subbiah e Rohren, 2014; Humm *et al.*, 2015). Como tal, o uso de uma linha de OS neste projeto torna-se uma mais-valia para comparação dos perfis de captação e para avaliação de eventuais moléculas que possam ser cruciais para a eficácia deste radiofármaco.

O radiofármaco $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ é um análogo do cálcio usado em cintigrafia óssea para a deteção de metástases ósseas em doentes de CPMRC. Devido à afinidade desta molécula pelas zonas de metástases ósseas e pelos iões de cálcio, comparável ao ^{223}Ra , é utilizado no nosso projeto como radiofármaco controlo para comparação dos estudos de cinética.

Assim, o propósito do projeto “*Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático. Estudo dos mecanismos de atuação.*” foi caracterizar os efeitos do ^{223}Ra em linhas celulares CaP e estudar o seu modo de atuação nas células tumorais. Com este intuito foram utilizadas diferentes metodologias de modo a alcançar os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o efeito do ^{223}Ra na sobrevivência celular das células de cancro da próstata;
- Avaliar a captação, a internalização e a retenção do ^{223}Ra nas linhas celulares PC3, LNCaP e MNNG/HOS;
- Comparar os perfis de captação e de retenção dos radiofármacos $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ e ^{223}Ra nas três linhas celulares.

Materiais e Métodos

O ^{223}Ra é um emissor predominantemente alfa que atua como um mímico do cálcio, ligando-se à hidroxiapatite do osso em zonas de elevada renovação óssea. No entanto, o processo de intercalação do ^{223}Ra nas metástases, as proteínas envolvidas e os mediadores ainda não se encontram completamente esclarecidos. O conhecimento do mecanismo de ligação, quer por ligação extracelular ou por internalização, e os danos provocados pelas partículas podem dar origem a novas abordagens terapêuticas ou permitir melhorar a eficácia terapêuticas deste radiofármaco.

Os estudos *in vitro* possibilitaram avaliar os efeitos das partículas alfa em células tumorais de cancro da próstata. Permitiram ainda avaliar a cinética dos radiofármacos nas células tumorais de CaP, e também nas células de OS, em termos de captação, internalização e retenção. Foi ainda possível estabelecer uma comparação da cinética entre dois radiotraçadores, o $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ e o ^{223}Ra .

3.1 Cultura celular

A cultura celular consiste no cultivo das células, aderentes em monocamada ou em suspensão, originárias de uma linha celular, cultura primária ou tecido. O conhecimento da morfologia celular, procedimentos básicos de cultura celular e técnicas assépticas rigorosas é essencial para a manutenção das culturas celulares *in vitro*, livres de qualquer tipo de contaminação.

Durante a realização deste projeto utilizaram-se duas linhas celulares humanas de cancro da próstata, a linha PC3 e a linha LNCaP, e uma linha celular humana de osteossarcoma a linha MNNG/HOS. As linhas celulares de CaP diferem na sensibilidade a androgénios e a estrogénios, sendo estes elementos fulcrais na carcinogénese do carcinoma da próstata (Tan *et al.*, 2014). A linha celular LNCaP (ATCC[®] CRL-1740[™]) expressa recetores hormonais, pelo que é hormono-dependente, contrariamente à linha celular PC3 (ATCC[®] CRL-1435[™]) que não expressa recetores hormonais. Por outro lado, diferem ainda na localização da origem, sendo a linha celular LNCaP obtida de uma metástase linfática e a linha celular PC3 de uma metástase óssea (Horoszewicz *et al.*, 1983; Kaighn *et al.*, 1979). A linha celular humana MNNG/HOS (ATCC[®] CRL-1547[™]) é originária de uma metástase óssea de OS (Luu *et al.*, 2005; Rhim *et al.*, 1975, 1977). As linhas celulares utilizadas foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC[®], Rockville, MD, E.U.A).

Aquando da receção, as células das linhas celulares foram descongeladas e propagadas em culturas aderentes, de acordo com as instruções do fornecedor, e mantidas numa atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de dióxido de carbono (CO_2) e a 37°C numa

incubadora Binder® (Binder, Alemanha). As células de CaP foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) suplementado com 100 µM de piruvato de sódio (Gibco I1360), 10% de soro bovino fetal (Sigma F7524) e 1% de antibiótico (Sigma A5955). A linha MNNG/HOS foi cultivada em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM (Sigma D5648), suplementados com 5% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *fetal bovine serum*), 1% de antibiótico e 0,25 mM de piruvato de sódio.

Para a realização dos estudos foi necessário preparar suspensões celulares das células em cultura aderente. Assim, removeu-se o meio de cultura e procedeu-se à lavagem das células com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) constituída por 137 mM de cloreto de sódio (Sigma S7653), 2,7 mM de cloreto de potássio (Sigma P9333), 10 mM de fosfato monossódico (Sigma S5011) e 1,8 mM de fosfato monopotássico (Sigma P0662), a pH 7,4. Seguidamente, descartou-se o PBS e incubaram-se as células com 2 mL de solução tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma T-4049) durante 3 a 5 minutos para o destacamento celular. Decorrido este tempo, inibiu-se a ação da tripsina adicionando 5 mL do respetivo meio de cultura e procedeu-se à determinação da concentração celular. Para tal, a uma amostra da suspensão celular adicionou-se igual volume de uma solução de azul de tripano (Sigma T0776) na diluição de 1:20 em água ultra-pura e contaram-se as células, com recurso a uma câmara de *neubauer* e a um microscópico ótico invertido (Motic AE31) com ampliação 100x. Após a contagem, retirou-se o volume necessário, centrifugou-se a suspensão celular a 1000 rpm durante 5 min (Heraeus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18,7cm), com o intuito de remover as células mortas, e adicionou-se o meio de cultura pretendido para os ensaios a realizar.

3.2 Ensaio Clonogénico

O ensaio clonogénico é uma técnica utilizada *in vitro* para avaliar a sobrevivência celular, com base na capacidade de uma única célula crescer e formar uma colónia. As colónias são definidas como um aglomerado de, pelo menos, 50 células (Franken *et al.*, 2006). Assim, este ensaio permite avaliar as agressões celulares induzidas pela radiação ionizante em termos de capacidade clonogénica, sendo considerado o *gold standard* para avaliação dos efeitos da radiação (Joiner e Kogel, 2009; Mendes, 2016; Strauss *et al.*, 2013).

De modo a irradiar as linhas celulares de CaP com o ^{223}Ra , foi preparada uma suspensão celular com uma concentração conhecida, no máximo 2×10^6 células/mL, e adicionada em poços de placas de 48 poços (*Sarstedt*).

Para a realização de cada ensaio, as células foram submetidas a irradiação interna por exposição ao ^{223}Ra , pela adição de uma atividade A_0 , com doses absorvidas e tempos previamente calculados, através da Equação 1:

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

Equação 1: Dose máxima absorvida pelas células (massa M) por irradiação interna, durante o tempo t.

onde D é a dose absorvida (Gy), A_0 a atividade inicial da fonte radioativa (mCi), t o tempo de irradiação (s), M a massa da amostra submetida a irradiação (kg), T_i o período de semidesintegração da porção i da cadeia de decaimento (s), \bar{E}_i a energia média por desintegração da porção i da cadeia de decaimento (eV) e α_i a fração de energia do decaimento. Os últimos três parâmetros enunciados representam valores tabelados específicos da radiação utilizada.

O procedimento de irradiação consistiu na adição de uma atividade constante (0,3 mCi) a um volume de suspensão celular também constante (1 mL) por um período de tempo de irradiação t , determinado pela equação 1, para obtenção de uma dose absorvida D por nós estabelecida. Os valores de dose absorvida definidos e os respetivos tempos de irradiação determinados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Tempo de irradiação celular calculado para irradiar 1 mL de suspensão celular em placas de 48 poços, usando uma atividade inicial de 0,3 mCi, para as respetivas doses absorvidas.

Dose (mGy)	Tempo (min)
0,25	0,87
0,5	1,92
0,75	3,08
1,00	4,50
2,00	11,00
3,00	19,00
4,00	27,00
6,00	43,00
8,00	60,00
10	76

Após o respetivo tempo de irradiação, retirou-se o volume correspondente ao número de células a utilizar no ensaio experimental e adicionou-se aos poços de placas de 6 poços (Sarstedt), de acordo com o apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Número de células semeadas por poço após irradiação, por dose e por linha celular, para realização do ensaio clonogénico.

Linha Celular	Dose (mGy)										
	C	0,25	0,50	0,75	1	2	3	4	6	8	10
PC3	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
LNCaP	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000

Seguidamente, ao número conhecido de células irradiadas (número de células semeadas) descrito na Tabela 3 adicionaram-se 3 mL de meio de cultura. Incubaram-se as células nas condições ótimas de crescimento das culturas celulares durante 12 a 20 dias para a linha celular LNCaP e 8 dias para a linha celular PC3. Após este tempo, contaram-se o número de colónias formadas. Para tal, removeu-se o meio de cultura e adicionaram-se a cada poço 2 mL de PBS (pH 7,4). De seguida fixaram-se as colónias adicionando 2 mL de metanol, durante 30 minutos. Passado este tempo descartou-se o metanol, deixaram-se secar as placas e posteriormente adicionaram-se 2 mL de uma solução de violeta de cristal a 0,5% em metanol e deixaram-se as placas em repouso durante 10 minutos. Por último, aspirou-se o corante em excesso e lavaram-se suavemente as placas por imersão em água tépida.

Após secagem completa das placas procedeu-se à contagem das colónias, o que permitiu calcular a eficiência da placa (PE, do inglês *plate efficiency*) e o fator de sobrevivência celular (FS), de acordo com as Equação 2 e Equação 3, respetivamente (Franken *et al.*, 2006; Mendes, 2016).

$$Eficiência\ da\ placa\ (%) = \frac{número\ de\ colónias\ contadas}{número\ de\ células\ semeadas} \times 100$$

Equação 2: Cálculo da eficiência da placa.

$$Fator\ de\ Sobrevivência\ (%) = \frac{PE\ das\ células\ irradiadas}{PE\ das\ células\ controlo} \times 100$$

Equação 3: Cálculo do fator de sobrevivência celular.

Com os resultados obtidos foi possível estabelecer curvas de dose-resposta que relacionam a dose de radiação com o fator de sobrevivência celular. Os dados experimentais obtidos foram tratados, com recurso ao software *GraphPad Prism 6*, sendo ajustados a um modelo linear-quadrático que seguiu a Equação 4, onde D corresponde à dose da radiação, α ao parâmetro linear e β ao parâmetro quadrático do ajuste (Joiner e Kogel, 2009).

$$\text{Fator de sobrevivência} = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

Equação 4: Cálculo do fator de sobrevivência segundo o ajuste linear-quadrático.

Em casos em que a resposta é condicionada apenas pela componente linear da equação, a componente β assume valores iguais a zero ($\beta=0$), sendo que o modelo de ajuste correspondeu a um modelo de um só alvo e um só toque. O ajuste ao modelo linear é feito segundo a Equação 5, em que D representa a dose da radiação e D_0 a dose letal média, sendo $D_0 = \frac{1}{\alpha}$ (Joiner e Kogel, 2009)

$$\text{Fator de sobrevivência} = e^{\frac{D}{D_0}}$$

Equação 5: Cálculo do fator de sobrevivência segundo o ajuste linear.

3.3 Estudo de cinética dos radiotraçadores

Os radiofármacos são compostos, que têm na sua composição um radionuclídeo, utilizados para a deteção, caracterização ou tratamento de doenças. A sua composição química pode ser muito simples, apresentando-se como uma forma iónica ou um simples radionuclídeo, como é o caso do ^{223}Ra , ou podem apresentar uma estrutura mais complexa na qual há a ligação de uma molécula interativa com o sistema fisiológico a um radionuclídeo, como é o caso do $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ (Strauss *et al.*, 2013).

Os radiofármacos utilizados para o diagnóstico ou para o seguimento da doença têm o propósito de emitir sinais físicos, como raios γ , detetáveis por equipamentos de obtenção de imagem medicina nuclear (cintigrafias) que, por sua vez, reproduzem uma imagem da distribuição do radiofármaco no organismo. No diagnóstico das metástases ósseas é comumente utilizado o radiofármaco $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$. O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ apresenta características físicas

ideais para utilização em diagnóstico com uma câmara de raios gama, nomeadamente, as propriedades físicas adequadas a uma boa qualidade de imagem, a energia da radiação gama emitida (140 keV) passível de atravessar os tecidos e permitir a obtenção de imagem dos tecidos e órgãos, o tempo de semi-desintegração (6,06 h) suficientemente reduzido para permitir a sua utilização, mas sem expor o doente a longos períodos de radiação, entre outras. O ^{99m}Tc -HMDP acumula-se nos locais de elevada renovação óssea através de absorção química pela superfície dos novos cristais de hidroxiapatite formados, local onde se liga ao cálcio existente. O radiofármaco é depois excretado do organismo, maioritariamente, por excreção renal (Strauss *et al.*, 2013; Vallabhajosula, Killeen e Osborne, 2010).

Os radiofármacos emissores de partículas β ou de partículas α também podem ser utilizados com o intuito terapêutico, quando dirigidos para tecidos alvo. Este é o caso do ^{223}Ra , predominantemente um emissor de partículas α , mas que também emite partículas β e raios γ . As partículas α estão associadas a uma LET elevada, compreendida entre os 80 e os 100 keV. O mecanismo do ^{223}Ra ainda não se encontra completamente esclarecido, sabendo-se que atua como mímico do cálcio e liga-se aos cristais de hidroxiapatite, nos locais de metástases ósseas (Abi-Ghanem, McGrath e Jacene, 2015; Strauss *et al.*, 2013).

De acordo com as características referidas, os dois radiofármacos em estudo apresentam seletividade para o cálcio, pelo que os seus mecanismos de captação e de internalização a nível das metástases ósseas poderão ser semelhantes. Como tal, considerou-se ser de elevada relevância utilizar o ^{99m}Tc -HMDP nos nossos estudos como radiotraçador controlo, com o intuito de permitir a comparação dos perfis cinéticos.

3.3.1 Estudos de Captação

Para a realização dos estudos de captação foram preparados frascos de 25 cm², cada um com uma concentração de 2×10^6 células/mL. Durante 60 minutos mantiveram-se as células em repouso na incubadora em condições basais, de modo a permitir a recuperação do stresse induzido pela ação química da tripsina. Após este tempo adicionou-se, a cada frasco, uma atividade de 25 $\mu\text{Ci/mL}$ de meio de ^{99m}Tc -HMDP ou 0,5 $\mu\text{Ci/mL}$ de meio de ^{223}Ra . A atividade utilizada em cada estudo foi definida com base na extrapolação de valores utilizados na prática clínica e em estudos realizados previamente pelo grupo. Os valores de atividade do ^{99m}Tc -HMDP utilizado são superiores ao do ^{223}Ra , tal como acontece na prática clínica em que, tipicamente, são administrados 18,9 mCi de hidroximetileno difosfonato (HMDP) e 94,5 μCi de dicloreto de rádio-233, para um adulto com 70kg. Após 5, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos

de incubação com o respetivo radiofármaco, retiraram-se 200 µL da suspensão celular para dois *ependorfs* contendo 500 µL de PBS gelado cada, de modo a realizar a experiência em duplicado. Seguidamente, as amostras foram centrifugadas a 10 000 rpm (Micro Star 12 VWR) durante 60 segundos para separar o *pellet* do sobrenadante. Recolheu-se o sobrenadante para tubos de RIA devidamente identificados, e procedeu-se a mais uma lavagem do *pellet* com igual volume de PBS gelado. Centrifugou-se novamente, para remover toda a atividade do radiofármaco que não se encontrasse ligado às células ou internalizado. As contagens da radiatividade de ambas as frações (*pellet* e sobrenadante) foram efetuadas em um contador de poço (Capintec, Inc. CRC, 25W) em contagens por minuto (CPM) e permitiram quantificar a percentagem de captação do ^{99m}Tc-HMDP e do ²²³Ra, segundo a Equação 6, e traçar a curva de captação ao longo do tempo, para cada linha celular e para cada radiotraçador.

$$\% \text{ Captação} = \frac{CPM_{\text{pellet}}}{CPM_{\text{pellet}} + CPM_{\text{sobrenadante}}} \times 100$$

Equação 6: Cálculo da percentagem de captação do radiofármaco

Os valores obtidos foram ajustados a um modelo matemático, traduzido pela Equação 7, de modo a relacionar a percentagem de captação (y) com o tempo (x) e permitir o cálculo do tempo máximo de influxo, tempo até ao qual ocorre toda a captação de radiofármaco conseguida pelas células.

$$y = a (1 - e^{-bx})$$

Equação 7: Fórmula para o cálculo da percentagem de captação (y) em função do tempo (x).

3.3.2 Estudos de captação na presença de verapamil

O verapamil é um bloqueador dos canais de cálcio utilizado tanto *in vivo* como *in vitro* (Seleem e Lashein, 2016). Com o intuito de avaliar o envolvimento ou a dependência dos canais de cálcio na captação dos radiofármacos análogos de cálcio, realizaram-se estudos de captação na presença deste inibidor. Assim, após a preparação dos frascos consoante a metodologia anteriormente descrita, incubaram-se as células com 180 µM de verapamil (Sigma V4629). Esta concentração foi baseada em estudos prévios desenvolvidos pelo grupo de investigação, sendo esta a concentração que garante a completa inibição dos canais de cálcio (Brito, 2014). Seguidamente realizaram-se estudos de captação segundo o protocolo apresentado anteriormente, com o intuito de traçar os gráficos de percentagem de captação

dos radiofármacos na presença do bloqueador verapamil, para cada linha celular. Os valores foram ajustados ao modelo matemático de acordo com a Equação 7.

3.3.3 Estudos de Internalização

O ^{223}Ra tem como alvo as zonas de renovação óssea adjacentes às metástases ósseas. Neste local emite partículas α de baixo alcance (inferior a 100 μm) mas com elevada LET que alcançam o microambiente tumoral e induzem quebras a nível das duas cadeias do ADN (Shore, 2015).

Os estudos de internalização foram realizados com o objetivo de determinar se a captação do ^{223}Ra ocorre por ligação extracelular às células de cancro da próstata ou se ocorre por internalização pelas mesmas. O protocolo experimental utilizado permitiu determinar se o radiofármaco se acumula no citosol ou no núcleo das células tumorais.

Para a realização destes estudos prepararam-se as suspensões celulares com concentração 2×10^6 células/mL e adicionaram-se 0,5 $\mu\text{Ci/mL}$ de ^{223}Ra . Após 5, 60 e 120 minutos de incubação, retiraram-se amostras de 200 μL da suspensão celular para dois *ependorfs* (designados por *ependorf 1*) contendo 500 μL de PBS gelado ($\text{pH}=7,4$; 4°C) cada, de modo a realizar a experiência em duplicado. Seguidamente, as amostras foram centrifugadas a 10 000 rpm durante 60 segundos para separar o *pellet* do sobrenadante. Recolheu-se o sobrenadante para os tubos correspondentes, devidamente identificados (designados por tubo 1). De seguida fez-se uma lavagem ácida do *pellet* para retirar a atividade adsorvida à superfície da célula, adicionando 500 μL de uma solução ácida (50 mM de glicina, 100 mM de NaCl a $\text{pH}=2,8$). Após 4 minutos agitou-se em vórtex a suspensão e centrifugou-se novamente. Recolheu-se o sobrenadante para o respetivo tubo (designado por tubo 2) e repetiu-se a lavagem ácida. Fez-se uma nova lavagem com PBS gelado e recolheu-se o sobrenadante para o tubo 2. Por último adicionaram-se 500 μL de NaOH (1N) a cada um dos *ependorfs* e após 5 minutos agitou-se em vortex e centrifugou-se. O sobrenadante foi separado do *pellet* para outro *ependorf* (designado por *ependorf 2*), considerando-se que o sedimento corresponde ao radiofármaco internalizado no núcleo e o sobrenadante ao radiofármaco internalizado a nível do citosol.

As contagens da radiatividade de todas as frações (*pellets* e sobrenadantes) foram efetuadas num contador de poço em CPM e permitiram quantificar a percentagem de captação do ^{223}Ra , segundo as Equação 8, Equação 9 e Equação 10, e traçar os gráficos de internalização para cada linha celular, segundo o ajuste do modelo matemático apresentado na Equação 7.

$$\% \text{ Adsorção à superfície} = \frac{CPM(\text{tubo } 2)}{CPM(\text{eppendorf } 1 \text{ e } 2) + CPM(\text{tubo } 2)} \times 100$$

Equação 8: Cálculo da percentagem de adsorção à superfície de RF.

$$\% \text{ Internalização no citosol} = \frac{CPM(\text{eppendorf } 1)}{CPM(\text{eppendorf } 1 \text{ e } 2) + CPM(\text{tubo } 2)} \times 100$$

Equação 9: Cálculo da percentagem de internalização no citosol de RF.

$$\% \text{ Captação} = \frac{CPM(\text{eppendorf } 2)}{CPM(\text{eppendorf } 1 \text{ e } 2) + CPM(\text{tubo } 2)} \times 100$$

Equação 10: Cálculo da percentagem de internalização no núcleo de RF.

3.3.4 Estudos de Retenção

Após a conclusão dos estudos de captação procedeu-se à realização de estudos de retenção que permitiram avaliar a quantidade de radiofármaco que fica retido no interior da célula, após o influxo máximo. Para levar a cabo estes estudos foi necessário determinar o tempo que cada linha celular demora a atingir a captação máxima de ^{223}Ra e de $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$, considerando-se este o tempo de incubação das células com o radiofármaco. A determinação deste parâmetro foi possível com recurso à Equação 7, tendo por base os valores de "half-time" (a) e rapidez de captação (b) calculados anteriormente. Os valores de tempo de incubação necessários para que fosse atingida a captação máxima para cada linha celular estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Tempo de influxo máximo calculado com base no "half-time" e na rapidez da captação.

Radiofármaco	Linha celular	Tempo de incubação (min)
$^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$	MNNG/HOS	23
	PC3	30
	LNCaP	50
^{223}Ra	MNNG/HOS	23
	PC3	50
	LNCaP	26

Assim, após a recuperação das células do processo de destacamento, adicionaram-se 25 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ ou 0,5 $\mu\text{Ci/mL}$ de ^{223}Ra . Incubaram-se as células com os

radiofármacos de acordo com os respectivos tempos apresentados na Tabela 4. Após este tempo, transferiram-se as suspensões celulares para *falcons* e centrifugaram-se a 1000 rpm durante 5 min, visando a separação das células do meio de cultura. Seguidamente, removeu-se o meio de cultura de modo a eliminar todo o radiofármaco que não estivesse ligado ou internalizado e adicionou-se igual volume de meio sem radiofármaco. Posteriormente, as células foram incubadas a 37°C e retiraram-se amostras aos 5, 30, 60, 90 e 120 minutos conforme o protocolo de captação descrito precedentemente. Após a contagem da radioatividade presente em cada uma das frações, determinou-se a percentagem de retenção utilizando a Equação 11, e traçaram-se as curvas de retenção dos radiofármacos ao longo do tempo, para cada linha celular.

$$\% \text{ Retenção} = \frac{CPM_{\text{pellet}}}{CPM_{\text{pellet}} + CPM_{\text{sobrenadante}}} \times 100$$

Equação 11: Cálculo da percentagem de retenção do RF.

Os resultados obtidos através destes estudos foram ajustados segundo um modelo matemático, traduzido pela Equação 12, de modo a relacionar a percentagem de captação (y) com o tempo (x), tempo até ao qual ocorre toda a captação de radiofármaco conseguida pelas células. Nesta equação foi introduzida uma nova variável r que corresponde à percentagem de retenção mínima do radiofármaco pelas células, permitindo assim a sua determinação.

$$y = a (1 - e^{-bx}) + r$$

Equação 12: Fórmula para o cálculo da percentagem de captação (y) em função do tempo (x) e de acordo com a retenção mínima (r).

3.4 Viabilidade Celular

Após a realização de cada estudo de cinética com o ^{223}Ra avaliou-se a viabilidade das células, de modo a garantir que o decorrer da experiência não provocava danos que tornassem as células inviáveis para o ensaio e, conseqüentemente, resultados não plausíveis. Para tal, recorreu-se ao método de exclusão do azul de tripano (Weisenthal *et al.*, 1983). Este método baseia-se no princípio de que as células vivas apresentam uma membrana celular intacta e, como tal, não permitem a entrada do azul de tripano, adquirindo uma coloração brilhante. Por

outro lado, as células não viáveis apresentam a membrana celular desintegrada, propriedade que as torna permeáveis ao corante e adquirem coloração azul (Strober, 2001).

Para determinar a viabilidade celular após os estudos de cinética, homogeneizaram-se volumes iguais de azul de tripano, na concentração de 0,02%, e de suspensão celular e adicionou-se a mistura numa câmara de *neubauer*. Contaram-se as células brilhantes e as células azuis utilizando um microscópio ótico invertido com uma ampliação 100x. A viabilidade celular foi determinada de acordo com a Equação 13.

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas}}{n^{\circ} \text{ células vivas} + n^{\circ} \text{ células mortas}} \times 100$$

Equação 13: Cálculo da percentagem de viabilidade celular.

3.5 Análise estatística

A análise estatística dos estudos de internalização foi realizada com recurso ao software IBM® SPSS® versão 22.0 (IBM Corporation, ARMONK, Nova Iorque, EUA). A normalidade de distribuição de variáveis foi analisada de acordo com o teste SHAPIRO-WILK e a homogeneidade de variâncias de acordo com o teste de Levene. No caso de variáveis com distribuição normal foram usados testes paramétricos e em caso contrário usaram-se testes não paramétricos. A comparação entre grupos foi feita de acordo com o teste Kruskal-Wallis e a comparação de médias usando o teste ANOVA (do inglês, *Analasys of variance*) de um fator. As comparações múltiplas foram feitas segundo o teste de Games-Howell (no caso de variâncias não presumidas) ou considerando a correção de Bonferroni (caso contrário). Uma significância de 0,05 foi considerada para todas as comparações.

As curvas de captação e de retenção apresentadas no trabalho resultam da modelação a sistemas de 1º grau resultando em equações exponenciais. O ajuste destas curvas aos dados experimentais foi realizado pelo método de otimização de Levenberg-Marquardt, tendo-se obtido além dos coeficientes de ajuste também o intervalo de confiança a 95% dos mesmos. O software usado para a realização deste procedimento foi o Matlab R2014a.

Resultados

Os materiais e métodos referidos no capítulo anterior foram utilizados com o objetivo de avaliar a sobrevivência celular das células das linhas celulares de carcinoma da próstata após irradiação interna com o ^{223}Ra , e estudar a cinética dos radiotraçadores, recorrendo para tal a ensaios e a técnicas de medicina nuclear, de bioquímica e de biologia celular e molecular. Os resultados obtidos encontram-se descritos neste capítulo.

4.1 Avaliação da sobrevivência celular

A radiação ionizante usando partículas alfa é caracterizada por induzir danos a nível da dupla cadeia de DNA, comprometendo a viabilidade celular. O ensaio clonogénico permitiu avaliar os efeitos da irradiação interna com o radiofármaco ^{223}Ra nas células de linhas celulares de cancro da próstata metastático, PC3 e LNCaP, a nível da sobrevivência celular.

A Figura 18 representa a curva de sobrevivência das células da linha celular LNCaP, após exposição a doses de radiação até 8 mGy. A curva de sobrevivência celular foi estabelecida de acordo com o modelo linear quadrático (Tabela 5), tendo sido obtido um DL_{50} de 1,41 mGy. Os dados obtidos mostraram que quanto maior a dose de radiação, menor o fator de sobrevivência.

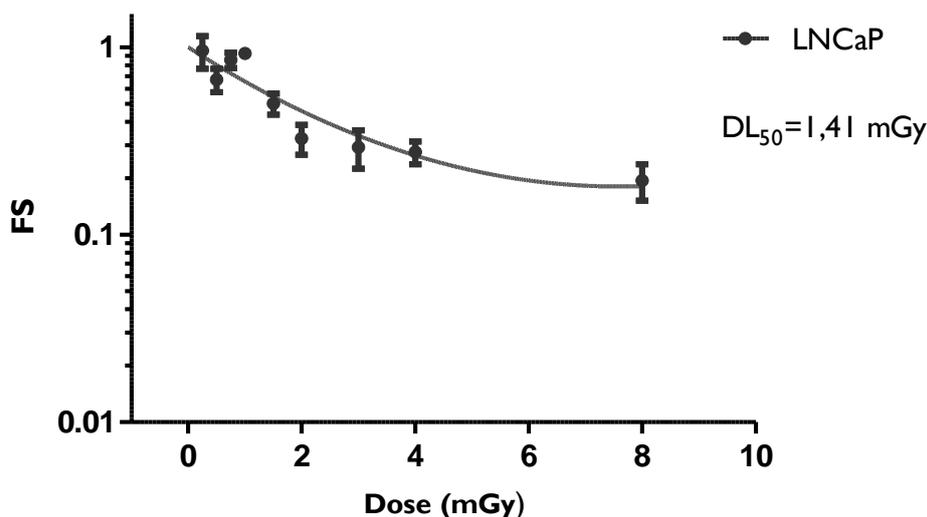


Figura 18: Curvas de sobrevivência celular obtidas em resposta à irradiação interna das células da linha celular LNCaP com ^{223}Ra . A sobrevivência celular foi determinada através do ensaio clonogénico. Os pontos experimentais correspondem à média e ao erro padrão de, pelo menos, quatro ensaios independentes. A curva representa o ajuste à melhor função.

A Figura 19 representa a curva de sobrevivência da linha celular PC3, após exposição a doses de radiação até 10 mGy. A curva de sobrevivência celular foi estabelecida de acordo com o modelo linear (Tabela 5), tendo sido obtido um valor de DL_{50} de 4,22 mGy.

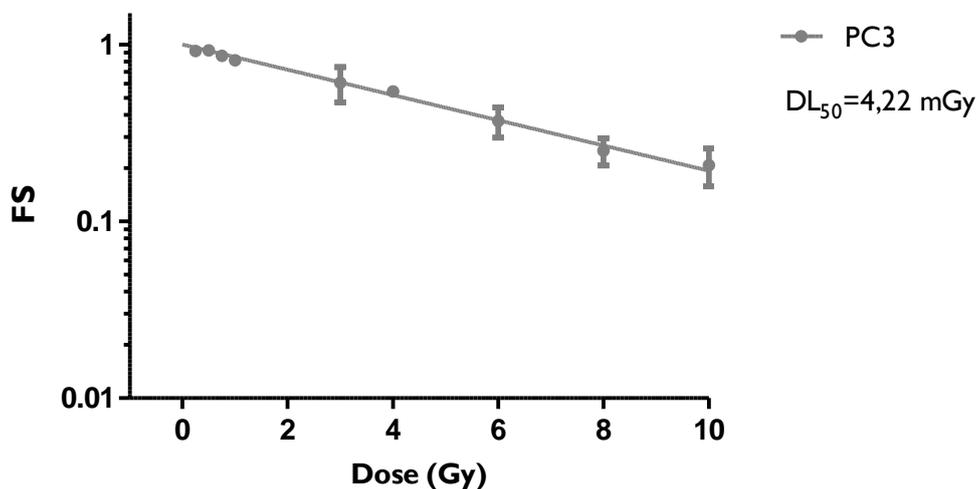


Figura 19: Curvas de sobrevivência celular obtidas em resposta à irradiação interna das células da linha celular PC3 com ^{223}Ra . A sobrevivência celular foi determinada através do ensaio clonogénico. Os pontos experimentais correspondem à média e ao erro padrão de, pelo menos, sete ensaios independentes. A curva representa o ajuste à melhor função.

A dose letal média (DL_{50}) e os respetivos parâmetros calculados através dos modelos de agressão apropriados, para cada uma das linhas celulares, encontram-se apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Modelos de agressão celular e doses letais médias calculadas após irradiação interna das células das linhas celulares com ^{223}Ra com doses entre 0,25 mGy e 10 mGy.

Linha Celular	P	E ± EP	R ²	α/β	DL ₅₀ mGy	IC mGy	MAC
LNCaP	α	0,451 ± 0,044	0,641	15,7	1,41	1,169	1,789
	β	0,030 ± 0,008					
PC3	α	0,164 ± 0,008	0,832	-	4,22	3,833	4,683
	β	--					

Legenda: P, parâmetro; E, estimador; EP, erro-padrão; R², coeficiente de determinação; DL₅₀, dose letal média; IC, intervalo de confiança; MAC, modelo de agressão celular.

De um modo geral, verificou-se que a irradiação com baixas doses de ^{223}Ra (na ordem dos mGy) induziu uma diminuição da sobrevivência celular em ambas as linhas celulares. Esta resposta apresentou-se dependente da dose de radiação e da linha celular em estudo.

As células da linha celular LNCaP foram mais radiosensíveis, pois apresentaram um DL_{50} de 1,41 mGy (IC95%: 1,169-1,789) significativamente inferior comparativamente com as células da linha celular PC3, que apresentaram um DL_{50} de 4,22 mGy (IC95%: 3,833-4,683).

4.2 Estudos de cinética dos radiotraçadores

Após se ter verificado que a incubação com o radiofármaco ^{223}Ra diminuiu a sobrevivência celular, constituiu objetivo importante do trabalho esclarecer o mecanismo de ação deste radiofármaco. Para tal, foi avaliada a cinética deste radiotraçador, com recurso a estudos de captação, de captação na presença de um bloqueador dos canais de cálcio, de internalização e de retenção. Os referidos estudos foram realizados nas células das linhas celulares LNCaP, PC3 e MNNG/HOS com os radiofármacos ^{223}Ra e $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$, até um tempo máximo de 180 minutos.

4.2.1 Estudos de captação

Os gráficos das figuras seguintes apresentam os resultados obtidos, para a captação percentual de ^{223}Ra e de $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ pelas células das linhas celulares PC3, LNCaP e MNNG/HOS.

De acordo com o gráfico da Figura 20, verificou-se que as células PC3 apresentaram maior captação do radiofármaco ^{223}Ra em comparação com o $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$, tendo sido atingida aos 4,94 minutos metade da captação máxima do ^{223}Ra . No que diz respeito ao valor da captação máxima, as células desta linha celular atingem 1,43% (IC95%: 1,33 – 1,53). Em relação ao radiofármaco $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$, a captação máxima apresentou um valor de 0,18% (IC95%: 0,17-0,18), verificando-se que aos 2,88 minutos foi atingida metade desta captação (Tabela 6). Assim, as células PC3 apresentaram valores significativamente superiores para a captação do radiofármaco ^{223}Ra . Após atingir o máximo, o perfil de captação dos radiofármacos permaneceu constante.

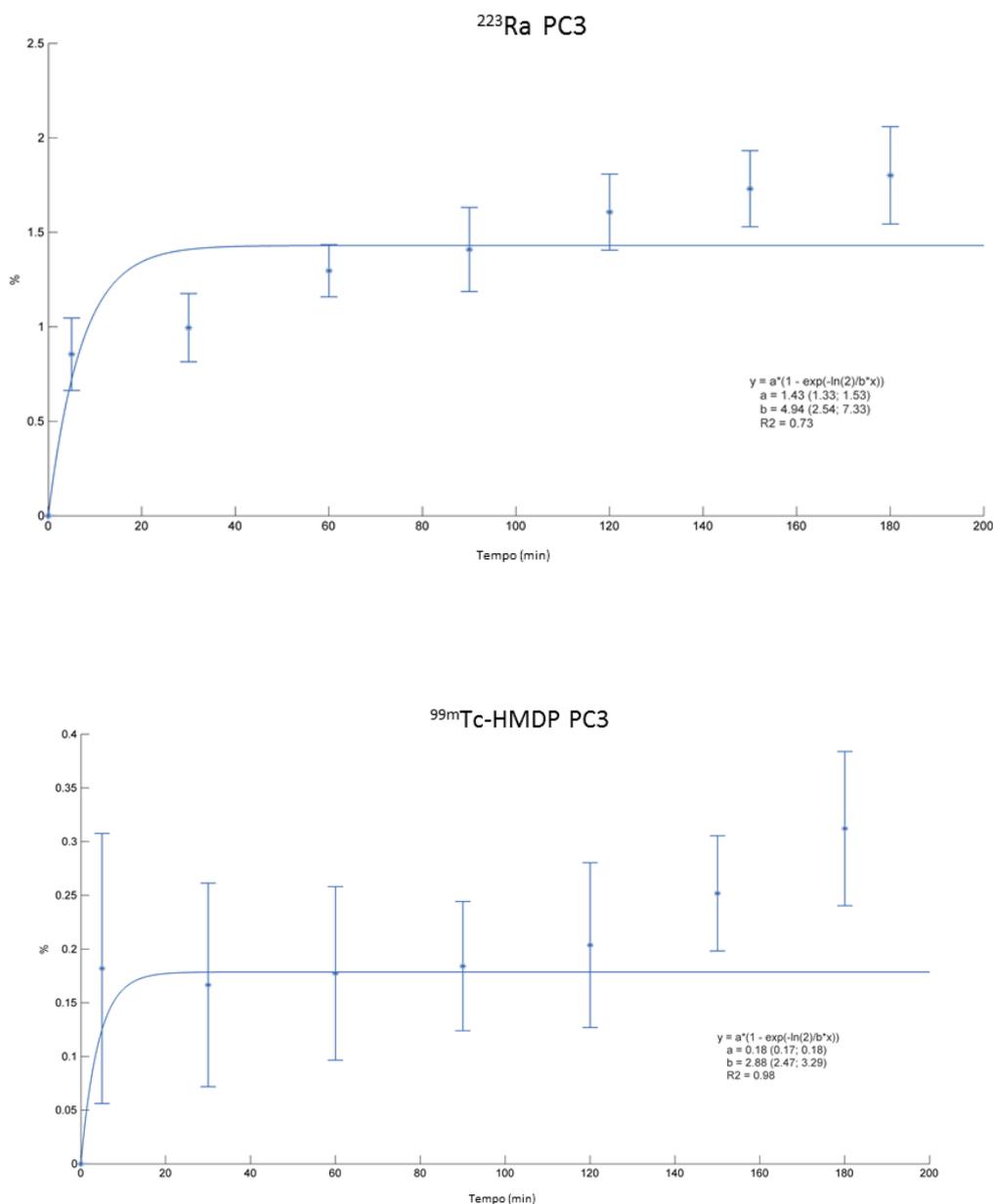


Figura 20: Perfil de captação do ^{223}Ra (em cima) e do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP (em baixo) pelas células da linha celular PC3. Os resultados expressam a média e desvio-padrão de, pelo menos, sete ensaios independentes, realizados em duplicado. A curva representa o melhor ajuste matemático aos pontos experimentais.

De acordo com o gráfico da Figura 21, verificou-se que, também, as células LNCaP apresentaram uma captação significativamente maior do radiofármaco ^{223}Ra em comparação com o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP, tendo sido atingida aos 2,64 minutos metade da captação máxima. A captação máxima de ^{223}Ra atingida foi de 1,39% (IC95%: 1,31-1,48). No que diz respeito ao radiofármaco $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP, a captação máxima atingida foi de 1,09% (IC95%: 1,06-1,11). Metade desta captação foi atingida aos 4,80 minutos (Tabela 5). Após alcançar a captação máxima, o influxo de ambos os radiofármacos permaneceu constante.

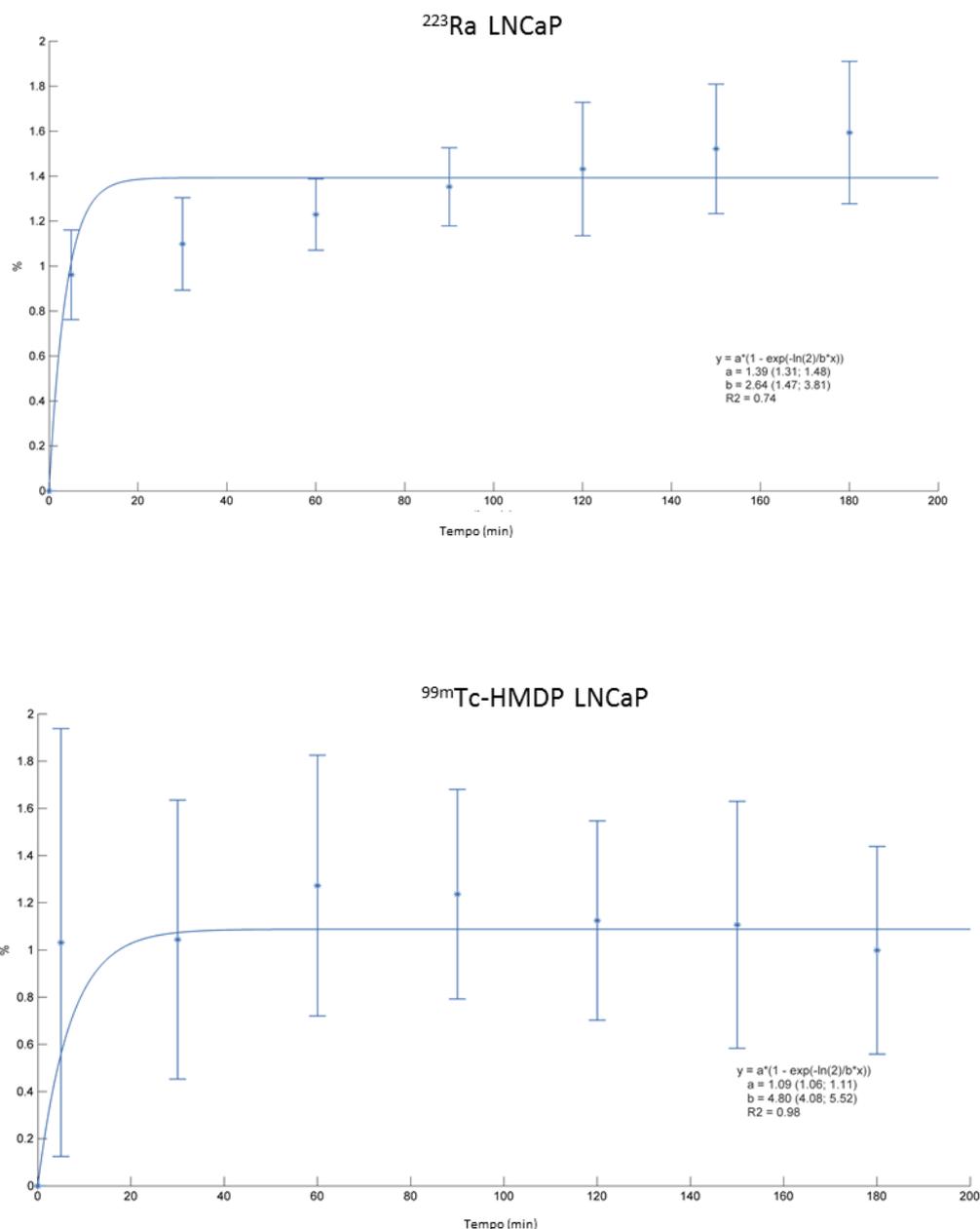


Figura 21: Perfil de captação do ²²³Ra (em cima) e do ^{99m}Tc-HMDP (em baixo) pelas células LNCaP. Os resultados expressam a média e desvio-padrão de, pelo menos, seis ensaios independentes, realizados em duplicado. A curva representa o melhor ajuste matemático aos pontos experimentais.

Na Figura 22 está representado o gráfico onde é possível observar a captação dos radiofármacos ²²³Ra e ^{99m}Tc-HMDP nas células da linha celular MNNG/HOS. Esta linha celular mostrou ter um perfil semelhante ao das linhas celulares de cancro da próstata, apresentando uma maior captação, com significância, do radiofármaco ²²³Ra, cujo valor é 0,96% (IC95%: 0,90-1,01) em comparação com o ^{99m}Tc-HMDP, de valor 0,17% (IC95%: 0,16-0,19). No que diz respeito ao ²²³Ra, metade do valor foi atingido aos 2,33 minutos (Tabela 6). Quanto ao radiofármaco ^{99m}Tc-HMDP, a metade da captação máxima foi atingida aos 2,26 minutos, após

o início do estudo. Após alcançar a captação máxima, o influxo de ambos os radiofármaco manteve-se tendencialmente constante.

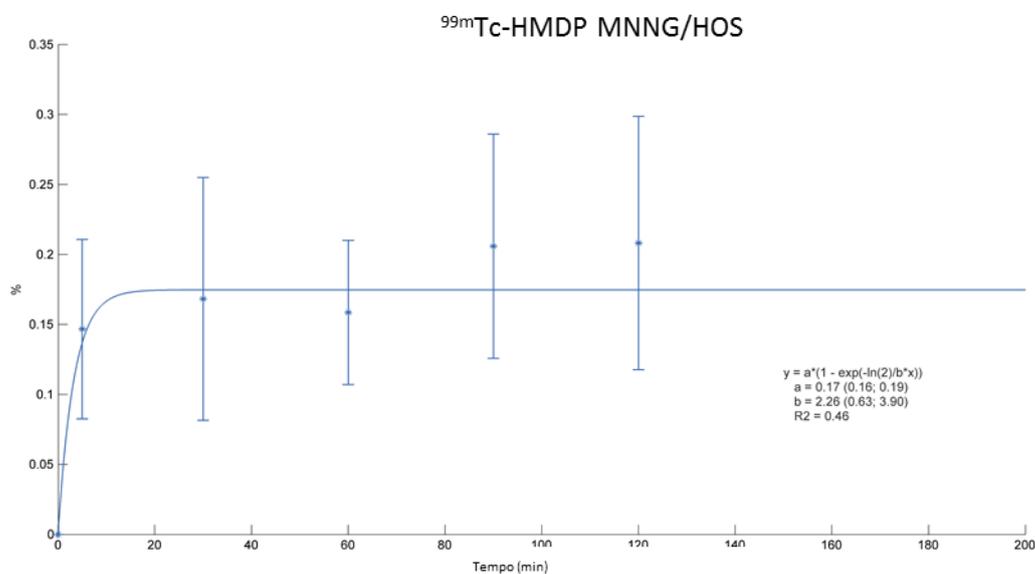
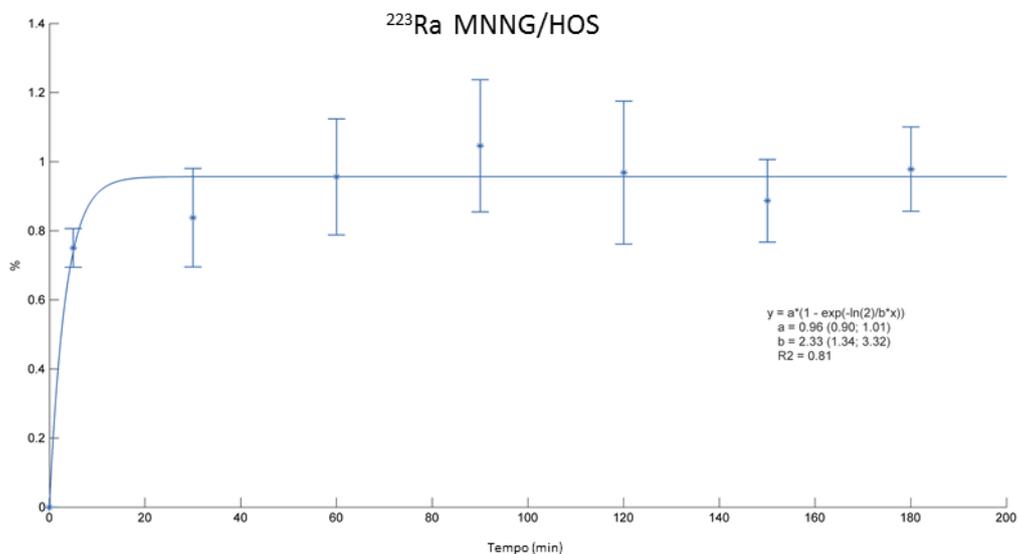


Figura 22: Perfil de captação do ²²³Ra (em cima) e do ^{99m}Tc-HMDP (em baixo) pelas células MNNG/HOS. Os resultados expressam a média e desvio-padrão de, pelo menos, cinco ensaios independentes, realizados em duplicado. A curva representa o melhor ajuste matemático aos pontos experimentais.

Com base nos parâmetros obtidos, nomeadamente, a rapidez de captação, o “*half-time*” (tempo até atingir metade da captação máxima) e a captação máxima, e de acordo com a

Equação 7 apresentada anteriormente na descrição da metodologia, foi possível determinar o tempo de influxo máximo dos dois radiofármacos para cada linha celular. Estes valores apresentam-se resumidos na Tabela 6.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 6 e na Figura 23, é possível constatar uma captação significativamente superior de ^{223}Ra entre as várias linhas celulares, com captação máxima de 1,43% (IC95%: 1,33 – 1,53) para as células PC3.

Analisando os valores de captação do radiofármaco $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$, constata-se que este é notavelmente captado em maior percentagem pelas células da linha celular LNCaP, apresentando uma captação máxima de 1,09% (IC95%: 1,06-1,11), significativamente superior quando comparada com a das células PC3, cujo valor é 0,18% (IC95%: 0,17-0,18) e a das células MNNG/HOS que é 0,17% (IC95%: 0,16-0,19).

Pela análise destes resultados, são ainda visíveis diferenças no perfil cinético de captação do radiofármaco ^{223}Ra pelas três linhas celulares, observando-se que apesar da captação máxima ser superior nas células da linha celular PC3, o tempo de influxo máximo é aproximadamente o dobro (49 minutos) comparativamente com o das células das linhas celulares LNCaP (26 minutos) e MNNG/HOS (23 minutos).

Tabela 6: Cálculo do tempo de influxo máximo com base no "half-time" e na rapidez da captação dos radiofármacos ^{223}Ra e $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ nas linhas celulares PC3, LNCaP e MNNG/HOS.

Radiofármaco	Linha Celular	Parâmetro a (captação máxima, %)			"half-time" (min)			Tempo de influxo máximo (min)
		Média	IC95%		Média	IC95%		
$^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$	PC3	0,18	0,17	0,18	2,88	2,47	3,29	29
	LNCaP	1,09	1,06	1,11	4,80	4,06	5,52	48
	MNNG/HOS	0,17	0,16	0,19	2,26	0,63	3,90	23
^{223}Ra	PC3	1,43	1,33	1,53	4,94	2,54	7,33	49
	LNCaP	1,39	1,31	1,48	2,64	1,47	3,81	26
	MNNG/HOS	0,96	0,90	1,01	2,33	1,34	3,32	23

De modo a facilitar a comparação da captação de cada radiofármaco nas três linhas celulares, traçou-se o gráfico da Figura 23.

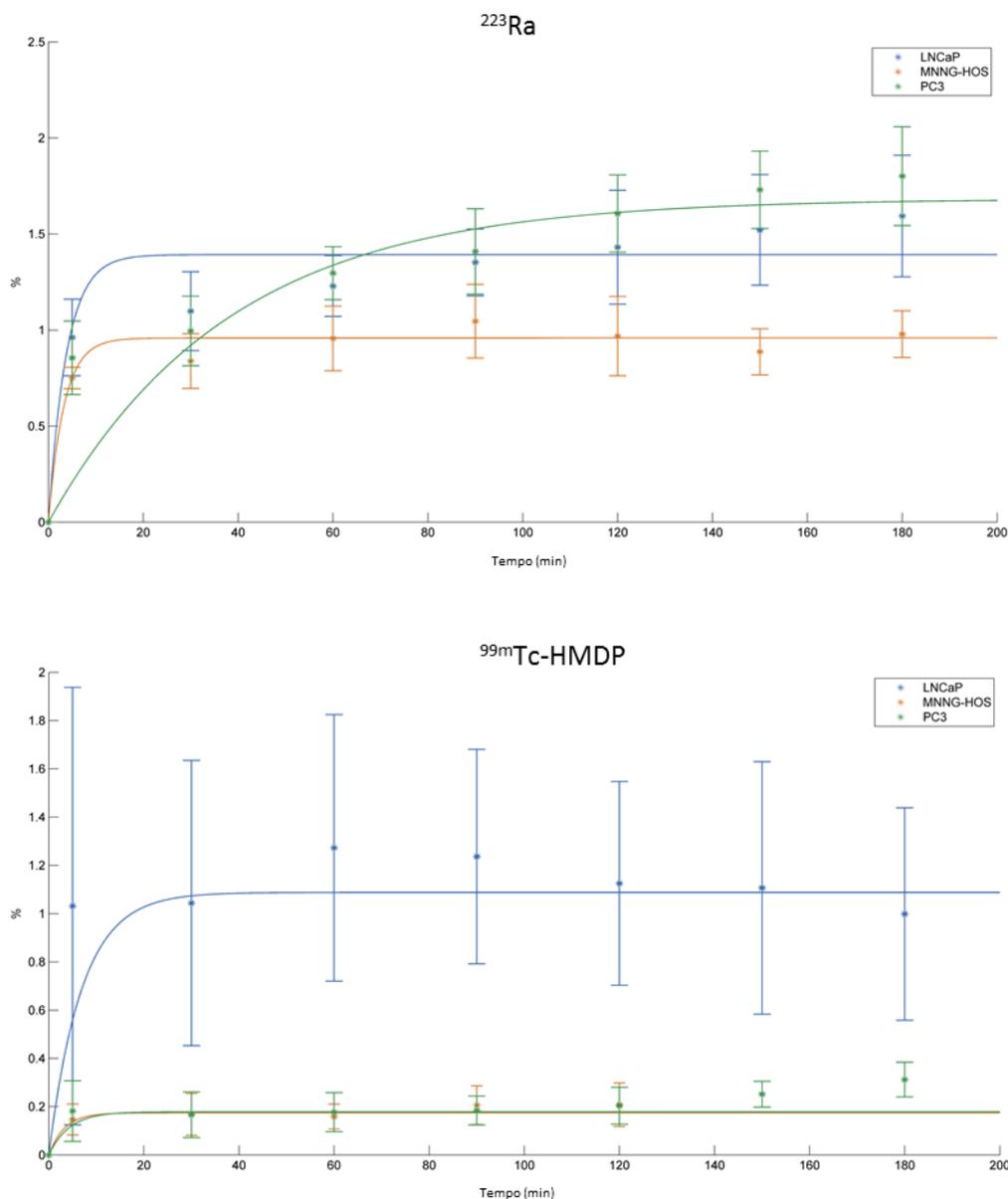


Figura 23: Perfil de captação do ^{223}Ra (em cima) e do $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ (em baixo) pelas células das três linhas celulares em estudo. Os resultados expressam a média e o desvio-padrão de, pelo menos, 5 ensaios independentes, realizados em duplicado. A curva representa o melhor ajuste matemático aos pontos experimentais. As linhas celulares PC3, LNCaP e MNGG/HOS encontram-se representadas no gráfico com as cores verde, azul e vermelho, respetivamente.

Após a realização de cada ensaio, aos 180 minutos, foi avaliada a viabilidade celular pelo método de exclusão do azul tripano. Os resultados apresentados na Figura 24 demonstraram uma viabilidade superior a 90% nas células das linhas celulares PC3 e MNGG/HOS. A linha celular LNCaP apresentou uma viabilidade inferior às anteriores, com um valor de 69%.

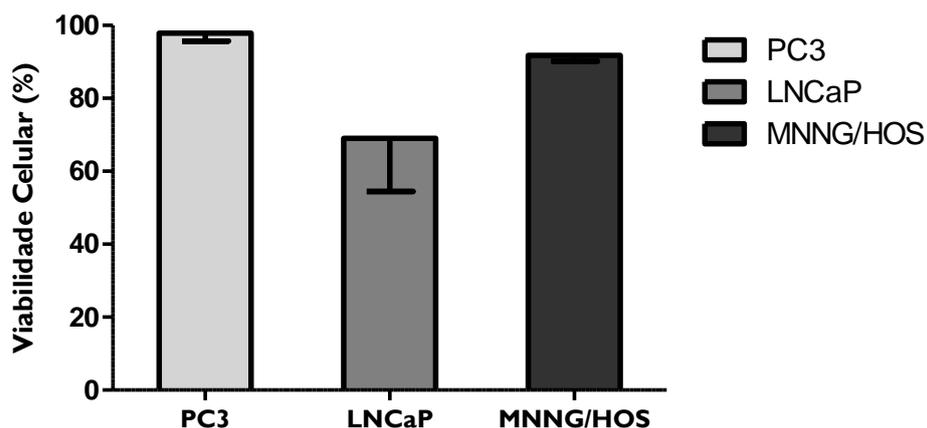


Figura 24: Viabilidade celular, aos 180 minutos, após a realização de estudos de captação do ^{223}Ra . Os valores foram obtidos pelo método de exclusão de azul tripano, através de uma razão entre o número de células vivas e o número total de células (vivas e mortas). Os resultados expressam a média e o desvio-padrão de, pelo menos, 6 ensaios independentes, realizados em duplicado.

4.2.2 Estudos de captação na presença de verapamil

Os gráficos da Figura 25 apresentam os resultados obtidos para a captação de ^{223}Ra e de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HM DP pelas células das linhas celulares PC3, LNCaP e MNNG/HOS, na presença do bloqueador dos canais de cálcio, o verapamil. Os estudos decorreram durante 120 minutos.

Segundo os dados dos gráficos da Figura 25 e da Tabela 7, verificou-se uma diminuição significativa da captação máxima de ^{223}Ra pelas células da linha celular PC3 que passou de 1,43% (IC95%: 1,33 – 1,53) para 0,96% (IC95%: 0,89-1,02) na presença de verapamil, com redução do *half-time* de 4,94 minutos (Tabela 6) para 1,64 minutos. O mesmo se verificou para as células das outras linhas celulares, com diminuições estatisticamente significativas da captação máxima que passou de 1,39% (IC95%: 1,31-1,48) para 1,29% (IC95%: 1,27-1,30), nas células LNCaP, e de 0,96% (IC95%: 0,90-10,01) para 0,82% (IC95%: 0,76-0,88) nas células MNNG/HOS.

Por outro lado, nos estudos com o radiofármaco $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HM DP verificou-se que na presença de verapamil houve uma redução estatisticamente significativa dos valores de captação máxima atingidos pelas células da linha celular LNCaP, que passou de 1,09% (IC95%: 1,06-1,11) sem verapamil, para 0,39% (IC95%: 1,27-1,30) com verapamil, e uma redução do *half-time* de 4,80 minutos (sem verapamil) para 3,03 minutos (com verapamil). Nas células da linha celular PC3 a presença de verapamil não influenciou os valores de captação máxima,

contudo provocou uma diminuição no tempo ao qual é alcançado metade desta captação máxima (0,17%), o qual passou de 2,88 para 0,94 minutos e, conseqüentemente, uma diminuição no tempo de influxo máximo.

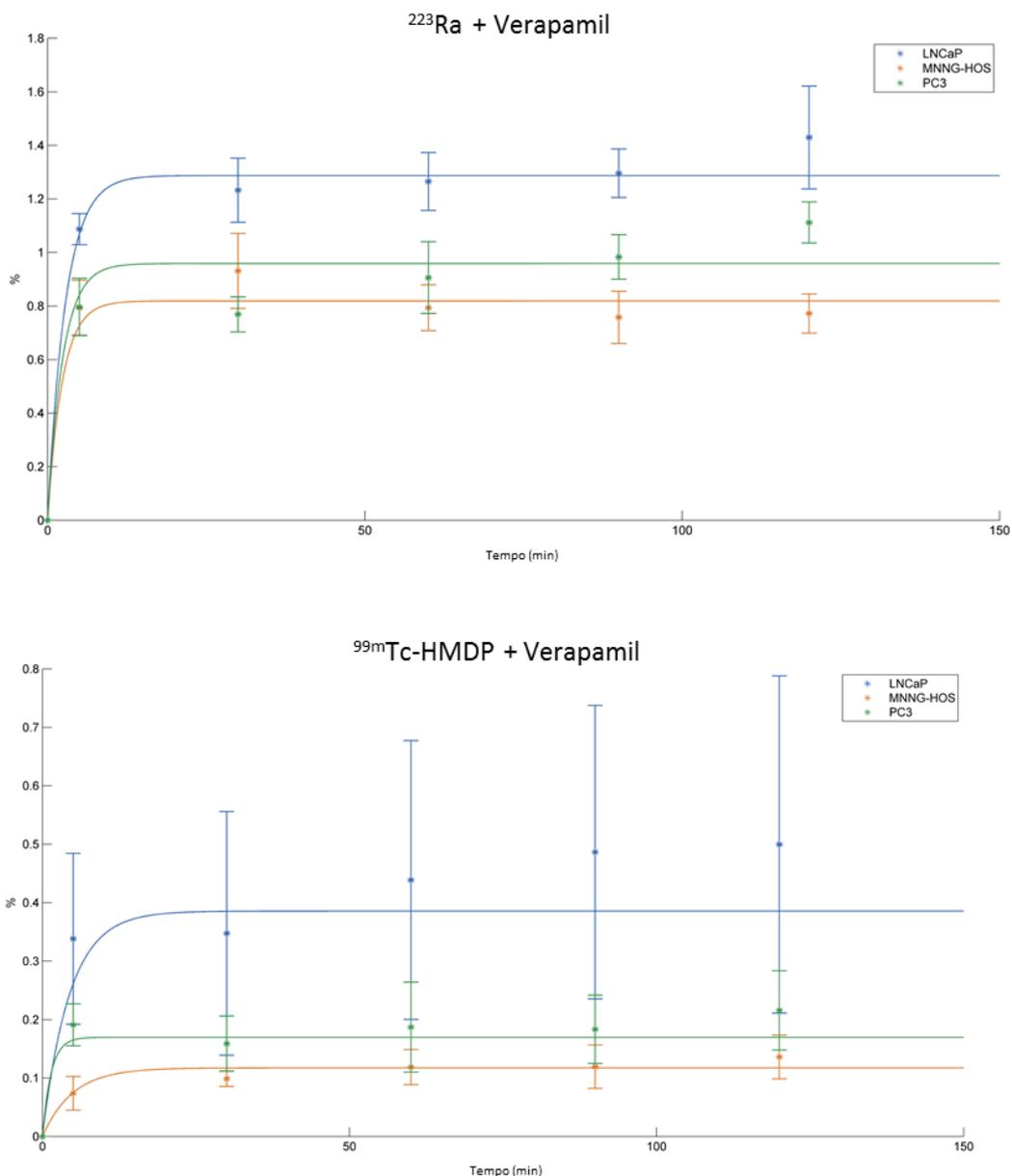


Figura 25: Perfil de captação do ^{223}Ra (em cima) e do $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ (em baixo) pelas células das três linhas celulares em estudo, na presença de $180 \mu\text{M}$ de verapamil. Os resultados expressam a média e desvio-padrão de, pelo menos, 4 ensaios independentes, realizados em duplicado. A curva representa o melhor ajuste matemático aos pontos experimentais.

Com base nos parâmetros obtidos, nomeadamente, a rapidez de captação, o “half-time” (tempo até atingir metade da captação máxima) e a captação máxima, e de acordo com a

Equação 7 apresentada anteriormente na descrição da metodologia, foi possível determinar o tempo de influxo máximo de cada radiofármaco na presença do bloqueador, apresentado na Tabela 7.

Tabela 7: Cálculo do tempo de influxo máximo com base no "half-time" e na rapidez de captação dos radiofármacos ^{223}Ra e $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$, na presença de verapamil.

Radiofármaco	Linha Celular	Parâmetro a (captação máxima, %)			"half-time" (min)			Tempo de influxo máximo (min)
		Média	IC95%		Média	IC95%		
$^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$	PC3	0,17	0,15	0,19	0,94	0	3,92	9
	LNCaP	0,39	0,29	0,48	3,03	0	7,40	30
	MNNG/HOS	0,12	0,10	0,13	3,40	1,08	5,72	34
^{223}Ra	PC3	0,96	0,89	1,02	1,64	0,70	2,59	16
	LNCaP	1,29	1,27	1,30	1,92	1,73	2,11	19
	MNNG/HOS	0,82	0,76	0,88	1,60	0,55	2,65	16

A viabilidade celular foi avaliada, aos 120 minutos, através do método de exclusão do azul tripano. Os resultados apresentados na Figura 26 demonstraram que no final dos estudos de captação com o inibidor, a viabilidade celular se manteve superior a 75% em todas as linhas celulares.

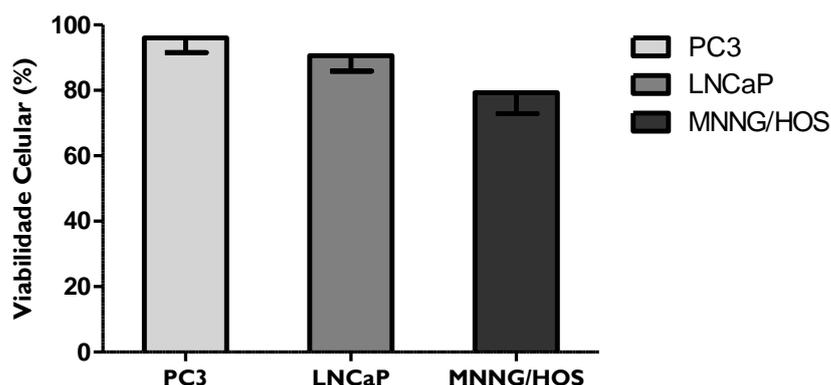


Figura 26: Viabilidade celular, aos 120 minutos, após a realização de estudos de captação do ^{223}Ra , na presença de $180\ \mu\text{M}$ de verapamil. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do azul tripano, e calculada através da razão, em percentagem, entre o número de células vivas e o número total de células (vivas e mortas). Os resultados expressam a média e o desvio-padrão de, pelo menos, seis ensaios independente realizados em duplicado.

4.2.3 Estudos de internalização

Os ensaios anteriores evidenciaram a captação do radiofármaco ^{223}Ra pelas células de linhas celulares de cancro da próstata e de osteossarcoma. De acordo com os resultados obtidos, e dada a falta de conhecimento acerca do modo de ação do ^{223}Ra , considerou-se importante analisar se a captação do radiofármaco ocorria por internalização do mesmo pelas células ou por adsorção à superfície, devido a ligações entre o radiofármaco e a superfície das células. Aprofundando ainda mais este estudo, examinou-se se a internalização ocorreria com acumulação do radiofármaco no citosol ou no núcleo.

Com recurso aos estudos de internalização foi possível determinar as percentagens de radiofármaco que ficou adsorvido à superfície, e as percentagens do que é internalizado e acumulado ao nível do citosol ou do núcleo celular. Estes resultados encontram-se resumidos na Figura 27. Verificou-se, de um modo geral, que a percentagem de radiofármaco internalizado pela célula é superior à percentagem adsorvida à sua superfície, em todas as linhas celulares em estudo.

Para a linha celular PC3, existe um aumento significativo ($p < 0,05$) da percentagem de internalização do ^{223}Ra no citosol que passou de $34,12 \pm 2,29\%$ aos 5 minutos, para $40,65 \pm 2,24\%$ aos 120 minutos, observando-se em paralelo uma diminuição da internalização no núcleo que passou de $31,29 \pm 3,82\%$ para $27,07 \pm 1,29\%$, aos mesmos tempos.

A percentagem de radiofármaco internalizado no núcleo e no citosol, pelas células da linha celular LNCaP, após 60 minutos foi de $28,34 \pm 1,98\%$ e de $33,25 \pm 3,47\%$ respetivamente, enquanto a percentagem de adsorção à superfície foi de $38,41 \pm 5,24\%$.

Para as células da linha celular MNNG/HOS, a percentagem de radiofármaco internalizado no núcleo e no citosol após 60 minutos foi de $30,30 \pm 4,45\%$ e de $30,65 \pm 4,67\%$ respetivamente, enquanto a percentagem de adsorção à superfície foi de $39,04 \pm 3,22\%$.

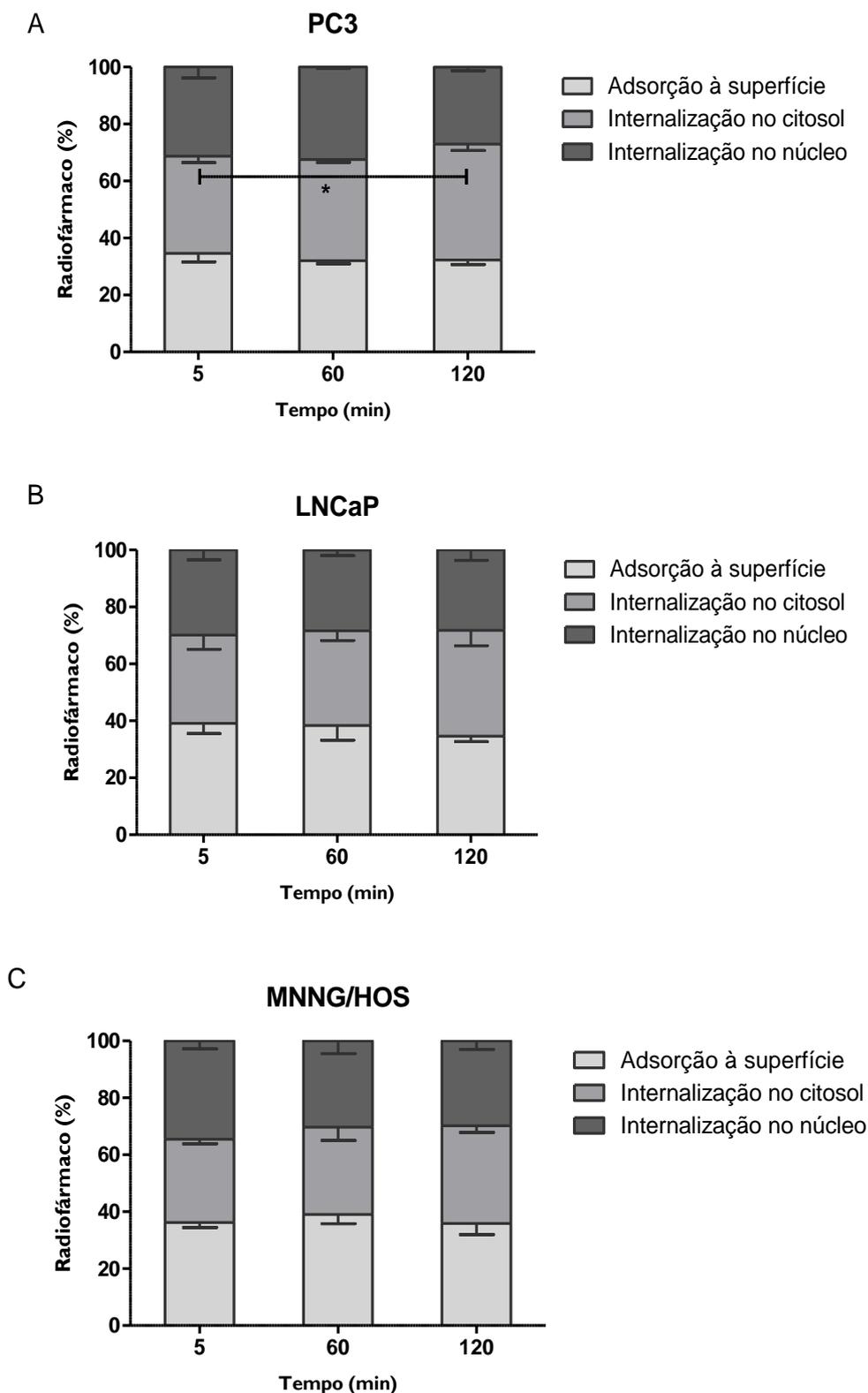


Figura 27: Internalização do radiofármaco ^{223}Ra pelas células das linhas celulares PC3, LNCaP e MNNG/HOS, após 5, 60 e 120 minutos. Os resultados estão expressos em percentagem e representam a média e o desvio padrão de, pelo menos, quatro ensaios independentes, realizados em duplicado. As diferenças significativas estão apresentadas com * para $p < 0,05$.

No gráfico da Figura 28 está apresentada a percentagem de adsorção à superfície, e de internalização no citosol e no núcleo do ^{223}Ra pelas células das várias linhas celulares, aos 120 minutos. A este tempo verificou-se uma maior internalização do radiofármaco pelas células da linha celular PC3, sendo que $40,65 \pm 2,24\%$ se acumulou no citosol e $27,07 \pm 1,29\%$ no núcleo. As células da linha celular LNCaP apresentaram um perfil semelhante, com $37,22 \pm 5,44\%$ e $28,17 \pm 3,62\%$ de internalização no citosol e no núcleo, respetivamente. A linha celular MNNG/HOS apresentou um perfil idêntico aos anteriores, com uma internalização no citosol e no núcleo de, respetivamente, $34,32 \pm 2,34\%$ e $29,82 \pm 2,94\%$.

De um modo geral, a percentagem de ^{223}Ra adsorvido à superfície, internalizado no citosol e internalizado no núcleo são muito semelhantes nas três linhas celulares, não se observando diferenças com significado estatístico.

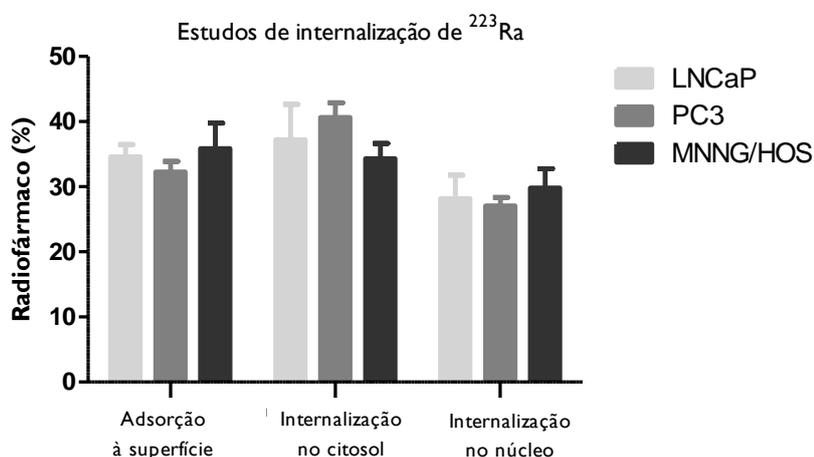


Figura 28: Internalização do radiofármaco ^{223}Ra pelas células das linhas celulares PC3, LNCaP e MNNG/HOS, aos 120 minutos. Os resultados estão expressos em percentagem e representam a média e o desvio padrão de, pelo menos, quatro ensaios independentes, realizados em duplicado.

A viabilidade celular também foi avaliada no final dos estudos de internalização, aos 120 minutos, através do método de exclusão do azul tripano. Os resultados apresentados na Figura 29 demonstraram que, no final dos estudos, as linhas celulares PC3 e MNNG/HOS apresentaram uma viabilidade superior a 90%. A linha celular LNCaP diminuiu a viabilidade celular para 64%.

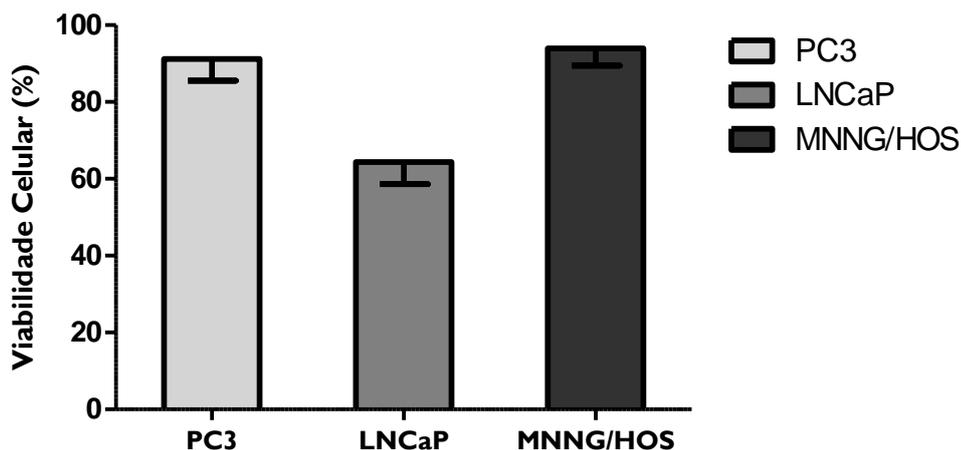


Figura 29: Viabilidade celular, aos 120 minutos, após a realização de estudos de internalização do ^{223}Ra . A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do azul tripano, e calculada através da razão, em percentagem, entre o número de células vivas e o número total de células (vivas e mortas). Os resultados expressam a média e o desvio-padrão de, pelo menos, quatro ensaios independente realizados em duplicado.

4.2.4 Estudos de retenção

Os resultados apresentados previamente demonstraram que as células das três linhas celulares em estudo captaram e internalizaram o radiofármaco, ficando uma pequena percentagem adsorvida à superfície. Diante disso foi avaliada também a retenção do radiofármaco ^{223}Ra pelas diferentes linhas celulares. Este é um parâmetro importante, pois fornece informação sobre o comportamento cinético do radiofármaco, permitindo determinar se o ^{223}Ra permanece no interior da célula ou se ocorre o seu efluxo passado um período de tempo.

Foram realizados ensaios de retenção nas três linhas celulares (PC3, LNCaP e MNNG/HOS) com ambos os radiofármacos.

De acordo com o gráfico da Figura 30, foi possível determinar que 3,99% (IC95%: 3,75-4,24) do ^{223}Ra ficou retido pelas células PC3, atingindo metade da retenção mínima aos 0,82 minutos após o início do ensaio. O radiofármaco $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ apresentou uma retenção de 0,28% (IC95%: 0,12-0,43) nas células PC3, sendo metade desta retenção atingida aos 0,78 minutos. Os valores de retenção mínima do ^{223}Ra nesta linha celular demonstraram, assim, ser significativamente superiores aos de retenção do $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ (Tabela 8).

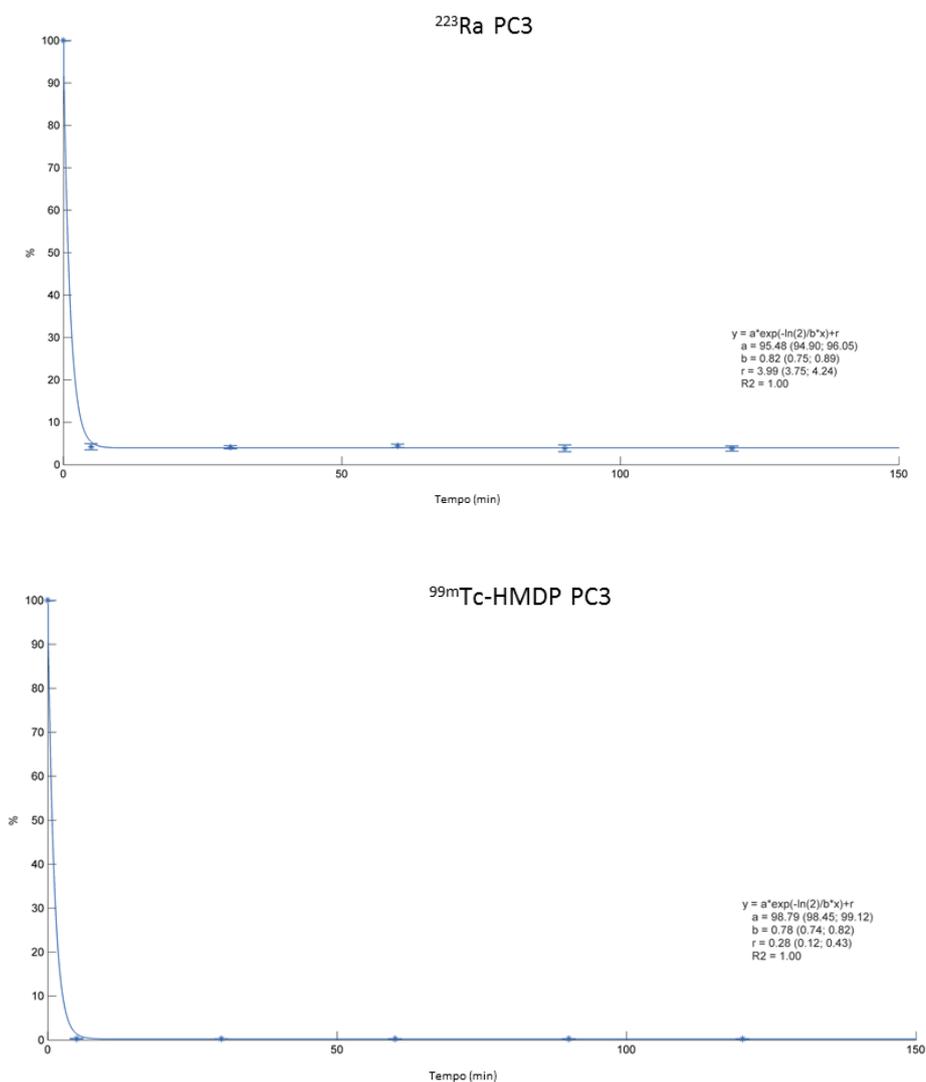


Figura 30: Perfil de retenção do ²²³Ra (em cima) e do ^{99m}Tc-HMDP (em baixo) pelas células da linha celular PC3. Os resultados expressam a média e o desvio-padrão de, pelo menos, dez ensaios independentes, realizados em duplicado. As curvas representam o melhor ajuste matemático aos pontos experimentais.

Relativamente às células da linha celular LNCaP, foi possível verificar através da análise da Figura 31 um perfil de retenção superior, com significância, para o radiofármaco ²²³Ra em comparação com o ^{99m}Tc-HMDP (Tabela 8). A retenção mínima foi atingida rapidamente por ambos os radiofármacos, mantendo-se depois constante ao longo do tempo. Através do gráfico, e de acordo com a Equação 12, verifica-se que 5,45% (IC95%: 4,79-6,10) do radiofármaco ²²³Ra ficou retido pelas células LNCaP, atingindo metade da retenção mínima aos 0,94 minutos após o início do ensaio, enquanto apenas 0,96% (IC95%:0,74-1,17) de ^{99m}Tc-HMDP ficou retido, sendo alcançada metade da retenção mínima aos 0,74 minutos.

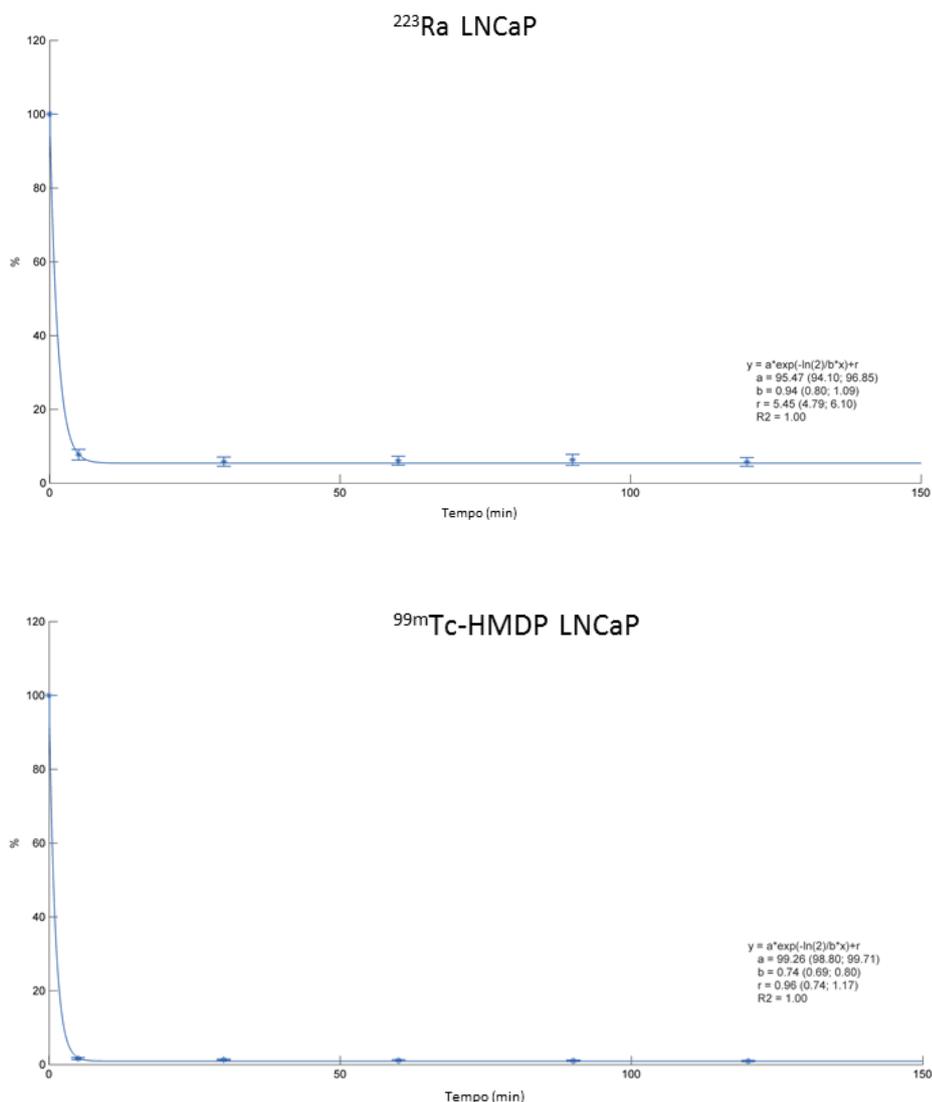


Figura 31: Perfil de retenção do ^{223}Ra (em cima) e do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP (em baixo) pelas células da linha celular LNCaP. Os resultados expressam a média e o desvio-padrão de, pelo menos, seis ensaios independentes, realizados em duplicado. As curvas representam o melhor ajuste matemático aos pontos experimentais.

Os resultados da retenção apresentados na Figura 32 demonstram que nas células da linha celular MNNG/HOS a retenção do radiofármaco ^{223}Ra foi significativamente superior à do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP (Tabela 8). Metade da retenção mínima do ^{223}Ra foi atingida aos 0,95 minutos após o início da experiência enquanto que a do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP foi alcançada aos 0,68 minutos. Com o decorrer da experiência a retenção mínima do ^{223}Ra assumiu um valor estatisticamente superior de 3,37%, enquanto a retenção mínima do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP foi de 0,66%.

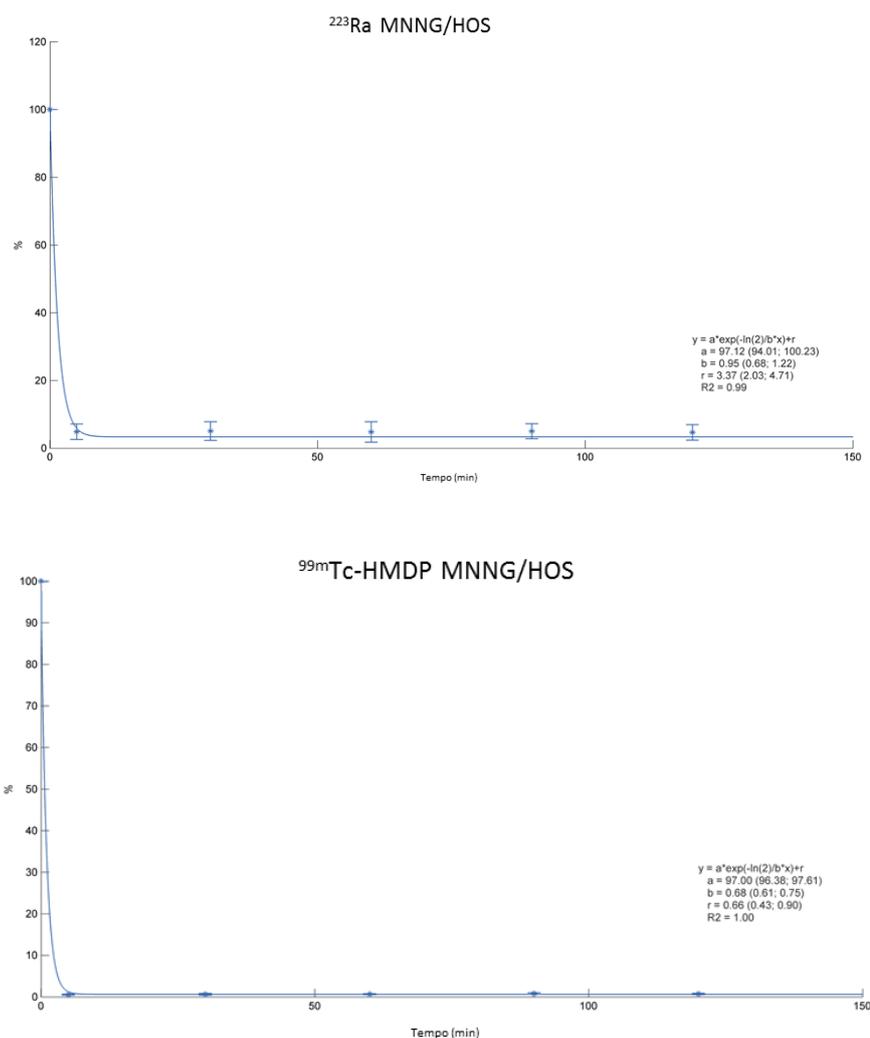


Figura 32: Perfil de retenção do ²²³Ra (em cima) e do ^{99m}Tc-HMDP (em baixo) pelas células da linha celular MNNG/HOS. Os resultados expressam a média e o desvio-padrão de, pelo menos, seis ensaios independentes, realizados em duplicado. As curvas representam o melhor ajuste matemático aos pontos experimentais.

A comparação da cinética de retenção de cada radiofármaco pelas células das três linhas celulares em estudo encontra-se apresentada na Figura 33.

Analisando simultaneamente os dados da Figura 33 e da Tabela 8, verifica-se que a retenção do ²²³Ra foi significativamente superior em todas as linhas celulares. A maior diferença, com significância, foi observada nas células PC3, com uma retenção do radiofármaco ²²³Ra cerca de 14 vezes superior à do ^{99m}Tc-HMDP. No caso das células LNCaP, a retenção do ²²³Ra foi superior à do ^{99m}Tc-HMDP em cerca de 6 vezes. Estes resultados demonstram ainda que a linha celular de osteossarcoma, MNNG/HOS, apresentou um perfil cinético de

retenção semelhante à das linhas celulares de cancro da próstata, para ambos os radiofármacos.

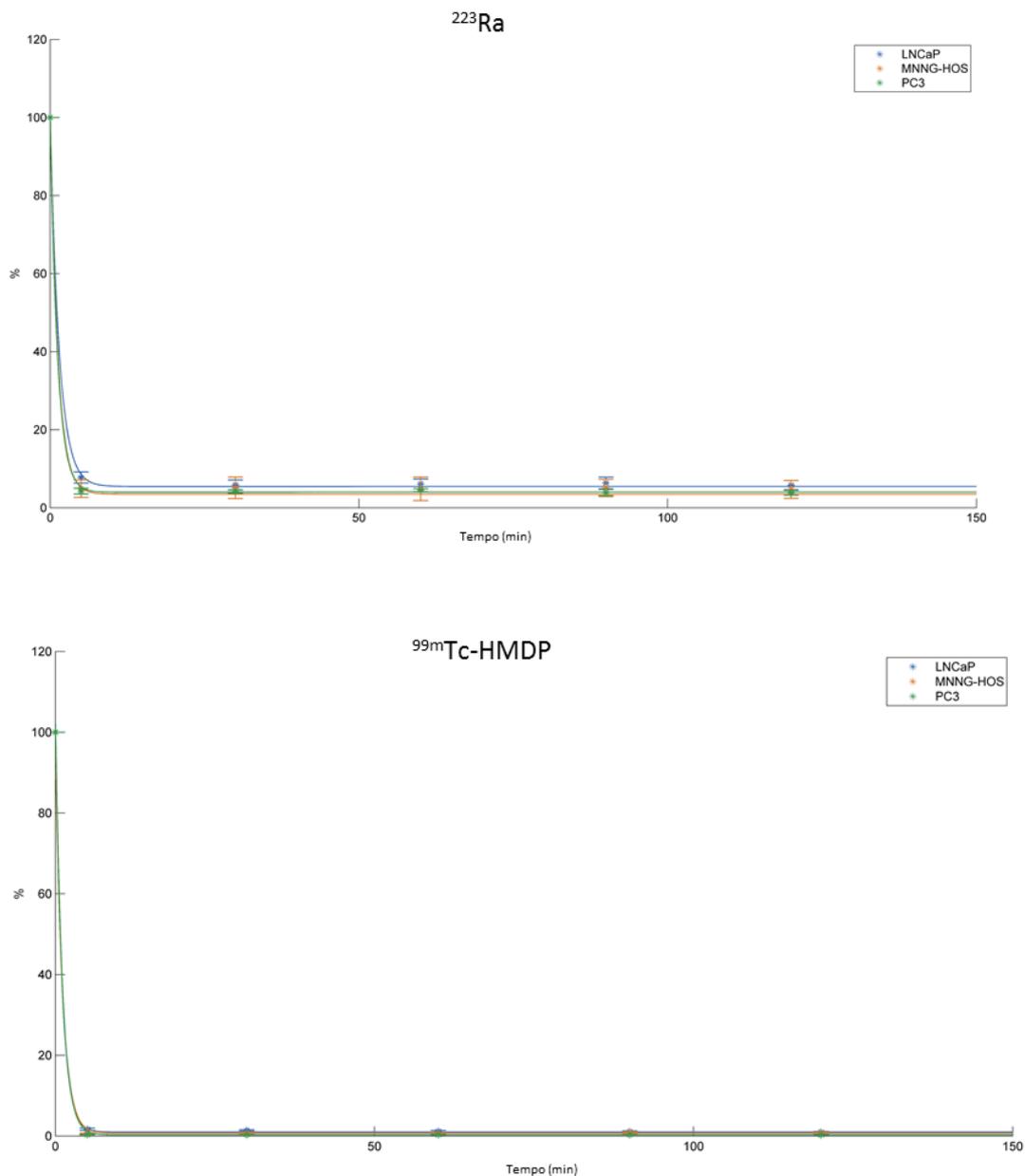


Figura 33: Perfil de comparação da retenção do ^{223}Ra (em cima) e do $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ (em baixo) pelas células das três linhas celulares em estudo. Os resultados expressam a média e o desvio-padrão de, pelo menos, seis ensaios independentes, realizados em duplicado. As curvas representam o melhor ajuste matemático aos pontos experimentais.

Os valores de retenção mínima atingida pelos radiofármacos, de tempo até atingir metade da retenção mínima e os respetivos intervalos de confiança apresentam-se descritos na Tabela 8.

Resultados

Tabela 8: Tempo de retenção mínima com base no "half-time" e rapidez de retenção dos radiofármacos ^{223}Ra e $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$.

Radiofármaco	Linha Celular	Parâmetro r (retenção mínima, %)			"half-time" (min)		
		Média	IC95%		Média	IC95%	
$^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$	PC3	0,28	0,12	0,43	0,78	0,74	0,82
	LNCaP	0,96	0,74	1,17	0,74	0,69	0,80
	MNNG/HOS	0,66	0,43	0,90	0,68	0,61	0,75
^{223}Ra	PC3	3,99	3,75	4,24	0,82	0,75	0,89
	LNCaP	5,45	4,79	6,10	0,94	0,80	1,09
	MNNG/HOS	3,37	2,03	4,71	0,95	0,68	4,71

A avaliação da viabilidade celular pelo mesmo método previamente descrito demonstrou uma viabilidade superior a 85% para todas as linhas celulares, confirmando a sua viabilidade durante o estudo (Figura 34).

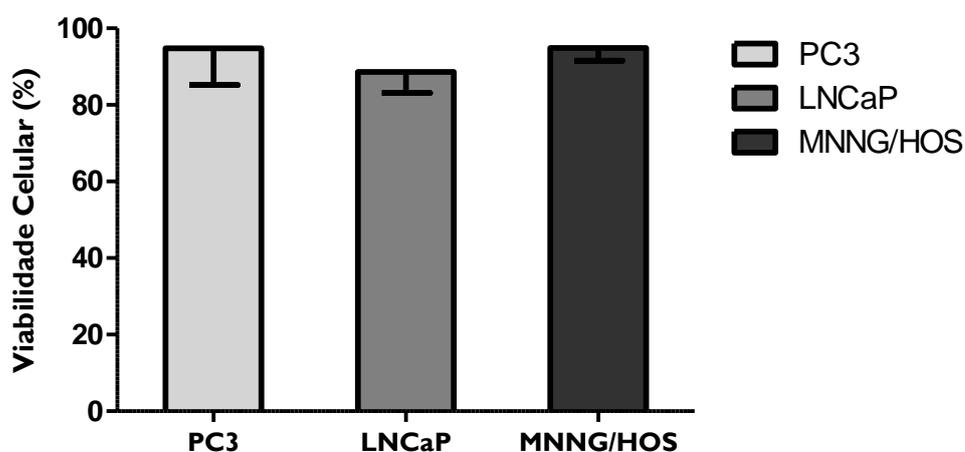


Figura 34: Viabilidade celular, aos 120 minutos, após a realização de estudos de retenção do ^{223}Ra . A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do azul tripano, e calculada através da razão, em percentagem, entre o número de células vivas e o número total de células (vivas e mortas). Os resultados expressam a média e o desvio-padrão de, pelo menos, seis ensaios independente realizados em duplicado.

Discussão

O carcinoma da próstata é a neoplasia sólida maligna mais frequente no género masculino e a segunda causa de morte por cancro (Calais da Silva, 2013). Com a descoberta da dependência hormonal, em 1941, por Huggins e Hodges, tornou-se possível o tratamento desta patologia através da castração cirúrgica ou química, designada como terapia hormonal. Assim, esta terapêutica tornou-se a chave fundamental para o tratamento do cancro da próstata metastático. Contudo, devido ao aparecimento da resistência a esta terapêutica, num período de no máximo três anos, o cancro da próstata metastático resistente à castração permanece uma doença incurável (Miller e Sweeney, 2016).

Os doentes portadores de carcinoma da próstata metastático resistente à castração (CPMRC) são extremamente afetados pela presença de metástases ósseas, caracterizadas pelo aumento da atividade osteoblástica e pelo aumento da utilização do cálcio para a formação da nova matriz óssea, pelo que a utilização de mímicos de cálcio como agentes terapêuticos tornou-se uma estratégia alternativa (Dan, Williams e Den, 2016). Análises histopatológicas demonstram que as metástases ósseas do carcinoma da próstata são constituídas por um número abrangente de osteoblastos adjacentes a células tumorais de CaP. Estas células tumorais segregam diversos fatores de crescimento que ativam os osteoblastos a depositar nova matriz óssea e ajudam na modificação do microambiente tumoral. Por outro lado, também os osteoblastos segregam um leque de fatores que atraem as células de CaP, promovendo o seu crescimento e proliferação no osso (Florimonte, Dellavedova e Maffioli, 2016). Estes dados demonstram a existência de interações complexas entre os vários componentes das metástases, salientando o papel fundamental das células tumorais de cancro da próstata no desenvolvimento das metástases ósseas.

As metástases são responsáveis pelo aparecimento de *skeletal-related events* como dor intensa, diminuição da qualidade de vida e perda de mobilidade, carecendo de terapêuticas inovadoras capazes de minimizar ou, pelo menos, atrasar o aparecimento destes sintomas.

Durante os últimos anos foram aprovados alguns medicamentos que comprovadamente aumentam a taxa de sobrevivência global, entre os quais se encontra o único radiofármaco emissor de partículas alfa aprovado para terapêutica, o radioisótopo ^{223}Ra . Este encontra-se aprovado para o tratamento de doentes de cancro da próstata metastático resistente à castração com a presença de metástases ósseas conhecidas e sem metástases viscerais (Rodrigues *et al.*, 2014; Shore, 2015).

O radiofármaco ^{223}Ra é um emissor predominantemente alfa que decai emitindo 95,3% (5-7,5 MeV) como partículas alfa, 3,6% (0,045 e 0,432 MeV) como partículas beta e 1,1% como

radiação gama (0,01-1,27 MeV), apresentando um período de semi-desintegração de 11,4 dias. A elevada LET associada às partículas alfa (80 keV/ μm), induz uma elevada frequência de quebras na dupla cadeia de ADN nas células adjacentes o que resulta num efeito anti tumoral nas metástases ósseas. As partículas alfas apresentam a vantagem de terem um curto alcance, inferior a 100 μm (menor que o diâmetro de dez células), o que limita os danos nos tecidos normais adjacentes (EMA, 2010). O ^{223}Ra é apresentado como uma solução de dicloreto de rádio que se vai depositar na superfície do osso em zonas de elevada renovação óssea (metástases), onde atua como um mímico do cálcio, incorporando-se na hidroxiapatite da matriz óssea como um substituto do cálcio, aquando da formação mineral (Florimonte, Dellavedova e Maffioli, 2016). Contudo, apesar da sua aplicabilidade terapêutica que demonstra um aumento do tempo de sobrevivência dos doentes (Harrison *et al.*, 2013; Parker *et al.*, 2013), os mecanismos moleculares de atuação deste radiofármaco não se encontram completamente esclarecidos.

Perante a ausência de informação acerca dos mecanismos de atuação do radiofármaco ^{223}Ra nas células constituintes das metástases e do efeito da radiação alfa nas células de cancro da próstata, pretendeu-se avaliar o efeito da exposição das células a doses de radiação, aplicadas sobre a forma de irradiação interna, em modelos *in vitro* de células metastáticas de carcinoma da próstata. Mais concretamente, numa fase inicial pretendeu-se avaliar a sobrevivência celular após a irradiação com ^{223}Ra prosseguindo para um estudo a nível da cinética do radiofármaco no qual se estudou a captação, a internalização no núcleo, a retenção e um possível envolvimento dos canais de cálcio na cinética de transporte.

Desta forma, com este estudo pretende-se contribuir para um melhor conhecimento destes mecanismos moleculares de atuação e dos efeitos do radiofármaco nas células do carcinoma da próstata, de modo a possibilitar uma melhor aplicabilidade e potencialidade desta terapêutica.

Os estudos *in vitro* para avaliação da sobrevivência celular foram realizados através da irradiação interna das células das linhas celulares de carcinoma da próstata metastático, com a aplicação de doses compreendidas entre os 0,25 e os 10 mGy. A sobrevivência celular foi avaliada pelo ensaio clonogénico que permite avaliar a capacidade de células submetidas à radiação conseguirem proliferar e formar colónias. No contexto da radiobiologia, a morte celular é, normalmente, equiparada a qualquer processo que conduza à perda permanente da capacidade proliferativa e clonogénica sendo, deste modo, possível, equiparar os resultados

obtidos com este ensaio à resposta tumoral obtida *in vitro* (Joiner e Kogel, 2009; Mendes, 2016).

Os fatores de sobrevivência obtidos através do ensaio clonogênico para as diferentes doses de radiação aplicadas permitiram traçar as curvas de sobrevivência em função da dose de radiação (FS vs. Dose), permitindo o ajuste para cada linha celular ao modelo de agressão celular mais apropriado. O modelo linear baseia-se na teoria de que na célula existem alvos especialmente importantes, como o ADN que, quando lesados, são suficientes para induzir morte celular e desencadeiam uma resposta independente. Quanto ao modelo linear quadrático, este baseia-se na ideia de que as várias lesões induzidas pela radiação ionizante desencadeiam uma interação entre respostas, de modo a eliminar eficazmente as células atingidas pela radiação (Joiner e Kogel, 2009; Mendes, 2016).

As curvas obtidas em resposta à irradiação interna com doses até 10 mGy, representadas nas Figura 18 e Figura 19, mostraram que existe um decréscimo significativo na sobrevivência celular de ambas as linhas celulares, de um modo depende da dose. A dose letal média (DL_{50}), parâmetro que permite comparar radios sensibilidades, definido como a dose com a qual 50% da população celular perde viabilidade e/ou capacidade proliferativa. As células LNCaP apresentaram um DL_{50} de 1,41 mGy (IC95%: 1,169-1,789), mostrando serem significativamente mais radios sensíveis que as células PC3, cujo DL_{50} foi de 4,22 mGy (IC95%: 3,833-4,683) e com maior α , igual a $0,451 \pm 0,044$ (Tabela 5).

Além da diferença na radios sensibilidade, a resposta à radiação apresentada pelas duas linhas celulares baseia-se em dois modelos de agressão diferentes. A linha celular LNCaP, obtida de uma metástase linfática, apresenta um modelo de agressão celular linear quadrático, que se traduz por β ser diferente de zero, assumindo o valor de $0,030 \pm 0,008$. De acordo com a literatura, este modelo representa morte celular induzida por duas ou mais ionizações que induzem quebras na dupla cadeia de ADN, separadas por um intervalo temporal que permite que o primeiro dano na cadeia de ADN seja reparado antes da ocorrência do segundo (McParland, 2010). Por outro lado, a linha celular PC3, obtida de uma metástase óssea, apresenta um modelo de agressão linear, ou seja, existe uma relação linear entre a dose e o dano produzido, sendo o β igual a zero. Este modelo está estritamente associado aos efeitos induzidos pela irradiação com partículas alfa, correlacionada com danos irreparáveis a nível da cadeia dupla de ADN (Joiner e Kogel, 2009; McParland, 2010).

As linhas celulares em estudo demonstraram ser radiosensíveis a doses muito baixas, ainda na ordem dos mGy e, como tal, a dose necessária para induzir a morte a 50% da população apresenta valores muito reduzidos. Estes resultados vão de encontro ao descrito pela literatura, pois a morte celular está estritamente correlacionada com o parâmetro LET de uma forma proporcional. Como tal, visto que as partículas alfa apresentam valores de LET de elevada intensidade será provável uma maior incidência de morte celular, com escassa oportunidade para reparação de danos subletais (Joiner e Kogel, 2009; McParland, 2010). Alguns estudos realizados com a aplicação de outros emissores alfa às mesmas linhas celulares demonstram semelhanças entre os modelos de agressão adotados para avaliar a sobrevivência celular, contudo apresentam diferenças no que diz respeito ao valor de DL_{50} , já que apresentam um DL_{50} superior, na ordem dos Gy (Elgqvist *et al.*, 2016; Nilsson *et al.*, 2015). Perante estas diferenças podemos postular a hipótese que estes resultados podem ser devidos a características intrínsecas do ^{223}Ra como, por exemplo, o fato de este radiofármaco não emitir apenas partículas alfa, mas também uma pequena quantidade (3,6%) de partículas beta e ainda radiação gama, que podem induzir outros danos celulares.

Estes resultados também são corroborados por estudos *in vitro* realizados em várias linhas celulares, nas quais o radiofármaco ^{223}Ra demonstrou efeitos citotóxicos e a capacidade para inibir a diferenciação osteoclástica e a atividade osteoblástica, de um modo dependente da dose. Para além disto, resultados de estudos *in vivo* em modelos animais de metástases ósseas, realizados pelos mesmos autores, determinaram um aumento do tempo de sobrevivência com diminuição da área osteolítica após irradiação com ^{223}Ra (Center for drug evaluation and research, 2013; McGann e Horton, 2015).

Dada a aplicabilidade terapêutica do ^{223}Ra a doentes com cancro da próstata metastático resistente à castração, com metástases ósseas e sem metástases viscerais, ou seja, já num estado muito avançado da doença, seria esperada a ocorrência de danos mais pronunciados nas células da linha celular obtida a partir de metástases ósseas, as células PC3. Contudo, isto não se verificou, sendo as células da linha celular obtida de uma metástase linfática, a LNCaP, a apresentar maior radiosensibilidade. Este aspeto pode ter relevo a nível de novas aplicabilidades terapêuticas do ^{223}Ra em fases mais precoces da doença, podendo até ser possível utilizar em combinação com outras terapêuticas, de modo a potenciar o seu efeito nas células tumorais com o intuito curativo.

Apesar das limitações dos estudos *in vitro* para avaliação da sobrevivência celular de células metastáticas, nomeadamente, o facto de as células crescerem de modo individual e não

organizado em tecidos ou em estruturas complexas, como é o caso das metástases ósseas, excluindo desta forma toda a ação do microambiente, esta abordagem pode ser utilizada com o intuito de prever efeitos a nível molecular que possam ser traduzidos na clínica ou para a melhoria das terapêuticas atuais.

Perante a diminuição da sobrevivência celular verificada após a irradiação com o radiofármaco ^{223}Ra , e devido à falta de estudos que demonstrem os mecanismos de atuação deste radiofármaco a nível molecular, tornou-se pertinente avaliar o perfil cinético do ^{223}Ra nas linhas celulares de cancro da próstata. Dado a existência de novos estudos que apontam o ^{223}Ra como possível terapêutica para o tratamento de metástases ósseas de osteossarcoma (Anderson, Subbiah e Rohren, 2014), achou-se pertinente avaliar também os mesmos parâmetros em células de uma linha celular dessa proveniência, a MNNG/HOS. Também para ultrapassar estas limitações da falta de estudos de cinética que nos permitam estabelecer uma comparação de resultados, optou-se por utilizar outro radiofármaco, o $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$. Este radiofármaco é utilizado na medicina nuclear para deteção de metástases ósseas devido à sua afinidade para o ião cálcio presente na hidroxiapatite óssea, tal como o ^{223}Ra (Vallabhajosula, Killeen e Osborne, 2010). Deste modo, aparentemente, ambos os radiofármacos apresentam o mesmo mecanismo de atuação a nível das metástases ósseas, com uma estreita correlação com o ião cálcio.

Os estudos de captação demonstraram uma captação superior, com significância, do radiofármaco ^{223}Ra por todas as linhas celulares em estudo comparativamente ao $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$. A captação máxima alcançada foi de 1,43% (IC95%: 1,33-1,53) para a linha celular PC3, de 1,39% (IC95%: 1,31-1,48) para a linha celular LNCaP e de 0,96% (IC95%:0,96-0,90) para a linha celular MNNG/HOS, atingindo metade desta captação passados poucos minutos após o início do estudo. O facto de, apesar de estes valores não serem muitos elevados, serem sempre superiores ao do radiofármaco $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ comprova a sua aplicabilidade terapêutica pois, se a pequena quantidade de $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ que é captada pelas células é suficiente para a obtenção de imagem, também a percentagem de captação de ^{223}Ra é suficiente para desencadear alterações nas células. Outro aspeto importante são as semelhanças observadas entre os perfis das duas linhas celulares de CaP que, de acordo também com os resultados obtidos no cálculo da sobrevivência celular, podem demonstrar uma possível aplicabilidade da terapêutica a um nível mais precoce da doença, correspondente à fase das metástases linfáticas apresentada pela linha celular LNCaP. A captação máxima alcançada pela linha celular PC3 estaria prevista de acordo com a literatura, sendo esta a linha celular mais agressiva

representativa das metástases ósseas de CaP, para o qual a terapêutica é dirigida (Tai et al., 2011).

O ^{223}Ra é um mímico do cálcio, contudo, tal como referido anteriormente, o seu mecanismo de atuação a nível das células tumorais constituintes da metástase não se encontra totalmente esclarecido. Dado que, de acordo com os estudos de captação, há uma captação do radiofármaco ^{223}Ra quando colocado num meio com células tumorais LNCaP, PC3 e MNNG/HOS, postulou-se a hipótese de que a entrada dos radiofármacos mímicos de cálcio poderá estar dependente dos canais de cálcio existentes nas linhas celulares. Para determinar este efeito recorreu-se ao uso do verapamil, um bloqueador dos canais de cálcio, com a capacidade de inibir a entrada de cálcio tanto *in vivo* como *in vitro* (Seleem e Lashein, 2016). Estes estudos demonstraram uma diminuição com significância na captação de ^{223}Ra , salientando o facto de a linha celular PC3 ter apresentado uma diminuição significativa de 1,43% (IC95%: 1,33-1,53) para 0,96% (IC95%: 0,89-1,02). Por outro lado, para o radiofármaco $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ apenas se verificou uma diminuição significativa para a linha celular LNCaP de 1,09% (IC95%: 1,06-1,11) para 0,39% (IC95%: 0,29-0,48), com redução do tempo para o qual se alcança metade da captação máxima. Estes resultados demonstram que existem diferenças sobre o efeito do verapamil no modo de atuação dos dois radiofármacos, sugerindo que a captação do radiofármaco ^{223}Ra está relacionada com os canais de cálcio existentes. Isto poderá abrir uma nova janela terapêutica através da combinação do ^{223}Ra com agentes que aumentem o influxo do radiofármaco através destes canais de cálcio e, conseqüentemente, potenciar o efeito citotóxico no interior das células.

A bibliografia aponta para o facto de que o ^{223}Ra quando é administrado vai dirigir-se para as áreas de renovação óssea, pelo que se concentra na superfície óssea (Florimonte, Dellavedova e Maffioli, 2016). De acordo com os resultados anteriores é possível afirmar que ocorre captação do radiofármaco pelas células, no entanto, fica por esclarecer se esta captação ocorre por adsorção à superfície ou internalização. Através dos resultados por nós obtidos, foi possível determinar que a captação do ^{223}Ra , apesar de ocorrer alguma adsorção à superfície, ocorre maioritariamente por internalização, tanto a nível do citosol como do núcleo. Assim, e através dos resultados obtidos, observa-se que o radiofármaco internaliza a nível do núcleo das células numa percentagem de $34,12 \pm 2,29\%$ para a linha celular PC3, de $28,17 \pm 3,62\%$ para a linha celular LNCaP e de $29,82 \pm 2,94\%$ para a linha celular MNNG/HOS. Aparentemente estes são valores relativamente baixos, no entanto, no contexto da radiação em estudo que apresenta elevada LET, com um efeito citotóxico elevado, esta quantidade é

suficiente para diminuir a sobrevivência celular destas linhas celulares, tal como se observou no ensaio clonogénico.

Tendo em conta que, para que a terapêutica com o ^{223}Ra seja eficaz, não basta que o radiofármaco seja captado pelas células, mas também que fique retido o tempo suficiente para exercer os seus efeitos citotóxicos, tornou-se importante avaliar a retenção do radiofármaco nas células em estudo. Estudos apontam que o ^{223}Ra , quando aplicado clinicamente, vai concentra-se nas zonas de elevada metastização óssea onde irá substituir o cálcio a nível da hidroxiapatite na matriz óssea. Aqui vão ser emitidas partículas alfa de elevado LET, o que resulta num efeito biológico elevado, com efeito citotóxico nos osteoblastos e células tumorais adjacentes (Florimonte, Dellavedova e Maffioli, 2016; Suominen *et al.*, 2015).

A retenção do radiofármaco ^{223}Ra demonstrou ser significativamente superior para todas as linhas celulares comparativamente com o $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$. As células PC3 demonstraram uma maior retenção, com significância, do ^{223}Ra , assumindo um valor de 3,99% (IC95%: 3,75-4,24) comparativamente ao radiofármaco $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ que apresentou um valor de 0,28% (IC95%: 0,12-0,43). Também as células da linha celular LNCaP apresentaram uma retenção estatisticamente superior em cerca de seis vezes, comparativamente ao $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$. As células da linha celular MNNG/HOS assume um comportamento semelhante ao das células das linhas celulares de CaP. Este comportamento demonstrado pelas células da linha MNNG/HOS de osteossarcoma ao longo de todos os estudos por nós realizados comprovou um perfil muito semelhante para com as linhas celulares de CaP, o que as torna possíveis candidatas para o uso desta terapêutica na prática clínica, tal como foi proposto e se encontra em estudo por outros autores (Anderson e Rohren, 2015; Anderson, Subbiah e Rohren, 2014).

A linha celular LNCaP foi a linha que demonstrou maior radiosensibilidade, segundo o ensaio clonogénico, apresentando nos restantes estudos de cinética semelhanças ao perfil da linha celular PC3, com captação do radiofármaco, internalização no núcleo e retenção comprovada do radiofármaco ^{223}Ra . As células da linha celular LNCaP, tal como foi referido anteriormente, são derivadas de metástases linfáticas, com expressão de recetores androgénicos, apresentando um comportamento biológico similar ao carcinoma da próstata sensível a androgénios (Tai *et al.*, 2011). De acordo com a literatura, prevê-se que, quanto mais precoce for tratado o carcinoma da próstata, provavelmente, menos resistentes serão as lesões malignas. Isto permite que a terapêutica aplicada seja mais eficaz, com efeito de atraso na progressão da doença ou, até mesmo, um possível tratamento curativo e não apenas um aumento no tempo de sobrevivência, tal como acontece atualmente com as terapêuticas

utilizadas para doentes de cancro da próstata metastático resistente à castração (Miller e Sweeney, 2016).

A viabilidade celular foi avaliada em todos os ensaios de cinética com o radiofármaco ^{223}Ra comprovando a viabilidade das células durante o decorrer das experiências, garantindo assim que estes resultados não se encontram alterados devido a perda da viabilidade celular durante os experimentos. A linha celular LNCaP apresenta geralmente uma viabilidade inferior em todos os estudos devido a serem células muito sensíveis, mesmo em condições normais, quando em comparação com as outras linhas celulares.

Conclusão e Perspetivas Futuras

Ao longo deste trabalho experimental, foi possível avaliar *in vitro* os efeitos da irradiação interna em duas linhas celulares de carcinoma da próstata, a PC3 e a LNCaP, bem como o perfil cinético e o modo de atuação de dois radiofármacos, ^{223}Ra e $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$, em três linhas celulares distintas, duas de carcinoma da próstata (LNCaP e PC3) e uma de osteossarcoma (MNNG/HOS).

O ensaio clonogénico permitiu avaliar a longo prazo o efeito da irradiação interna com ^{223}Ra nas linhas celulares LNCaP e PC3, apresentando uma eficácia na redução da sobrevivência celular de modo dependente da dose, na ordem dos mGy. As linhas celulares comportaram-se de acordo com modelos de agressão diferentes, correspondendo a linha celular LNCaP a um ajuste linear quadrático e a linha celular PC3 a um ajuste linear. As células LNCaP apresentaram uma maior radiosensibilidade. No entanto, comparando os modelos de agressão obtidos, as células PC3 apresentam um modelo definido por representar danos irreversíveis, ou seja, normalmente, caracterizado por quebras irreparáveis na dupla cadeia de ADN.

Os estudos de cinética comprovaram a captação do radiofármaco ^{223}Ra , em maior percentagem do que o radiofármaco $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$, por todas as linhas celulares. Do mesmo modo, também ficou comprovado que o ^{223}Ra adsorve em pequenas quantidades à superfície celular, sendo a maior parte internalizado tanto a nível do citosol como do núcleo.

A linha celular PC3, derivada de metástases ósseas do carcinoma da próstata, foi a que apresentou valores mais elevados para todos estes parâmetros de cinética em estudo, comprovando assim a aplicabilidade do uso terapêutico do radiofármaco ^{223}Ra para doentes de carcinoma da próstata metastático resistente à castração, do qual esta linha é representativa.

A linha celular LNCaP demonstrou ao longo dos estudos um perfil cinético com semelhanças ao da linha celular PC3. Perante estes resultados e dado que foram as células LNCaP que apresentaram uma maior radiosensibilidade, segundo os ensaios clonogénicos, pode sugerir-se a aplicabilidade do radiofármaco ^{223}Ra em fases mais precoces da doença, quando ainda não foi alcançado o estado de resistência à castração, para potenciar o seu uso como terapêutica curativa, sob a forma de administração individual ou em combinação com outros fármacos.

Através dos nossos estudos foi possível concluir que a linha celular MNNG/HOS de osteossarcoma também apresenta uma cinética semelhante às linhas celulares de carcinoma

da próstata, mas com percentagens inferiores, indo de encontro a outros estudos realizados sobre uma possível aplicabilidade do ^{223}Ra em osteossarcoma.

O uso do bloqueador de canais de cálcio, verapamil, permitiu determinar que, na sua presença, há uma variação na cinética de captação do ^{223}Ra traduzida na diminuição significativa da captação do radiofármaco pelas linhas celulares de carcinoma da próstata. Perante estes resultados postula-se que o mecanismo de atuação do radiofármaco ^{223}Ra se encontra diretamente relacionado com os canais de cálcio, sendo a sua entrada na célula dependente destes canais.

Em suma, os resultados apresentados e obtidos ao longo desta dissertação, apontam o uso do radiofármaco ^{223}Ra como uma mais-valia no tratamento de doentes de carcinoma da próstata metastático resistente à castração e como uma possível aplicação terapêutica em níveis mais precoces do estágio desta patologia, podendo ainda possivelmente ser aplicável como terapêutica noutros tumores malignos, como é o caso do osteossarcoma.

Deste modo, considera-se que o presente estudo é relevante para o avanço de uma área que ainda não se encontra muito aprofundada e que poderá implicar muitos benefícios em termos clínicos. Assim, como perspetivas futuras deste trabalho, pretende-se avaliar os danos celulares induzidos pela irradiação com o radiofármaco ^{223}Ra quer através de danos diretos a nível do ADN, quer através de danos indiretos, como por exemplo, através da formação de espécies reativas de oxigénio. Consideramos também relevante o estudo dos tipos de morte associados a esta radiação ionizante e os possíveis mecanismos de reparação de danos utilizados. É ainda importante avaliar e determinar proteínas envolvidas no mecanismo molecular de entrada do radiofármaco associado aos canais de cálcio. Deste modo, com o melhor conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos no modo de atuação do radiofármaco ^{223}Ra e dos danos induzidos, é possível potencializar a utilidade terapêutica do rádio-223.

Bibliografia

ABI-GHANEM, Alain S.; MCGRATH, Mary A.; JACENE, Heather A. - Radionuclide therapy for osseous metastases in prostate cancer. **Seminars in Nuclear Medicine**. . ISSN 15584623. 45:1 (2015) 66–80. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2014.07.006.

ABRANTES, Ana Margarida - **Hipoxia Tumoral-Metabonómica e Imagem. Estudo Experimental**. [S.l.] : Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2013

ADJAKLY, Mawussi *et al.* - Prostate cancer: The main risk and protective factors-Epigenetic modifications. **Annales d'Endocrinologie**. . ISSN 00034266. 76:1 (2015) 25–41. doi: 10.1016/j.ando.2014.09.001.

AJCC, AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER - **AJCC CANCER STAGING ATLAS**. Second Edi ed. [S.l.] : Springer, 2012. ISBN 978-1-4614-2080-4 (eBook).

AMERICAN CANCER SOCIETY - Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. **American Cancer Society**. . ISSN 1097-0215. 800 (2015) 1–64. doi: 10.1002/ijc.27711.

ANDERSON, Pete; ROHREN, Eric - Alpha Emitter Radium 223 in High-Risk Osteosarcoma: First Clinical Evidence of Response and Blood-Brain Barrier Penetration. **JAMA Oncology**. . ISSN 23742445. 1:2 (2015) 2–4. doi: 10.1001/jamaoncol.2014.289. 254.

ANDERSON, Peter M.; SUBBIAH, Vivek; ROHREN, Eric - Bone-Seeking Radiopharmaceuticals as Targeted Agents of Osteosarcoma: Samarium-153- EDTMP and Radium-223. Em **Current Advances in Osteosarcoma**. Houston , TX , USA E.S. : Springer International Publishing Switzerland 2014, 2014. p. 291–304.

ARYA, Manit *et al.* - The metastatic cascade in prostate cancer. **Surgical Oncology**. . ISSN 09607404. 15:3 (2006) 117–128. doi: 10.1016/j.suronc.2006.10.002.

ATTARD, Gerhardt *et al.* - Prostate cancer. **Lancet**. . ISSN 1474-547X. 6736:14 (2015) 1–13. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61947-4.

BAHL, Amit - Metastatic castration-resistant prostate cancer. Part I: the challenges of the disease and its treatment. **European journal of oncology nursing : the official journal of European Oncology Nursing Society**. . ISSN 1532-2122. 17 Suppl 1:April 2012 (2013) S1-6. doi: 10.1016/S1462-3889(14)70002-X.

BENJAMIN, Robert S. *et al.* - Chemotherapy for Bone Sarcomas in Adults: The MD Anderson Experience. Em **American Society of Clinical Oncology educational bookv**. 35. p. 656–660.

BIRTLE, Alison - Maximizing Survival in Metastatic Castrate-resistant Prostate Cancer. **Expert Rev Anticancer Ther.** . ISSN 1744-8328. 13:1 (2013) 89–99. doi: 10.1586/era.12.160.

BODY, Jean-Jacques; CASIMIRO, Sandra; COSTA, Luís - Targeting bone metastases in prostate cancer: improving clinical outcome. **Nature Reviews Urology.** . ISSN 1759-4812. 12:6 (2015) 340–356. doi: 10.1038/nrurol.2015.90.

BOK, Robert A.; SMALL, Eric J. - Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. **Nat Rev Cancer.** . ISSN 1474175X. 2:12 (2002) 918–926. doi: 10.1038/nrc951.

BOSKEY, Adele L. - Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. **BoneKey reports.** . ISSN 2047-6396. 2:July (2013) 447. doi: 10.1038/bonekey.2013.181.

BOUCHELOUCHE, Kirsten; CHOYKE, Peter L.; CAPALA, Jacek - Prostate specific membrane antigen- a target for imaging and therapy with radionuclides. **Discovery medicine.** . ISSN 1944-7930. 9:44 (2010) 55–61.

BRITO, AF - **GLUT-1: Um alvo terapêutico para os tumores primários do fígado?** [S.l.] : Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2014

CALAIS DA SILVA, F. - **Recomendações Clínicas no Tratamento do Carcinoma da Próstata.** 1ª ed. ISBN 354977/13.

CARDOSO, Marta Ribeiro José - **THE ROLE OF HOXB13 IN PROSTATE CANCER.** [S.l.] : Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, 2013

CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH - **Farmacology Review** [Em linha], atual. 2013. [Consult. 2 set. 2016]. Disponível em WWW:<URL:http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/203971Orig1s000PharmR.pdf>.

CHANDRASEKAR, Thenappan *et al.* - Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). **Translational andrology and urology.** . ISSN 2223-4691. 4:3 (2015) 365–80. doi: 10.3978/j.issn.2223-4683.2015.05.02.

CHENG, Liang *et al.* - Staging of prostate cancer. **Histopathology.** . ISSN 03090167. 60:1 (2012) 87–117. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04025.x.

COLEMAN, Robert *et al.* - Bone markers and their prognostic value in metastatic bone disease: Clinical evidence and future directions. **Cancer Treatment Reviews**. . ISSN 03057372. 34:7 (2008) 629–639. doi: 10.1016/j.ctrv.2008.05.001.

CROUCHER, Peter I.; MCDONALD, Michelle M.; MARTIN, T. John - Bone metastasis: the importance of the neighbourhood. **Nature Reviews Cancer**. . ISSN 1474-175X. 16:6 (2016) 373–386. doi: 10.1038/nrc.2016.44.

DAI, Jinlu *et al.* - Mouse models for studying prostate cancer bone metastasis. **BoneKey Reports**. . ISSN 2047-6396. 5:April (2016) 777. doi: 10.1038/bonekey.2016.4.

DAN, Tu; WILLIAMS, Noelle; DEN, Robert B. - Radium-223 in Metastatic Castrate Resistant Prostate Cancer. Em **Managing Metastatic Prostate Cancer In Your Urological Oncology Practice**. Cham : Springer International Publishing, 2016. p. 171–185.

DATTA, Kaustubh *et al.* - Mechanism of lymph node metastasis in prostate cancer. **Future Oncology**. . ISSN 1744-8301. 6:5 (2010) 823–836. doi: 10.2217/fon.10.33.

DEMARZO, Angelo M. *et al.* - Pathological and molecular aspects of prostate cancer. **Lancet**. . ISSN 01406736. 361:9361 (2003) 955–964. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12779-1.

DEVLIN, Hong Lin; MUDRYJ, Maria - Progression of prostate cancer: Multiple pathways to androgen independence. **Cancer Letters**. . ISSN 03043835. 274:2 (2009) 177–186. doi: 10.1016/j.canlet.2008.06.007.

DUNN, Mary Weinstein; KAZER, Meredith Wallace - Prostate cancer overview. **Seminars in Oncology Nursing**. . ISSN 07492081. 27:4 (2011) 241–250. doi: 10.1016/j.soncn.2011.07.002.

EL-AMM, Joelle; ARAGON-CHING, Jeanny B. - Radium-223 for the treatment of castration-resistant prostate cancer. **OncoTargets and Therapy**. 8 (2015) 1103–1109.

ELGQVIST, Jörgen *et al.* - Radiosensitivity of Prostate Cancer Cell Lines for Irradiation from Beta Particle-emitting Radionuclide ¹⁷⁷Lu Compared to Alpha Particles and Gamma Rays. **Anticancer research**. . ISSN 1791-7530. 36:1 (2016) 103–9.

EMA, European Medicines Agency - **ANNEX I SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS. Xofigo, Bayer**

FELICI, A.; PINO, M. S.; CARLINI, Paolo - A changing landscape in castration-resistant prostate

cancer treatment. **Frontiers in Endocrinology**. . ISSN 16642392. 3:JUL (2012) 1–8. doi: 10.3389/fendo.2012.00085.

FERLAY, Jacques *et al.* - Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**. . ISSN 10970215. 136:5 (2015) E359–E386. doi: 10.1002/ijc.29210.

FLORIMONTE, Luigia; DELLAVEDOVA, Luca; MAFFIOLI, Lorenzo Stefano - Radium-223 dichloride in clinical practice: a review. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**. . ISSN 1619-7070. 2016). doi: 10.1007/s00259-016-3386-5.

FOGELM, Ignac - **Bone Scanning in Clinical Practise**. [S.l.] : Springer London, 1987. ISBN 9781447114093.

FRANKEN, Nicolaas A P. *et al.* - Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature protocols**. . ISSN 1750-2799. 1:5 (2006) 2315–9. doi: 10.1038/nprot.2006.339.

FUTAKUCHI, Mitsuru; FUKAMACHI, Katsumi; SUZUI, Masumi - Heterogeneity of tumor cells in the bone microenvironment: Mechanisms and therapeutic targets for bone metastasis of prostate or breast cancer. **Advanced drug delivery reviews**. . ISSN 1872-8294. 99:2015) 1–6. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.017.

GANN, Peter H. - Risk factors for prostate cancer. **Reviews in urology**. . ISSN 1523-6161. 4 Suppl 5:2002) S3–S10.

GORDETSKY, Jennifer; EPSTEIN, Jonathan - Grading of prostatic adenocarcinoma: current state and prognostic implications. **Diagnostic pathology**. . ISSN 1746-1596. 11:1 (2016) 25. doi: 10.1186/s13000-016-0478-2.

GREENE, Kirsten L. *et al.* - Prostate Specific Antigen Best Practice Statement: 2009 Update. **Journal of Urology**. . ISSN 00225347. 182:5 (2009) 2232–2241. doi: 10.1016/j.juro.2009.07.093.

HAMMERER, Peter; MADERSBACHER, Stephan - Landmarks in hormonal therapy for prostate cancer. **BJU international**. . ISSN 1464-410X. 110 Suppl:SUPPL. 1 (2012) 23–29. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11431.x.

HAMOUEH, Misara *et al.* - Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**. . ISSN 0169409X. 60:12 (2008) 1329–1346. doi: 10.1016/j.addr.2008.04.013.

HARRISON, Michael R. *et al.* - Radium-223 chloride: a potential new treatment for castration-resistant prostate cancer patients with metastatic bone disease. **Cancer management and research**. . ISSN 1179-1322. 5:2013) 1–14. doi: 10.2147/CMAR.S25537.

HARVEY LODISH; ARNOLD BERK; CHRIS A. KAISER; MONTY KRIEGER - **Molecular Cell Biology**. Seventh Ed ed. New York : Freeman, W. H. & Company, 2013. ISBN 9788578110796.

HATHAWAY, Amanda R.; BAKER, Mary Katherine; SONPAVDE, Guru - Emerging agents for the therapy of advanced prostate cancer. **Future Oncology**. 11:20 (2015) 2775–87.

HEIDENREICH, Axel *et al.* - EAU guidelines on prostate cancer. Part I: Screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. **European Urology**. . ISSN 03022838. 59:1 (2011) 61–71. doi: 10.1016/j.eururo.2010.10.039.

HENSEL, Janine; THALMANN, George N. - Biology of Bone Metastases in Prostate Cancer. **Urology**. . ISSN 00904295. 92:2016) 6–13. doi: 10.1016/j.urology.2015.12.039.

HOEKS, Cma Caroline M. A *et al.* - Prostate cancer: multiparametric MR imaging for detection, localization, and staging. **Radiology**. . ISSN 1527-1315. 261:1 (2011) 46–66. doi: 10.1148/radiol.11091822.

HOROSZEWICZ, Julius S. *et al.* - LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma. **ICANCER RESEARCH**. 43:1983) 1809–1818.

HSIAO, Yi-hsuan *et al.* - Clinical Application of High-intensity Focused Ultrasound in Cancer Therapy. **Journal of CANCER**. . ISSN 1837-9664. 7:2016) 225–231. doi: 10.7150/jca.13906.

HUANG, Haojie; TINDALL, Donald J. - The role of the androgen receptor in prostate cancer. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**. . ISSN 20443730. 12:3 (2002) 193–207. doi: 10.1002/tre.331.

HUMM, John L. *et al.* - Radium-223 in the treatment of osteoblastic metastases: A critical clinical review. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**. . ISSN 1879355X. 91:5 (2015) 898–906. doi: 10.1016/j.ijrobp.2014.12.061.

HUMPHREY, Peter A. - Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. **Modern Pathology**. . ISSN 0893-3952. 17:3 (2004) 292–306. doi: 10.1038/modpathol.3800054.

HUSSEIN, S.; SATTUNWAR, S.; KWAST, T. Van Der - Young-age prostate cancer. **Journal of clinical pathology**. . ISSN 1472-4146. 68:7 (2015) 511–5. doi: 10.1136/jclinpath-2015-202993.

INGLE, Sanjay P.; RAMONA, Ingle; SUKESH - The efficiency of the serum prostate specific antigen levels in diagnosing prostatic enlargements. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. . ISSN 2249782X. 7:1 (2013) 82–84. doi: 10.7860/JCDR/2012/4926.2676.

JAVIDAN, Javid *et al.* - The androgen receptor and mechanisms for androgen independence in prostate cancer. **Cancer investigation**. . ISSN 0735-7907. 23:6 (2005) 520–8. doi: 10.1080/07357900500202721.

JIN, Jung Kang; DAYYANI, Farshid; GALLICK, Gary E. - Steps in Prostate Cancer Progression that lead to Bone Metastasis. **Int J Cancer**. 11:128 (2011) 2545–2561. doi: 10.1002/ijc.26024.

JOINER, Michael; KOGEL, Albert Van Der - **Basic Clinical Radiobiology**. 4th. ed. Great Britain : Hodder Arnold, 2009. ISBN 978 0 340 929 667.

JOSHUA, A. M. *et al.* - Prostatic preneoplasia and beyond. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**. . ISSN 0304419X. 1785:2 (2008) 156–181. doi: 10.1016/j.bbcan.2007.12.001.

KAIGHN, M. E. *et al.* - Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). **Investigative urology**. . ISSN 0021-0005. 17:1 (1979) 16–23.

KASSIS, Amin I.; ADELSTEIN, S.James - Radiobiologic principles in radionuclide therapy. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**. . ISSN 0161-5505. 46 Suppl 1:1 (2005) 4S–12S. doi: 10.1093/ndt/46/1/4S [pii].

KATSOGIANNOU, Maria *et al.* - The hallmarks of castration-resistant prostate cancers. **Cancer Treatment Reviews**. . ISSN 15321967. 41:7 (2015) 588–597. doi: 10.1016/j.ctrv.2015.05.003.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. - **Pathologic Basis of Disease**. 9. ed. [S.l.] : Elsevier Inc, 2015. ISBN 9781455726134.

LIEPE, K.; SHINTO, A. - From palliative therapy to prolongation of survival: $^{223}\text{RaCl}_2$ in the treatment of bone metastases. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**. . ISSN 1758-8340. 8:4 (2016) 294–304. doi: 10.1177/1758834016640494.

LOGOTHETIS, Christopher J.; LIN, Sue-Hwa - Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. **Nature reviews. Cancer.** . ISSN 1474-175X. 5:1 (2005) 21–8. doi: 10.1038/nrc1528.

LUU, Hue H. *et al.* - An orthotopic model of human osteosarcoma growth and spontaneous pulmonary metastasis. **Clinical and Experimental Metastasis.** . ISSN 02620898. 22:4 (2005) 319–329. doi: 10.1007/s10585-005-0365-9.

MAFFIOLI, L. *et al.* - New radiopharmaceutical agents for the treatment of castration-resistant prostate cancer. **Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.** . ISSN 18244785. 59:4 (2015) 420–438. doi: 10.1002/14651858.CD010508.pub2.Corresponding.

MARZO, Angelo M. De *et al.* - Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature reviews. Cancer.** . ISSN 1474-175X. 7:4 (2007) 256–69. doi: 10.1038/nrc2090.

MAYGARDEN, Susan J.; PRUTHI, Raj - Gleason grading and volume estimation in prostate needle biopsy specimens: evolving issues. **American journal of clinical pathology.** . ISSN 00029173. 123 Suppl:Suppl 1 (2005) 58–66. doi: 10.1309/28FTJU4TB2D77242.

MCGANN, Shane; HORTON, Evan R. - Radium-223 Dichloride: A Novel Treatment Option for Castration-Resistant Prostate Cancer Patients With Symptomatic Bone Metastases. **Annals of Pharmacotherapy.** . ISSN 15426270. 49:4 (2015) 469–476. doi: 10.1177/1060028014565444.

MCNEAL, John E. - Origin and development of carcinoma in the prostate. **Cancer.** . ISSN 1097-0142. 23:1 (1969) 24–34. doi: 10.1002/1097-0142(196901)23:1<24::AID-CNCR2820230103>3.0.CO;2-I.

MCNEAL, John E. - The Zonal Anatomy of the. **The Prostate.** . ISSN 0739-9529. 2:1981 (1981) 35–49. doi: 10.1055/s-2008-1075885.

MCNEAL, John E. - Normal Histology of the Prostate. **The American Journal of Surgical Pathology.** 12:8 (1998) 619–633.

MCPARLAND, Brian J. - **Nuclear Medicine Radiation Dosimetry.** United Kingdom : Springer, 2010. ISBN 9781848821255.

MENDES, Fernando José Figueiredo Agostinho D'Abreu - **CARATERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO EM NEOPLASIAS** Estudo experimental em linfoma e carcinoma do pulmão de pequenas células. [S.l.] :

Faculdade de Medicina Da Universidade de Coimbra, 2016

MERSEBURGER, Axel S. *et al.* - Perspectives on treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. **The oncologist**. . ISSN 1549-490X. 18:5 (2013) 558–67. doi: 10.1634/theoncologist.2012-0478.

MILLER, Kurt *et al.* - The Continuing Role of PSA in the Detection and Management of Prostate Cancer. **European Urology Supplements**. . ISSN 15699056. 6:3 (2007) 327–333. doi: 10.1016/j.eursup.2006.12.001.

MILLER, R. E.; SWEENEY, C. J. - Chemotherapy for metastatic castrate-sensitive prostate cancer. **Prostate cancer and prostatic diseases**. . ISSN 1476-5608 (Electronic). 19:2 (2016) 139–144. doi: 10.1038/pcan.2016.10.

MONTEIRO, Pedro Gomes - Terapêutica e Seguimento do Carcinoma da Próstata. **Acta Urológica**. 23:3 (2006) 89–92.

MOUL, Judd W. *et al.* - Prostate Cancer. **Cancer Network**. November (2015) 1–38.

NCCN - **National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Prostate Cancer**. [Em linha], atual. 2016. [Consult. 27 mai. 2016]. Disponível em WWW:<URL:http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate.pdf>.

NILSSON, Jenny *et al.* - Cancer Cell Radiobiological Studies Using In-House-Developed α -Particle Irradiator. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**. . ISSN 1557-8852. 30:9 (2015) 386–94. doi: 10.1089/cbr.2015.1895.

NILSSON, Sten - Radionuclide Therapies in Prostate Cancer: Integrating Radium-223 in the Treatment of Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. **Current Oncology Reports**. . ISSN 1523-3790. 18:2 (2016) 14. doi: 10.1007/s11912-015-0495-4.

NING, Yien *et al.* - Evolution of androgen receptor targeted therapy for advanced prostate cancer. **Nature Publishing Group**. . ISSN 1759-4782. 11:6 (2014) 365–376. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.72.

PALLER, Channing J.; ANTONARAKIS, Emmanuel S. - Cabazitaxel: A novel second-line treatment for metastatic castration-resistant prostate cancer. **Drug Design, Development and Therapy**. . ISSN 11778881. 5 (2011) 117–124. doi: 10.2147/DDDT.S13029.

PANDIT-TASKAR, Neeta; LARSON, Steven M.; CARRASQUILLO, Jorge A - Bone-Seeking Radiopharmaceuticals for Treatment of Osseous Metastases, Part I: α Therapy with ^{223}Ra -Dichloride. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**. . ISSN 1535-5667. 55:2 (2014) 268–274. doi: 10.2967/jnumed.112.112482.

PARKER, C. *et al.* - Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer. **New England Journal of Medicine**. . ISSN 0028-4793. 369:3 (2013) 213–223. doi: 10.1056/NEJMoa1213755.

PATEL, A. R.; KLEIN, E. A. - Risk factors for prostate cancer. **Nat Clin Pract Urol**. . ISSN 1743-4270. 6:2 (2009) 87–95. doi: ncpuro1290 [pii]\r10.1038/ncpuro1290.

PEDROSA, L. - **Hipóxia: um fator chave na regulação do cancro da próstata**. [S.l.] : Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2012

PODGORSAK, E. B. - **Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students**. Vienna : [s.n.]. ISBN 9201073046.

RAMON, Jacob; DENIS, Louis J. - Prostate Cancer. Em RAMON, JACOB; DENIS, LOUIS J. (Eds.) - **Recent Results in Cancer Research (2007)**. [S.l.] : Springer Berlin Heidelberg, 2007. ISBN 978-3-540-40901-4v. 157. p. 7250–7257.

RHIM, J. S. *et al.* - Transformation of human cells in culture by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. **Nature**. . ISSN 0028-0836. 256:5520 (1975) 751–3.

RHIM, J. S. *et al.* - Characterization of human cells transformed in vitro by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. **International journal of cancer**. . ISSN 0020-7136. 19:4 (1977) 505–10.

RODRIGUES, S. *et al.* - ACTA Urológica Portuguesa. 31:1–2 (2014) 36–40.

ROEHRBORN, CG - Pathology of benign prostatic hyperplasia. **International Journal of Impotence Research**. 20:11–18 (2008). doi: 10.1038/ijir.2008.55.

SANTOS, A. F.; HUANG, H.; TINDALL, D. J. - The androgen receptor: A potential target for therapy of prostate cancer. **Steroids**. . ISSN 0039128X. 69:2 (2004) 79–85. doi: 10.1016/j.steroids.2003.10.005.

SARAON, Punit; JARVI, Keith; DIAMANDIS, Eleftherios P. - Molecular alterations during progression of prostate cancer to androgen independence. **Clinical Chemistry**. . ISSN

00099147. 57:10 (2011) 1366–1375. doi: 10.1373/clinchem.2011.165977.

SARKAR, Saradwata; DAS, Sudipta - A Review of Imaging Methods for Prostate Cancer Detection Supplementary Issue: Image and Video Acquisition and Processing for Clinical Applications. **Biomedical engineering and computational Biology**. . ISSN 1179-5972. 77:SISI (2016) 1–15. doi: 10.4137/BecB.S34255.

SCIARRA, Alessandro *et al.* - Prostate growth and inflammation. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. . ISSN 09600760. 108:3–5 (2008) 254–260. doi: 10.1016/j.jsbmb.2007.09.013.

SELEEM, Amin Abdou; LASHEIN, Fakhr El-Din M. - Effect of verapamil on some of the pro- and apoptotic factors during prenatal retinal differentiation of mice, *Mus musculus*. **The Journal of Basic & Applied Zoology**. . ISSN 20909896. 75:2016) 28–35. doi: 10.1016/j.jobaz.2016.05.001.

SHAH, Rajal B.; ZHOU, Ming - Recent advances in prostate cancer pathology: Gleason grading and beyond. **Pathology International**. . ISSN 14401827. 66:5 (2016) 260–272. doi: 10.1111/pin.12398.

SHEN, Mm; ABATE-SHEN, C. - Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. **Genes & development**. 212 (2010) 1967–2000. doi: 10.1101/gad.1965810.GENES.

SHIRLEY, Matt; MCCORMACK, Paul L. - Radium-223 dichloride: A review of its Use in patients with castration-resistant prostate cancer with symptomatic bone metastases. **Drugs**. . ISSN 11791950. 74:2014) 579–586. doi: 10.1007/s40265-014-0198-4.

SHORE, Neal D. - Radium-223 Dichloride for Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer: The Urologist's Perspective. **Urology**. . ISSN 00904295. 85:4 (2015) 717–724. doi: 10.1016/j.urology.2014.11.031.

SIEGEL, Rebecca *et al.* - Cancer Treatment and Survivorship Statistics , 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. . ISSN 00079235. 62:5 (2012) 220–241. doi: 10.3322/caac.21149.

STAVRIDIS, S. *et al.* - Screening for prostate cancer: A controversy or fact. **Hippokratia**. . ISSN 11084189. 14:3 (2010) 170–175.

STRAUSS, H.William *et al.* - **Nuclear oncology: pathophysiology and clinical applications**. New Y : Springer, 2013. ISBN 978-0-387-48894-3.

STROBER, Warren - Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. Em **Current Protocols in Immunology**. Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc., 2001

SUOMINEN, Mi *et al.* - Radium-223 dichloride exhibits dual mode-of-action inhibiting both tumor and tumor-induced bone growth in two osteoblastic prostate cancer models. Em

SVERRISSON, Einar; JONES, J.Stephen; POW-SANG, Julio M. - Cryosurgery for prostate cancer: A comprehensive review. **Archivos Espanoles de Urologia**. . ISSN 00040614. 66:6 (2013) 546–556.

TAI, Sheng *et al.* - PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. **Prostate**. . ISSN 02704137. 71:15 (2011) 1668–1679. doi: 10.1002/pros.21383.

TAN, Mh Eileen *et al.* - Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. **Acta pharmacologica Sinica**. . ISSN 1745-7254. 36:1 (2014) 1–21. doi: 10.1038/aps.2014.18.

TU, Shi-Ming; BILEN, Mehmet Asim; LIN, Sue-Hwa - Radium-223 : Optimizing Treatment and Research of Osteoblastic Bone Metastasis. **Cancer Network**. 153:2015) 4–7.

TURKBEY, Baris; PINTO, Peter A.; CHOYKE, Peter L. - Imaging techniques for prostate cancer: implications for focal therapy. **Nature Reviews Urology**. . ISSN 1759-4820. 6:4 (2009) 191–203. doi: 10.1038/nrurol.2009.27.

VALLABHAJOSULA, Shankar; KILLEEN, Ronan P.; OSBORNE, Joseph R. - Altered Biodistribution of Radiopharmaceuticals: Role of Radiochemical/Pharmaceutical Purity, Physiological, and Pharmacologic Factors. **Seminars in Nuclear Medicine**. . ISSN 00012998. 40:4 (2010) 220–241. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2010.02.004.

VERMA, Sadhna; RAJESH, Arumugam - A clinically relevant approach to imaging prostate cancer: Review. **American Journal of Roentgenology**. . ISSN 0361803X. 196:3 SUPPL. (2011) 1–10. doi: 10.2214/AJR.09.7196.

WEISENTHAL, L. M. *et al.* - A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. **Cancer research**. . ISSN 0008-5472. 43:2 (1983) 749–57.

WONG, Ka Kit; PIERT, Morand - Regarding Dynamic Bone Imaging with ^{99m}Tc-Labeled Diphosphonates and ^{18F}-NaF: Mechanisms and Applications. **Journal of Nuclear Medicine**. 54:4 (2013) 590–599. doi: 10.2967/jnumed.112.114298.

ZEIGLER-JOHNSON, Charnita M. *et al.* - Genetic susceptibility to prostate cancer in men of African descent: implications for global disparities in incidence and outcomes. **The Canadian journal of urology**. . ISSN 11959479. 15:1 (2008) 3872–3882. doi: 10.1016/j.bbi.2008.05.010.

ZHOU, Y. F. - High intensity focused ultrasound in clinical tumor ablation. **World J. Clin. Oncol.** 2:1 (2011) 8–27. doi: 10.5306/wjco.v2.i1.TOPIC.

ZUSTOVICH, Fable; FABIANI, Francesca - Therapeutic opportunities for castration-resistant prostate cancer patients with bone metastases. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. . ISSN 18790461. 91:2 (2014) 197–209. doi: 10.1016/j.critrevonc.2014.01.003.