

Sarah Beatriz de Oliveira Pagliaro

# Cancro da Próstata: Efeitos da quimioterapia *in vitro* em células estaminais cancerígenas

Dissertação de Mestrado em Tecnologias do Medicamento, orientada pelo Professor Doutor João Nuno  
Moreira e pelo Doutor Pedro Castelo-Branco e apresentada à Faculdade de  
Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Imagem da capa: Células PC3 (retirada de Anne Ridley et al., 2011, BMC Biology)

## Agradecimentos

Agradeço ao Professor João Nuno Moreira, não somente pela sua orientação mas também pelo apoio nos momentos difíceis e por me guiar para a progressão e amadurecimento durante todo esse trajeto.

Ao Doutor Pedro Castelo-Branco por sua orientação e conselhos. À Associação Portuguesa de Urologia/Astellas 2011 e ao Ricardo Leão pelo apoio financeiro a este projeto. Ao Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC) pela cedência de espaço e estruturas.

Aos meus colegas do CNC, que considero como verdadeiros amigos, sem os quais este percurso seria muito mais difícil. Em particular ao " grupo JN": Nuno, Ângela, Ana G e Vanessa, pelos ensinamentos e suporte e aos demais componentes do VGTG, em especial à Isabel Onofre por sua ajuda e paciência. Aos funcionários e técnicos do CNC, em especial à D. Isabel e Diana. À Isabel Nunes, pelas aulas de citometria.

Ao Pedro, por seu carinho, apoio e incentivo. Sua presença foi essencial. À Flávia e à Martinha, por fazerem meus dias mais alegres em Coimbra.

E principalmente, aos meus pais, à minha irmã e demais familiares, pelo voto de confiança, pelas palavras de conforto e incentivo que encurtaram a distância nos momentos de saudade. Sem vocês, nada disto seria possível.

# Índice

<b>I. Abstract.....</b>	<b>8</b>
<b>II. Resumo.....</b>	<b>10</b>
<b>I. Introdução.....</b>	<b>12</b>
1.1 Anatomia e função da próstata.....	12
1.2 O cancro da próstata, possíveis causas e tratamentos.....	13
1.3 As CECs e suas características.....	16
1.3.1 As CEC no cancro da próstata.....	18
1.3.1.1 Atividade da aldeído desidrogenase (ALDH).....	18
1.4 Resistência à terapêutica no cancro da próstata.....	18
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>20</b>
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>21</b>
3.1 Linhas Celulares.....	21
3.2 Fármacos.....	22
3.2.1 Docetaxel.....	22
3.2.2 5-azacitidina.....	22
3.2.3 Bicalutamina.....	23
3.3 Determinação das curvas de crescimento para as linhas celulares e do IC <sub>50</sub> dos fármacos.....	23
3.3.1 Curva de crescimento.....	23
3.3.2 Citotoxicidade e IC <sub>50</sub> .....	24
3.4 Identificação das células com elevada expressão de atividade da enzima aldeído desidrogenase (ALDH).....	25
3.4.1 ALDEFLUOR™ assay kit.....	25

3.4.1.1 Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH em células PC3 após o tratamento com docetaxel por 24, 48, 72 e 96 horas.....	27
3.4.1.2 Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH em células PC3 e DUI45 após tratamento com bicalutamida e citostáticos (docetaxel e 5-AzaC) por 4, 8, 24 e 48 horas.....	28
3.4.1.3 Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH em células PC3 e DUI45 após tratamento com citostáticos por 24 e 48 horas e 192 horas de incubação.....	30
<b>3.5</b> Avaliação da viabilidade celular após incubação com citostáticos e bicalutamida.....	32
<b>3.6</b> Avaliação da capacidade clonogénica das células PC3 e DUI45 após incubação com citostáticos.....	33
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>35</b>
4.1 Avaliação da expressão de CD44/CD133, marcadores de células estaminais em células de cancro da próstata.....	35
4.2 Avaliação do efeito de citostáticos na atividade de ALDH em células PC3 e DUI45.....	36
4.2.1 Avaliação da expressão da atividade de ALDH e expressão de CD44 em células PC3 após tratamento com docetaxel por 24, 48, 72 e 96 horas.....	37
4.2.2 Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH em células PC3 e DUI45 após tratamento com bicalutamida e citostáticos (docetaxel e 5-AzaC) por 4, 8, 24 e 48 horas.....	39
4.2.3 Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH em células PC3 e DUI45 após tratamento com citostáticos por 24 e 48 horas com um maior intervalo entre as incubações.....	50
4.3 Avaliação da capacidade clonogénica das células PC3 e DUI45 após incubação com citostáticos.....	55
<b>5. Conclusão.....</b>	<b>60</b>
<b>6. Referências.....</b>	<b>62</b>

## Abreviaturas

**5-AzaC** - 5-azacitidina

**ADN** - Ácido Desoxirribonucleico

**ALDH** - Aldeído Desidrogenase

**Alfa-MEM** - Alfa Modifications – Minimum Essential Medium

**APU** - Associação Portuguesa de Urologia

**ARN** - Ácido Ribonucleico

**ATCC** - American Type Culture Collection

**BAA** - BODIPY<sup>TM</sup>- aminoacetato

**BAAA** - BODIPY<sup>TM</sup>- aminoacetaldeído

**BAAA-DA** - BODIPY<sup>TM</sup>- aminoacetaldeído – dietil - acetal

**Bcl-2** - B-Cell Lymphoma 2

**BSA** - Bovine Serum Albumin

**CaP** - Cancro da Próstata

**CEC** - Célula Cancerígena Estaminal

**CIT** - Célula Iniciadora do Tumor

**CK** - Queratina

**DCTX** - Docetaxel

**DEAB** - Dietilaminobenzaldeído

**FADH** - Flavina Adenina Dinucleótido Radical da Forma Reduzida

**FMNH** - Mononucleótido de Flavina Radical da Forma Reduzida

**HEPES** - Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico

**LHRH** - Hormona Libertadora da Hormona Luteinizante

**LMA** - Leucemia Mielóide Aguda

**NADH** - Nicotiamida Adenina Dinucleótido Radical da Forma Reduzida

**NADPH** - Nicotiamida Adenina Dinucleótido Fosfato Oxidase

**NaHCO<sub>3</sub>** - Bicarbonato de Sódio

**PAP** - Fosfatase Ácida Prostática

**PBS** - Tampão Fosfato Salino

**PenStrep** - Penicillina + Estreptomicina

**PSA** - Antígeno Específico da Próstata

**RPMI** - Roswell Park Memorial Institute Medium

## I. Abstract

Prostate cancer is one of the most incident cancers in the world and a leading cause of cancer death in men. Its diagnosis affects not only the patient physically, but also emotionally. The prognosis is usually hopeful when the disease is diagnosed at the earlier stages. However, due to its generally slower progression, the patient is often diagnosed at later stages, when the disease usually begins to manifest symptoms. So doctors and health committees around the world have been warning about the importance of preventive screenings and adopting healthy lifestyle habits.

One of the main therapeutic approaches to prostate cancer is hormone therapy. It is known that the prostate tumor is sensitive to the presence of testosterone and many of its cells' proliferation depend on this hormone. The hormone therapy normally leads to the patient castration level – when testosterone levels reach almost zero - which results in large changes in the patient's organism, from metabolic disorders until behavioral changes, since this hormone is closely linked to the male gender and their specific characteristics.

Despite side effects, hormone therapy has proven very effective in preventing the growth of prostate cancer. The disease gets a worrying prognosis when it begins to show resistance to hormonal therapy. At this stage, prostate cancer becomes progressive with great chances to become "incurable". Although chemotherapy is sometimes used in the early stages of the disease, it is usually used in the progressive phase. The use of different classes of drugs for improving the treatment's effect is very common. However, there are still cases where the tumor is resistant.

The resistance to cancer therapy has been studied for many decades. A special group of cells has been arising the interest of researchers due to the evidence that they are able to renew the tumor and resistant to any therapeutic approach. These cells are named cancer stem cells.

Cancer stem cells are similar to normal stem cells in proliferation and self-renewal capacity, in the ability to remain in a latent state for long periods and for their potential to differentiate into other tissues. They are able to originate a tumor with the same characteristics when transplanted into mice.

However, there is still a long way to complete understanding of the mechanisms involved in the origin and function of cancer stem cells. One of the biggest challenges has been the differentiation between these cells and the others. The search for markers has been a major

target of research in this context. Many markers have already been described, among them a family of enzymes - the aldehyde dehydrogenases (ALDH).

The high expression of this enzyme has been associated to the presence of cancer stem cells. Because of this evidence, in this study we decided to assess expression levels of this enzyme and the presence of other markers - CD44/CD133 – after cancer cells PC3 and DU145 have been exposed *in vitro* to the action of two chemotherapeutic agents already used in the clinic: the antimitotic docetaxel and 5- azacytidine, an inhibitor of methyl transferase.

The results showed that cancer cells exhibited increased expression of this enzyme after incubation with these drugs. In clonogenic assays, even after incubation for 96 hours with the drug, the cells were still able to form colonies.

In summary, the results of this project were not sufficient to clarify the involvement of cancer stem cells in the development of tumor resistance to therapy, but helped to raise issues around this topic. There is still a long way to go and many experiments to be carried out in order to explain the mechanisms involved in the chemotherapeutic resistance.

## II. Resumo

O cancro da próstata é um dos tipos de cancro mais incidentes no mundo e uma das principais causas de morte por cancro em homens. O seu diagnóstico afeta o doente quer física, quer emocionalmente. Há bons prognósticos quando a doença é diagnosticada precocemente. No entanto, devido à sua progressão normalmente mais lenta, o doente costuma ser diagnosticado somente nos estádios mais avançados, quando a doença começa a manifestar sintomas. Por isso médicos e comités de saúde de todo o mundo têm vindo a alertar para a importância dos exames preventivos e da adoção de hábitos de vida saudáveis.

Uma das principais abordagens terapêuticas do cancro da próstata é a hormonoterapia. Sabe-se que o tumor prostático é sensível à presença da testosterona e muitas das suas células dependem dessa hormona para proliferarem. A hormonoterapia normalmente leva o doente ao nível de castração – ou seja, com os níveis de testosterona quase nulos – o que acarreta grandes mudanças no organismo do doente, desde alterações do metabolismo até mudanças comportamentais, uma vez que esta hormona se encontra intimamente ligada ao sexo masculino e às suas características específicas.

Apesar dos efeitos indesejados, a hormonoterapia tem-se mostrado bastante eficaz no impedimento do crescimento do cancro da próstata. A doença ganha um prognóstico preocupante quando começa a demonstrar resistência à terapia hormonal. Nesse estádio, o cancro da próstata passa a ser progressivo, podendo tornar-se “incurável”. A quimioterapia, embora utilizada em alguns casos nas fases iniciais da doença, normalmente é utilizada na fase progressiva. É comum a mistura de fármacos de diferentes classes para melhorar o efeito do tratamento. Porém, ainda assim há casos em que o tumor se mostra resistente.

A resistência à terapêutica do cancro tem vindo a ser estudada há muitas décadas. Um grupo especial de células tem despertado o interesse dos investigadores devido às evidências de que são capazes de renovar o tumor e pelo fato de serem resistentes a qualquer abordagem terapêutica. Essas células são denominadas células estaminais cancerígenas.

As células estaminais cancerígenas assemelham-se às células estaminais normais pela sua capacidade de proliferação e autorrenovação, pela possibilidade de permanecerem em estado de latência por longos períodos e pelo seu potencial de diferenciação em outros tecidos. São capazes de formar um tumor com as mesmas características quando transplantadas em ratinhos.

Porém, ainda há um grande percurso para a completa compreensão dos mecanismos envolvidos na origem e função das células estaminais cancerígenas. Um dos maiores desafios tem vindo a ser a distinção destas células em relação às outras. A procura por marcadores tem sido um dos principais alvos de investigação neste contexto. Muitos marcadores já estão descritos, entre eles, uma família de enzimas – as aldeído desidrogenases (ALDH).

A expressão de elevada atividade desta enzima tem sido associada à presença de células estaminais cancerígenas. Devido a essas evidências, neste estudo decidimos avaliar os níveis de expressão desta enzima e a presença de outros marcadores estaminais – CD44/CD133 após as células cancerígenas PC3 e DUI45 terem sido expostas, *in vitro*, à ação de dois citostáticos já utilizados em clínica: o anti-mitótico docetaxel e 5-azacitidina, um inibidor da metil transferase.

Os resultados demonstraram que após tratamento com o docetaxel, as células PC3 e DUI45 mostraram um aumento significativo na população de células com elevada expressão de atividade ALDH (até 20% vezes de aumento) pelo método ALDEFLUOR. O mesmo foi observado com 5-azacitidina onde foi observado aumento de até 18%. Curiosamente, quando usamos a bicalutamida não foram observadas quaisquer alterações na população das células ALDH positivas antes e após o tratamento. Isto era esperado uma vez que a bicalutimida é um fármaco análogo da testosterona e depende da presença de recetores de androgénio, que não estão presentes nas linhas celulares testadas. Além disso, os resultados foram confirmados usando ensaios clonogénicos onde as células após um longo período de incubação com o fármaco e permaneceram algum tempo em estado de latência e posteriormente voltaram a formar colónias.

Em suma, os resultados obtidos neste projeto levantam hipóteses em torno do envolvimento das células estaminais cancerígenas com o desenvolvimento de resistência à terapêutica do tumor. Há ainda um longo caminho a percorrer e inúmeras experiências a serem realizadas, como identificar quais vias metabólicas são ativadas após o tratamento e responsáveis por quimiorresistência. Isso levaria a revelar novos alvos terapêuticos que poderiam ser desenvolvidas para atingir especificamente as células estaminais cancerígenas e, portanto, evitar a recorrência do tumor.

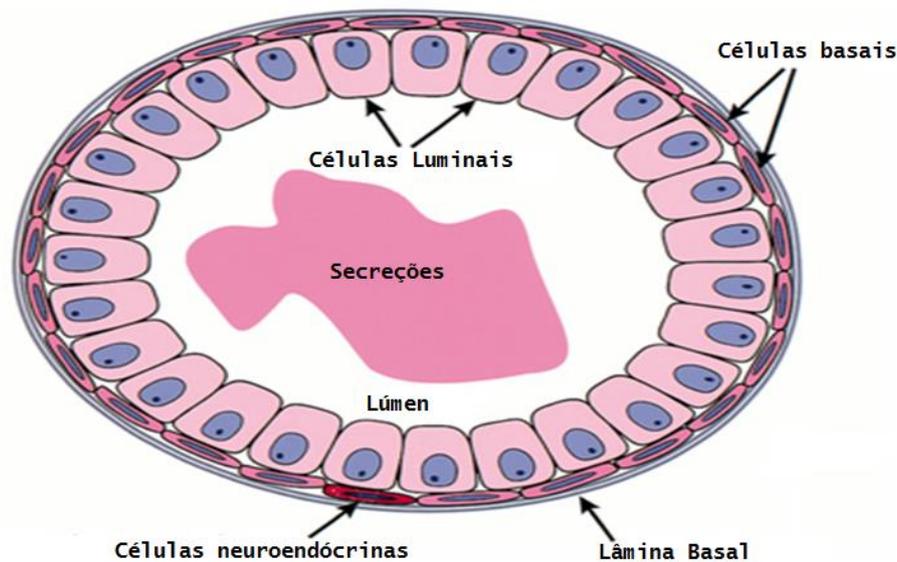
## I. Introdução

### I.1 Anatomia e funções da próstata.

A próstata é uma glândula do tamanho de uma noz que se situa ao redor da uretra e em baixo da bexiga. Em conjunto com as vesículas seminais é responsável pela produção do sêmen. Devido a sua localização anatômica, distúrbios que acarretam um aumento do tamanho da próstata, sejam eles benignos ou malignos, podem diminuir o calibre da uretra e ocasionar um bloqueio total ou parcial do fluxo de urina (Associação Portuguesa de Urologia, 2012).

Ao nível anatômico celular, a próstata é formada por vários tipos de células, das quais se destacam as células basais, as células secretoras luminais e as células neuroendócrinas (Figura 1). As células secretoras luminais são células colunares, voltadas para o lúmen, responsáveis pela produção do antígeno prostático específico (PSA) e da fosfatase ácida prostática (PAP). As células basais são arredondadas, androgénio-independentes, com expressão de queratinas de alto peso molecular (CK), expressão de CD44 como marcador de superfície e de bcl-2, um oncogene anti-apoptótico. As neuroendócrinas são consideradas células terminais não proliferativas que não expressam recetor de androgénio nem bcl-2. Acredita-se na existência de uma transição entre estas células, especialmente entre as basais e as secretoras (Long, Morrissey et al. 2005). Isaac e Coffey (1989) levantaram a hipótese de que as células basais possuem características estaminais, sendo capazes de formar todas as células epiteliais da próstata. A transição entre as células é reforçada pelas evidências demonstradas na identificação de células, denominadas intermediárias, que apresentavam características mistas das células basais, secretoras e neuroendócrinas (Collins, Berry et al. 2005).

Um distúrbio desta organização celular pode causar diversas patologias, inclusive o cancro da próstata, que normalmente é caracterizado pela proliferação e crescimento anormal de determinadas células.



**Figura 1: Anatomia celular da próstata.** (Adaptado de Abrahamsson P.A, *Neuroendocrine differentiation and hormone refractory prostate cancer*, 1996).

## 1.2 O cancro da próstata, possíveis causas e tratamentos

O cancro da próstata (CaP) é uma doença heterogénea cujos mecanismos não são totalmente conhecidos. É o quinto tipo de cancro mais comum no mundo, sendo o segundo mais frequentemente diagnosticado e o sexto que causa maior número de óbitos entre o sexo masculino. Em 2008, cerca de 28000 casos foram diagnosticados na Europa, 5140 somente em Portugal (GLOBOCAN 2008, International Agency for Research on Cancer, 2008). Estes dados epidemiológicos reforçam a importância da contínua procura por um maior conhecimento que vise à perfeita compreensão da fisiopatologia desta doença.

Segundo a Associação Portuguesa de Urologia (APU), o cancro da próstata diferencia-se dos demais cancros pelo seu processo neoplásico lento e pouco agressivo, o que faz com que muitas vezes o doente só apresente sintomas nas fases mais avançadas da doença. Os principais fatores de risco para o cancro da próstata são a idade (mais de 70% dos casos são diagnosticados acima dos 65 anos), fatores genéticos (como em quase todos os tipos de cancro e em outras patologias, quando se há um histórico familiar da doença, há um maior risco do doente em adquiri-la), distúrbios hormonais, fatores ambientais (p.e. poluição, exposição a substâncias químicas) e a obesidade, como recentes estudos têm apontado, porém ainda sem comprovação científica.

Inicialmente acreditava-se que o cancro da próstata fosse originário das células secretoras luminais, uma vez que os níveis de PSA e PAP apresentam alterações significativas. No entanto, foi demonstrado posteriormente que algumas células possuíam muitas características típicas das células basais, como presença de bcl-2 e ausência de recetor de androgénio, por exemplo. Há ainda tipos de CaP ligados às células neuroendócrinas, que são mais agressivos e menos frequentes (Long, Morrissey et al. 2005).

Vários tipos celulares específicos do CaP já foram identificados e estudados, sendo as LNCaP, as DUI45, as PC-3 e derivadas, linhas celulares comumente utilizadas na investigação.

As LNCaP são células hormonossensíveis, ou seja, apresentam recetores de androgénio, secretam PSA e PAP e estão presentes nas versões menos graves do CaP. As DUI45 e as PC3 são células androgénio-independentes (não expressam recetores de androgénio), não secretam PSA e PAP, apresentam bcl-2 e fazem parte do grupo de células responsáveis pelas formas mais resistentes da doença (Collins, Berry et al. 2005).

O diagnóstico pode ser realizado por diversas formas, como por exemplo, toque retal, medida dos níveis de PSA, análise da urina e ecografia, aliados aos sintomas e à análise realizada pelo médico.

Entre as terapêuticas disponíveis, destacam-se aquelas com intuito curativo (p.e.: abordagem cirúrgica radical ou radioterapia externa) e outras que visam apenas o controlo da doença e sua progressão (p.e.: hormonoterapia e quimioterapia) (van den Bergh, Albertsen et al. 2013).

A seleção do tratamento mais adequado é baseada na esperança de vida do doente, no PSA, no Score de Gleason, na fase da doença, nas comorbilidades, nos efeitos secundários e na preferência do doente (Angelo Oliveira 2005).

### Quimioterapia

Segundo a Sociedade Americana do Cancro, a quimioterapia é normalmente aplicada em doentes que apresentam metástase, uma vez que os fármacos são administrados por via endovenosa, sendo capazes de atingir até os tumores mais distantes. Esta terapia costuma ser adotada apenas quando a doença se torna progressiva e já não responde bem a outras terapias, devido aos efeitos secundários normalmente apresentados pelo doente em função

do mecanismo de ação dos fármacos, como por exemplo, a queda de cabelo, náuseas e vômito, fadiga, baixa resistência a infecções, entre outros.

Normalmente, na quimioterapia, do cancro da próstata e de outros cancros, são utilizadas combinações de vários fármacos, cada um com uma diferente abordagem terapêutica, como por exemplo: os inibidores da topoisomerase (p.e: amsacrina), os agentes alquilantes (p.e: cisplatina), os antimetabólitos (p.e 5-Fluorouacil), os anti-mitóticos (p.e docetaxel), antibióticos anti-tumorais (p.e doxorrubicina), os anticorpos monoclonais (p.e cetuximab), inibidores da metil transferase (p.e 5-azacitidina), entre outros (Pazdur, Kudelka et al. 1993; Bertram G. Katzung 2005; Silverman and Mufti 2005).

### Hormonoterapia

Nos anos 40, Charles Huggins e Clarence Hodges (Prémio Nobel da Medicina em 1966) indicaram que a testosterona desempenha um papel importante na homeostasia e carcinoma da próstata, evidenciando que baixos valores de testosterona (obtidos por castração cirúrgica) impediam a progressão da doença. Desde então, a terapia hormonal tem sido amplamente utilizada na clínica. Esta terapia consiste em bloquear o acesso das células tumorais à hormona testosterona, levando o doente à castração (Wilding, Chen et al. 1989). Este bloqueio ocorre por, basicamente, duas estratégias: 1) bloqueio da produção da hormona a nível central com inibidores da hormona libertadora de hormona luteinizante (LHRH) – p.e, leuprorrelina; 2) uso de fármacos com estrutura semelhante à testosterona que competem pela ligação ao recetor de androgénio (p.e: bicalutamida).

No entanto, em muitos casos o doente deixa de responder à hormonoterapia e a doença avança. Linlin Zhang et al. (2011) dizem que “o cancro da próstata é letal a partir do momento em que adquire uma forma resistente à castração, tornando-se incurável devido à escassa compreensão das origens celulares e mecanismos envolvidos”.

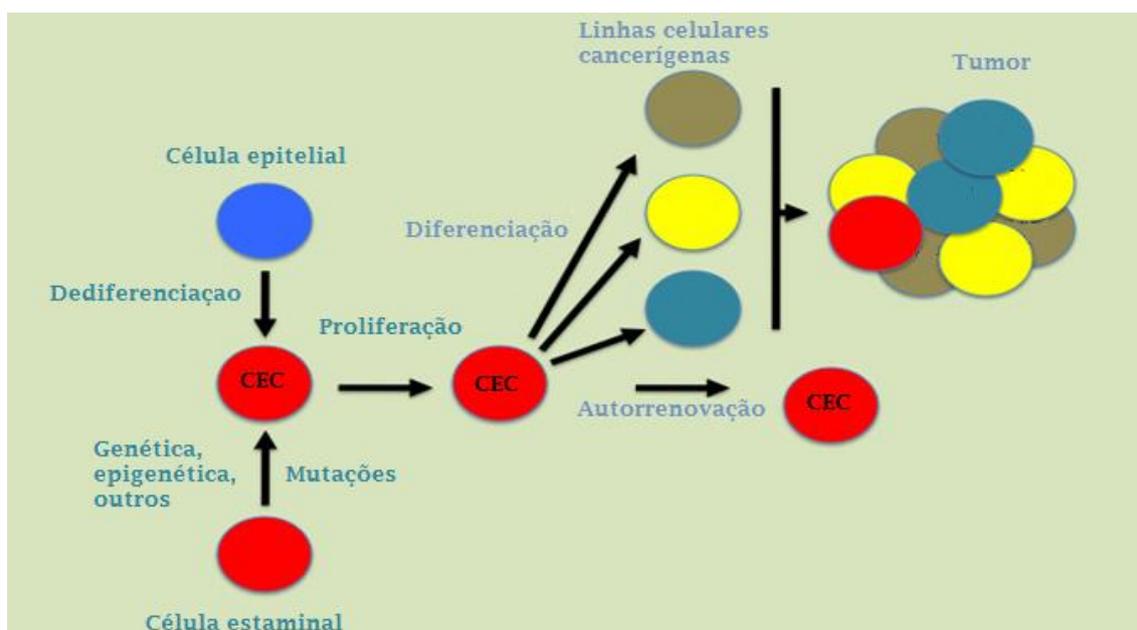
A compreensão dos mecanismos celulares e moleculares é a chave fundamental no entendimento do processo patológico. Diferentes tipos de células, diferentes genes, proteínas e vias de sinalização têm sido observados como fatores importantes na oncogénese e na progressão da doença. Esta procura pela compreensão fez despertar o interesse sobre um grupo de células muito específico, conhecido como células estaminais cancerígenas (CECs). Vários estudos têm demonstrado o envolvimento destas células na

patogénese da doença oncológica, sobretudo na doença progressiva, devido às suas propriedades específicas.

### 1.3 As CECs e suas características

Nas últimas décadas, muito se tem discutido sobre as células estaminais cancerígenas, desde os mecanismos de origem, possíveis marcadores, técnicas de enriquecimento, isolamento, até mesmo questões que envolvem a própria denominação do termo “célula estaminal”. Jane E. Visvader (2011) afirma que é importante salientar que a “célula de origem”, ou seja, a célula normal que primeiramente adquire características mutantes e promotoras do cancro, não está necessariamente relacionada com as células estaminais cancerígenas. Os conceitos de “células de origem” e CEC referem-se às células iniciadoras do tumor e células propagadoras do tumor, respetivamente.

As CECs possuem um perfil semelhante às células estaminais normais (a) capacidade de autorrenovação e proliferação, (b) capacidade de se manterem em estado latente por longos períodos e (c) facilidade de colonizar e de se diferenciar em outros tecidos. No entanto distinguem-se das normais, sobretudo pela sua capacidade em gerar tumores fenotipicamente idênticos aos iniciais quando injetadas em animais imunodeprimidos (Clevers 2011) (Figura 2).



**Figura 2:** Esquema ilustrado sobre as hipóteses das origens das células estaminais cancerígenas (CEC). (Adaptado de: Seufferlein et al. *Cell Communication and Signaling* 2009 7:19).

Bonnet et al. (1997) descreveram em estudos iniciais o fenótipo das CECs provenientes de uma Leucemia Mieloide Aguda (LMA), demonstrando que somente as células que continham marcadores específicos expressos eram capazes de gerar LMA em ratos imunodeprimidos, através de xenotransplante.

O cancro, segundo varias descrições, é composto por células com diferentes potenciais de proliferação que originam descendentes e estabelecem uma organização hierárquica constituída basicamente por: CECs, células de amplificação transitória e células de diferenciação terminal (Pfeiffer and Schalken 2010).

Ainda não é totalmente compreendido como é que as células adquirem características estaminais, sendo levantadas várias hipóteses: (a) as CECs são provenientes de uma transformação das células de amplificação transitória, (b) resultam de células que perderam a sua diferenciação e adquiriram características estaminais (Bonnet and Dick 1997) (c) podem ser originadas através da fusão com outros tipos de células, incluindo outras CECs, células progenitoras, diferenciadas, do estroma ou células inflamatórias (Li and Tang 2011).

### 1.3.1 As CECs no cancro da próstata

As CECs têm características muito semelhantes às células cancerígenas normais, o que torna difícil o seu isolamento. Alguns marcadores já foram descritos como específicos das CECs do cancro da próstata. Collins et al. (2005) definiram o fenótipo das células estaminais do cancro da próstata como  $CD44^+/\alpha2\beta1^{++}/CD133^+$ , no qual o  $CD44^+$  estaria relacionado com o fenótipo de células cancerígenas normais e o  $CD133^+$  seria o indicador da característica estaminal. Vários marcadores tem também sido descritos, como a citoqueratina 5 (CK5) - um indicador de origem basal, o oncogene bcl-2 e o antígeno de célula estaminal I (Sca-1) (Burger, Gupta et al. 2009; Batts, Machado et al. 2011).

Outro marcador que tem ganho destaque é a enzima aldeído desidrogenase (ALDH). As aldeído desidrogenases (ALDHs) compõem uma família de enzimas que oxidam aldeídos e têm funções muito importantes no desenvolvimento da homeostasia epitelial. Em contrapartida, uma desregulação dessa classe de enzimas poderá acarretar o desenvolvimento de diversas neoplasias (van den Hoogen, van der Horst et al. 2010).

### 1.3.1.1 Atividade da aldeído desidrogenase

Apesar de algumas divergências de opiniões, muitos investigadores têm demonstrado a relação entre altos níveis de expressão de ALDH e células com características estaminais.

A expressão de elevada atividade de ALDH já foi utilizada como um marcador para identificação de células iniciadoras do tumor em vários tipos de cancro, como o do cólon (Huang, Hynes et al. 2009), pulmão (Ucar, Cogle et al. 2009), mama (Charafe-Jauffret, Ginestier et al. 2010) entre outros.

Crocker e Allan (2012) evidenciam ainda que a aldeído desidrogenase pode estar diretamente envolvida nos mecanismos de resistência à quimioterapia e radioterapia, através de um estudo que demonstrou que células do cancro da mama que sofreram inibição desta enzima demonstraram ser menos resistentes que as células que não foram alvo desta inibição.

Nas investigações do cancro da próstata, este marcador tem também sido bastante utilizado. Van den Hoogen et al. demonstraram que as células que apresentaram uma elevada atividade de ALDH também expressaram o fenótipo característico das CECs,  $CD44^+/\alpha2\beta1^{++}/CD133^+$ . Burguer, Gupta et al. também demonstraram que as células ALDH positivas apresentaram expressão de outros marcadores também já descritos como característicos das CECs, como o CK5, bcl-2 e Sca-1. T Li et al. (2010) isolaram células da próstata ALDH positivas e demonstraram que estas células possuíam elevada clonogenicidade, grande capacidade tumorigénica e foram capazes de formar um tumor com características histopatológicas e heterogeneidade semelhantes ao tumor parental após transplante em murganhos.

## **1.4 Resistência à terapêutica no Cancro da Próstata**

Segundo Gottesman (2002), cada célula cancerígena de cada doente possui uma composição genética distinta, que depende não só do tecido de origem, mas também do padrão de ativação dos oncogenes e inativação dos supressores de tumor, além da variação aleatória da expressão dos genes. Em resposta, cada cancro expressa um conjunto diferente de genes resistentes aos fármacos e as células que compõem este cancro, apesar de serem clonalmente derivadas, são bastante heterogêneas em relação à resistência terapêutica.

Para tentar contornar este problema é comum realizar uma terapia com múltiplos fármacos. No entanto, ainda assim, muitas vezes o cancro apresenta-se resistente. A resistência da

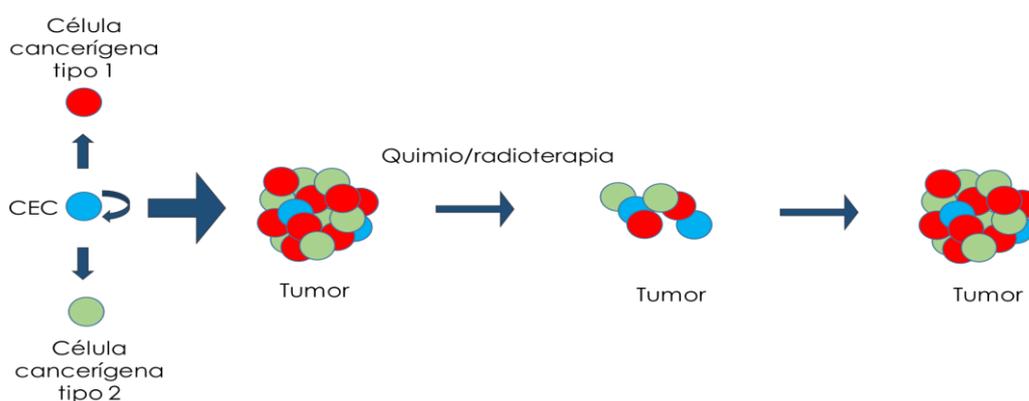
célula cancerígena pode ocorrer por inúmeros mecanismos, entre eles: (a) o bloqueio da morte celular programada, (b) a ativação dos mecanismos de resposta geral de detoxificação dos fármacos e reparação do ADN danificado, (C) as alterações no controlo do ciclo celular que conferem uma resistência relativa aos efeitos citotóxicos de alguns fármacos, entre outras (Gottesman 2002).

Como já referido, o cancro da próstata é hormonosensível, sendo por isso a terapia hormonal uma das principais terapêuticas. No entanto, por vezes, o tumor torna-se resistente a esta abordagem atingindo uma fase progressiva da doença e podendo tornar-se incurável. A resistência à hormonoterapia é normalmente explicada pela heterogeneidade das células do CaP em relação à expressão de recetores de androgénio. Neste ponto, é comum a mudança da abordagem terapêutica, normalmente, para a quimioterapia.

A quimioterapia utiliza principalmente fármacos citostáticos – como o docetaxel, paclitaxel, 5-azacitidina – que têm como objetivo a destruição das células cancerígenas.

Entre os muitos fatores envolvidos na resistência do cancro à terapêutica, existe um que se tem destacado: a presença de células capazes de renovar o tumor, ou, de células estaminais cancerígenas (Clevers 2011).

Em 2011, Hans Clevers afirma que as células estaminais cancerígenas seriam o “coração pulsante do cancro”, devido à imortalidade, à capacidade de autorrenovação e ao poder de se diferenciarem em todos os tipos de células cancerígenas de um determinado cancro, tornando-o incurável (Figura 3).



**Figura 3:** Esquema demonstrando como supostamente as células estaminais cancerígenas (CEC) são capazes de autorrenovação e diferenciarem-se nos outros tipos de células de um cancro. Devido à essa capacidade, são capazes de “renovar” as células destruídas pelos agentes agressivos – p.e, quimio/radioterapia.

## 2. Objetivos

O cancro da próstata torna-se letal no momento em que começa a apresentar resistência à terapia, mais precisamente, à quimioterapia. Vários estudos têm evidenciado que uma possível explicação para esta resistência possa ser a presença de um grupo de células, denominadas células estaminais cancerígenas, que não são afetadas por nenhum tipo de terapia e conseguem “renovar” o tumor devido às suas propriedades proliferativas e à sua capacidade de autorrenovação. Como já foi referido anteriormente, alguns autores defendem que o fenótipo destas células seja expressado pela presença dos marcadores CD44<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>. A aldeído desidrogenase (ALDH) é outro marcador que tem sido alvo de muitas investigações que evidenciam que a elevada atividade desta enzima pode estar relacionada com a presença de células estaminais cancerígenas.

O objetivo deste projeto foi de avaliar qual o efeito de agentes quimioterapêuticos na população de células cancerígenas estaminais prostáticas e perceber se promovem o enriquecimento desta subpopulação de células. A expressão dos marcadores CD44, CD133 e ALDH<sup>+</sup> foi avaliada em linhas celulares de cancro da próstata após incubação por diferentes períodos de tempo com fármacos citostáticos já utilizados na clínica – docetaxel e 5-azacitidina – para perceber a existência de alguma conexão entre as células não afetadas pela ação destes fármacos e a presença destes marcadores.

As linhas celulares utilizadas neste estudo foram as PC3 e DUI45, duas linhagens normalmente presentes na forma progressiva e resistente da doença. Como ambas as linhas não expressam o recetor de androgénio à sua superfície, ou seja, não são hormonossensíveis, utilizámos também um fármaco bastante usado na terapia hormonal – a bicalutamida – como controlo negativo.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Linhas Celulares

A cultura de células é amplamente utilizada em investigação científica e é considerada uma excelente ferramenta para ensaios “pré-*in vivo*”, uma vez que permite a realização de testes anteriores à experimentação em animais, reduzindo o número destes a usar durante o processo de investigação.

A cultura de células primárias é composta por células que foram isoladas e retiradas de um tecido específico e incubadas em condições próprias para cultivo. As linhas celulares são compostas por células da primeira passagem das células em cultura primária.

As células em cultura necessitam de condições especiais para que possam crescer de forma adequada e satisfazer os critérios de qualidade e confiança necessários para seu uso. Um fator essencial para um crescimento satisfatório é a escolha do meio de cultura ideal, que deve contar os nutrientes e suplementos adequados – como aminoácidos, fatores de crescimento, proteínas – que se adequem melhor cada tipo celular. Para além do meio de cultura, as células devem incubadas em meio com pH 7,4, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e em ambiente húmido, para mimetizar as condições no organismo humano.

A contaminação das culturas pode gerar grandes problemas e perdas durante o processo. A adição de antibióticos ou fungicidas e o manuseio das culturas sob condições estritamente estéreis – uso de câmara de fluxo e material devidamente esterilizado - são medidas que evitam este tipo de ocorrência. A presença de *Mycoplasma sp.* pode alterar significativamente as características celulares e modificar parâmetros específicos das células, tornando os resultados não confiáveis (Uphoff, Denkmann et al. 2012). Estima-se que entre 5 e 35% das culturas celulares sejam contaminadas por esta bactéria (Young, Sung et al. 2010). A identificação desta contaminação é realizada através de testes específicos, uma vez que não é perceptível a olho nu, como acontece com outras contaminações frequentes.

As linhas utilizadas usadas neste projeto são denominadas PC3 e DUI45. As PC3 foram obtidas através da ATCC e cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma). As DUI45 foram doadas pelo Instituto Português de Oncologia do Porto e cultivadas em meio Alfa-MEM (Invitrogen).

Ambas tiveram os meios acrescidos com tampão HEPES (Sigma), NaHCO<sub>3</sub> (Sigma) e 1% antibiótico PenStrep (Invitrogen).

## 3.2 Fármacos

### 3.2.1 Docetaxel

O docetaxel atua no bloqueio do processo mitótico, através do impedimento da associação e dissociação normais dos microtúbulos. O fármaco liga-se à subunidade  $\beta$  da tubulina livre, promovendo a polimerização em microtúbulos bastante estáveis, inibindo a sua dissociação devido à ausência do grupo guanosina trifosfato (GTP) (Pazdur, Kudelka et al. 1993).

Este mecanismo afeta a organização do centrossoma na fase S do ciclo celular causando uma acumulação de células nas fases G2 e M. Além do bloqueio da progressão celular, há também uma desregulação das vias de sinalização, induzindo a fosforilação da bcl-2, promovendo uma cascata de eventos que resulta em morte celular por apoptose (Fabbri, Carloni et al. 2006).

O docetaxel foi cedido pela TEVA Portugal.

### 3.2.2 5-azacitidina (5-AzaC)

Por possuir uma estrutura muito semelhante, funciona como análogo da citidina, incorporando-se no ADN e/ou ARN da célula, com um consequente sequestro da ADN metil transferase (DNMT) através de uma ligação covalente com a mesma. Devido a esta ligação irreversível, o ADN celular sofre desmetilação, ativando as vias de sinalização que induzem a apoptose (Kiziltepe, Hideshima et al. 2007).

O 5-azacitidina foi obtido através da Sigma e devidamente diluído em DMSO para posteriores experiências.

### 3.2.3 Bicalutamida

A bicalutamida é um anti androgénico puro, de estrutura semelhante à testosterona, que bloqueia os recetores de androgénio na superfície das células que os expressam, impedindo a sua proliferação (Furr and Tucker 1996).

Como as células utilizadas nas experiências, PC-3 e DUI45, são androgénio-independentes, ou seja, não expressam recetores de androgénio, este fármaco foi utilizado como controlo negativo. O fármaco foi obtido através da Astellas Pharma, Portugal.

### 3.3 Determinação das curvas de crescimento para as linhas celulares e do IC<sub>50</sub> dos fármacos

#### 3.3.1 Curva de crescimento

A curva de crescimento celular divide-se, basicamente, em 4 fases (Figura 4). Na fase *lag* não há proliferação celular, sendo uma fase de intensa atividade metabólica, uma vez que há grande produção de proteínas, enzimas e síntese de material genético. Na fase *log*, ou fase logarítmica/exponencial, é o período onde a proliferação é máxima e constante e de máxima viabilidade e atividade metabólica das células. É a melhor fase para estudos e experimentação. Na fase estacionária, o número de morte celular tende a ser equivalente ao número de novas células. Na fase de declínio, ocorre uma queda do número de células viáveis e o número de células mortas passa a predominar (Guimarães 2009).

A partir da curva de crescimento é possível determinar qual a melhor densidade celular para os futuros ensaios. A densidade ideal deve pertencer à fase *log* da curva, fase onde se é calculado o doubling-time das células. Doubling time é o período de tempo necessário para que o número de células seja duplicado.



Figura 4: Curva de crescimento (adaptado de Alves a. E., Guimarães R. A.C, Cultivo celular, Fiocruz, 2009).

As curvas de crescimento das células PC-3 e DUI45 foram determinadas através do método de redução da resazurina (AlamarBlue).

A resazurina é um corante azul e não fluorescente que sofre redução ao entrar em contato com células viáveis, transformando-se num composto rosa fluorescente, denominado resorufina. A redução da resazurina ocorre na presença de atividade de enzimas mitocondriais, através do recebimento de elétrons provenientes de compostos como NADH, NADPH, FMNH, FADH e citocromos, (Al-Nasiry, Geusens et al. 2007).

O método é ideal para ensaios de citotoxicidade, avaliação de viabilidade celular e determinação de curvas de crescimento *in vitro*, uma vez que é simples, rápido, eficaz, de fácil reprodução, baixo custo e que não conduz ao dano da amostra (O'Brien, Wilson et al. 2000).

Para a determinação das curvas de crescimento, diferentes densidades das células PC3 e DUI45 (2, 4, 8, 16, 32,  $64 \times 10^3$  células/poços) foram testadas, em placas de 96 poços de fundo plano (Orange Scientific). As leituras correspondentes com Alamar Blue foram efetuadas ao fim de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. A partir do resultado da curva de crescimento, determinou-se a densidade inicial mais adequada para os ensaios de citotoxicidade e citometria. A densidade celular ideal se encontra na fase *log* da curva, como demonstrado na Figura 1, uma vez que nesta fase, as células apresentam sua máxima viabilidade e atividade metabólica e estão em fase contínua de proliferação.

### 3.3.2 Citotoxicidade e $IC_{50}$

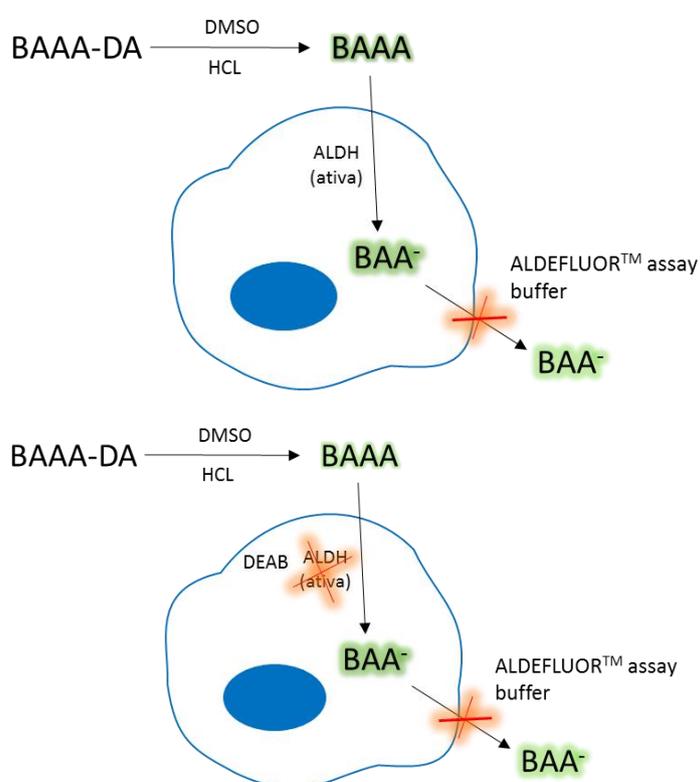
O  $IC_{50}$  é a concentração de um agente farmacológico suscetível de inibir o crescimento de 50% das células viáveis.

Para o ensaio de citotoxicidade, as células (PC3 e DUI45) foram semeadas em placas de 96 poços, contendo cada poço a mesma densidade celular ( $5 \times 10^3$  células/poço para as PC3 e  $6 \times 10^3$  células/poço para as DUI45), porém concentrações crescentes de docetaxel (1,0 – 32,0nM) 5-AzaC (0,1 - 3,2  $\mu$ M) ou bicalutamida (1,56 – 50,0  $\mu$ M). O ensaio foi obtido ao fim de 96 horas – tempo determinado a partir dos resultados da curva de crescimento.

### 3.4 Identificação das células com elevada expressão de atividade da enzima aldeído desidrogenase (ALDH)

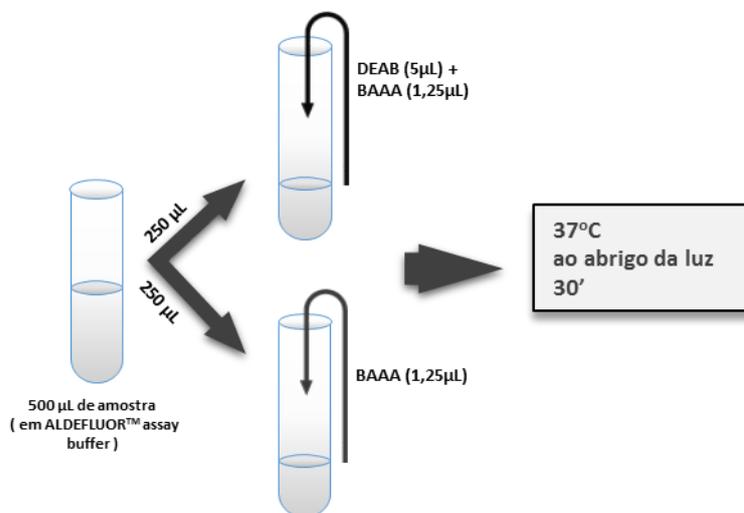
#### 3.4.1 ALDEFLUOR™ assay kit

De acordo com as informações fornecidas pelo fabricante, a empresa STEMCELL™ Technologies, o ALDEFLUOR™ Kit contém um reagente com uma substância denominada BODIPY™-aminoacetaldeído-dietil-acetal (BAAA-DA) que ao ser dissolvido em DMSO e exposto a condições ácidas (solução de HCl 2,0M, do próprio kit), transforma-se em BODIPY™-aminoacetaldeído (BAAA), um substrato fluorescente para ALDH. O BAAA é livre de carga e pode atravessar livremente a membrana plasmática de células intactas. A presença de ALDH intracelular transforma o BAAA em BAA<sup>-</sup> (BODIPY™-aminoacetato), que por sua vez fica retido dentro da célula devido à sua carga negativa. A retenção do BAA<sup>-</sup> intracelular é reforçada pela presença de um tampão específico (ALDEFLUOR™ Assay Buffer) que evita um possível efluxo do composto fluorescente para o meio extracelular. O dietilaminobenzaldeído (DEAB) inibe a atividade do ALDH, sendo utilizado como controle no ensaio (Figura 4).



**Figura 5:** Mecanismo de ação do ALDEFLUOR™ assay kit. O reagente contendo BAAA-DA, um pó liofilizado, é ressuspenso em DMSO e meio ácido transformando-se num composto fluorescente, o BAAA. O composto BAAA ganha uma carga negativa (BAA<sup>-</sup>) ao entrar em contato com a enzima ALDH ativa. Apesar do fluxo de BAA<sup>-</sup> para o meio extracelular ser dificultado, ocorre ainda alguma perda deste composto. O ALDEFLUOR™ assay buffer, um tampão

desenvolvido para o kit, é utilizado com o intuito de impedir a perda de BAA- para o exterior da célula. Para a amostra controlo utiliza-se o DEAB, um inibidor da atividade da ALDH.



**Figura** Erro! Nenhum texto com o estilo especificado foi encontrado no documento.6: Procedimento de marcação da amostra com o ALDEFUOR™ assay kit. A amostra, que anteriormente foi marcada com anti-CD44, lavada com PBS 1x e centrifugada, recebeu 500 µL de ALDEFUOR™ assay buffer e foi homogeneizada em vortex para uniformizar a suspensão celular. Dividiu-se então a amostra em 2 tubos: um ao qual foi adicionado de DEAB e BAAA, que servirá de controlo e o outro ao qual foi adicionado somente BAAA. Ambos os tubos foram incubados a 37°C ao abrigo de luz por 30 minutos antes de serem lidos no citómetro.

As amostras marcadas com ALDEFUOR podem ser lidas em citómetro de fluxo ou *cell sorting*. O citómetro de fluxo é um equipamento amplamente utilizado tanto na investigação científica quanto em laboratórios clínicos. Um dos principais atrativos desta tecnologia é a possibilidade de utilização de multiparâmetros de análise para identificar populações de alta especificidade. A amplitude da técnica abrange além de características fenotípicas - normalmente avaliadas a partir de marcações com anticorpos específicos - análises quantitativas de ADN e ARN presentes, fases do ciclo celular, índices de apoptose e/ou morte celular, avaliação de fluxos iónicos e pH.(Davies 2007) Durante as últimas décadas, inúmeros reagentes e novas tecnologias em citometria têm sido apresentados, aumentando cada vez mais as possibilidades de análise.

O citómetro de fluxo é constituído por uma fonte de radiação composta por lâmpada de mercúrio ou laser, câmara de fluxo, unidades de filtros óticos para seleção de um comprimento de onda específico, fotodíodos ou fotomultiplicadores para deteção e processamento dos sinais e uma unidade processadora dos dados recolhidos (Figura 7).

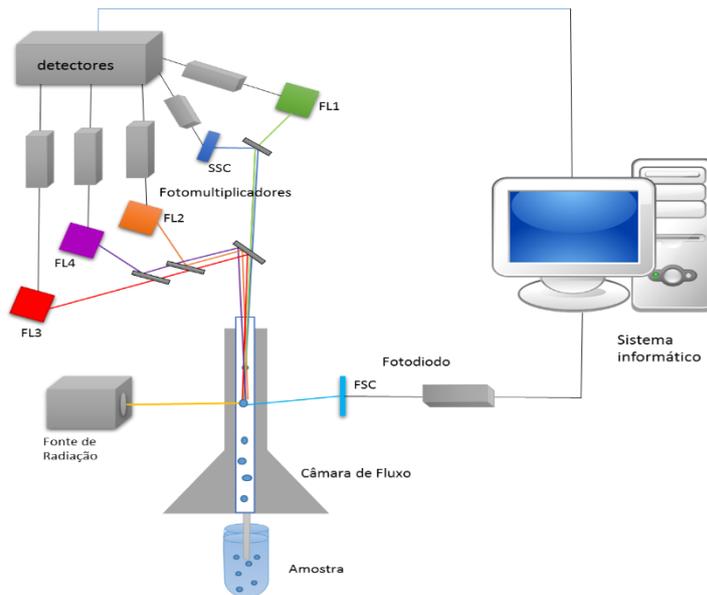


Figura 7: Modelo de funcionamento de um citômetro de fluxo.

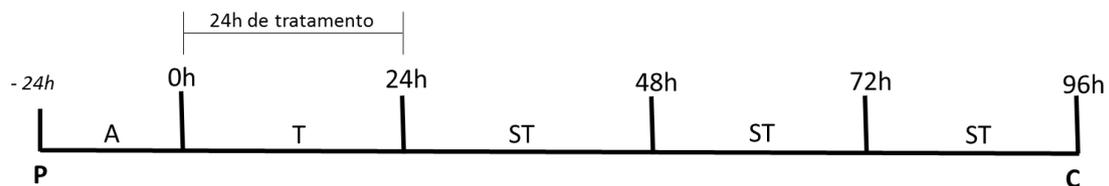
### 3.4.1.1. Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH em células PC3 após o tratamento com docetaxel por 24, 48, 72 e 96 horas

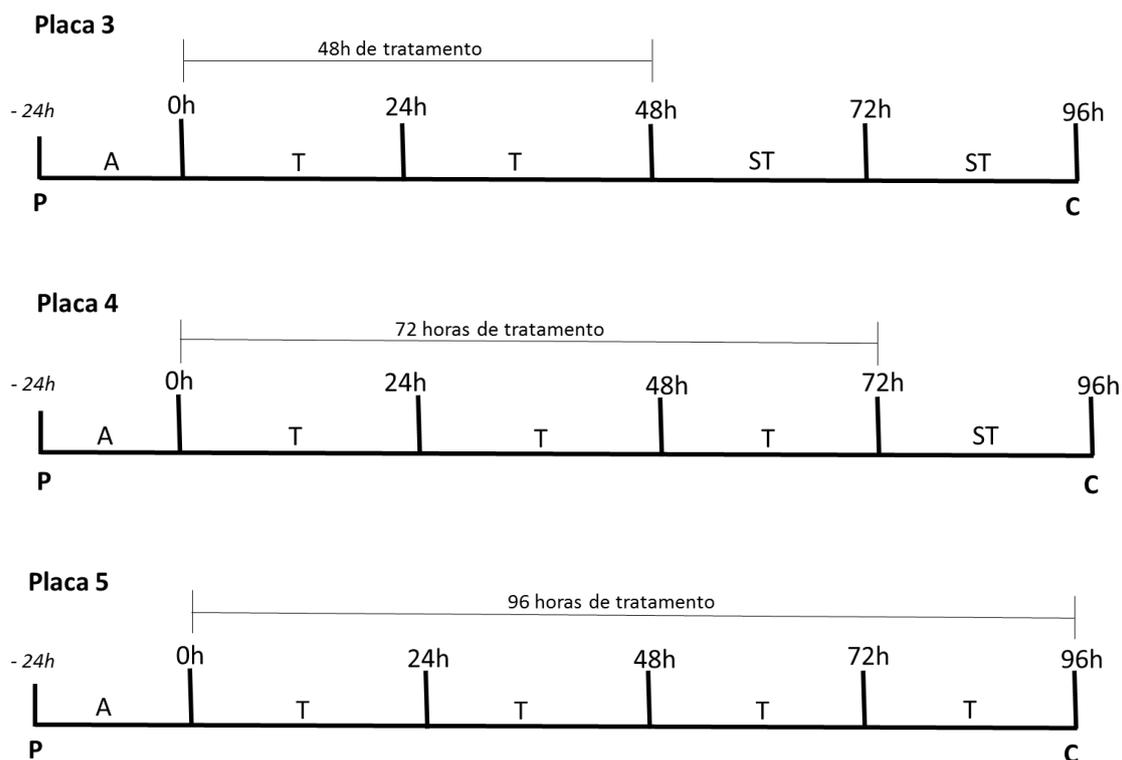
As células PC-3 foram semeadas em placas de 12 poços. Em cada placa, as células foram incubadas com docetaxel (IC50) por diferentes períodos de tempo (0, 24, 48, 72 e 96h), como mostra a Figura 8.

#### Placa 1 (Sem tratamento)



#### Placa 2



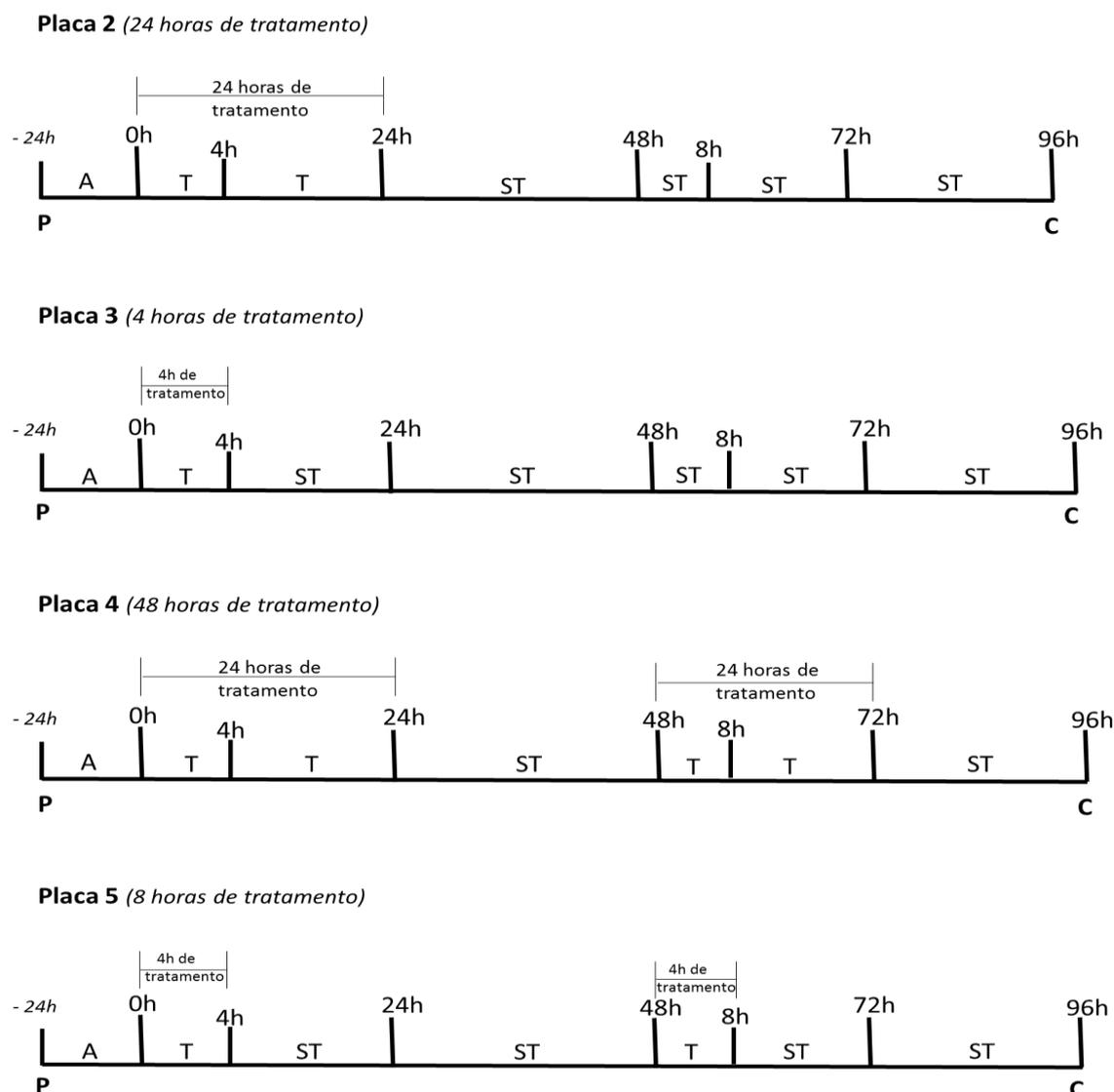


**Figura 8:** As células PC3 foram plaqueadas em 5 placas de 12 poços cada. As placas, numeradas de 1 a 5, como ilustrado, foram tratadas com a mesma dose (IC<sub>50</sub>) de docetaxel por diferentes períodos de tempo: 24 horas (Placa 2), 48 horas (Placa 3), 72 horas (Placa 4) e 96 horas (Placa 5), além da placa controle, que não recebeu tratamento (Placa 1). As células foram plaqueadas com 24 horas de antecedência (P), tempo suficiente para adesão (A) celular ao fundo da placa. Os tratamentos foram realizados através da incubação das células com meio de cultura acrescido de fármaco (T) e, após cada tempo determinado para o tratamento, esse meio foi substituído por meio de cultura sem fármaco, até que se completasse o tempo de incubação – 96 horas – e em seguida, foram destacadas para se fazerem as devidas marcações para posterior análise por citometria (C).

### 3.4.1.2 Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH em células PC3 e DUI45 após tratamento com bicalutamida e citostáticos (docetaxel e 5-AzaC) por 4, 8, 24 e 48 horas

As células PC-3 e DUI45 foram semeadas em placas de 12 poços. Cada placa, contendo apenas uma linha celular, foi incubada com a mesma dose de um dos fármacos (docetaxel<sub>(IC<sub>50</sub>)</sub>, 5-AzaC<sub>(IC<sub>50</sub>)</sub> ou 50 $\mu$ M de bicalutamida) por diferentes períodos de tempo (0, 4h, 8h, 24h e 48h), como mostra a Figura 9:

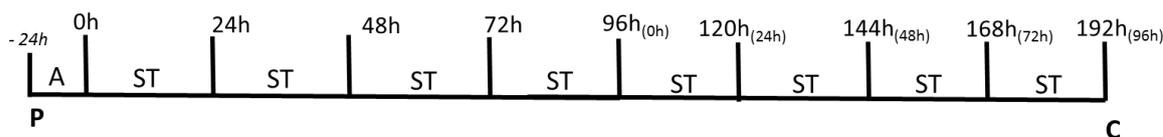
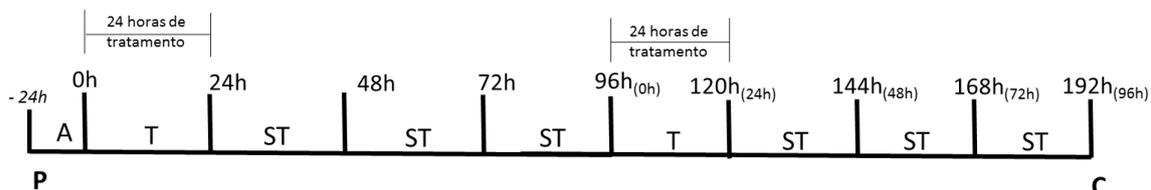
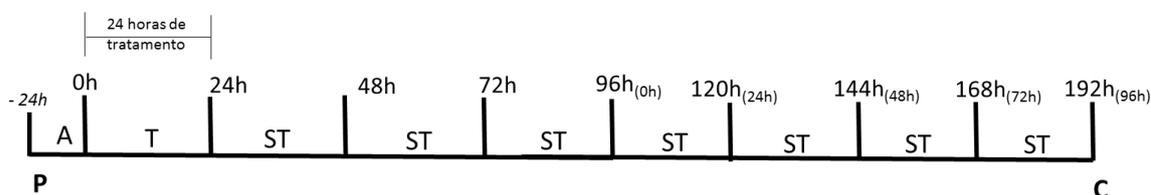




**Figura 9:** As células, PC3 e DU145, foram plaqueadas, separadamente, em 5 placas de 12 poços cada. As placas, numeradas de 1 a 5, como ilustrado, receberam tratamento com a mesma dose de fármaco (docetaxel<sub>(IC50)</sub>, 5-AzaC<sub>(IC50)</sub> ou bicalutamida=50uM) por diferentes períodos de tempo: 4 horas (Placa 2), 24 horas (Placa 3), 8 horas, divididas em dois tratamentos de 4 horas cada (Placa 4) e 48 horas, divididas em dois tratamentos de 24 horas cada (Placa 5), além da placa controle, que não recebeu tratamento (Placa 1). As células foram plaqueadas com 24 horas de antecedência (P), tempo suficiente para adesão (A) celular ao fundo da placa. Os tratamentos foram realizados através da incubação das células com meio de cultura acrescido de fármaco (T) e, após cada tempo determinado para o tratamento, esse meio foi substituído por meio de cultura sem fármaco, até que se completasse o tempo de incubação – 96 horas – e em seguida, foram destacadas para se fazerem as devidas marcações para posterior análise por citometria (C).

### 3.4.1.3 Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH em células PC3 e DU145 após tratamento com citostáticos por 24 e 48 horas e 192 horas de incubação

As células PC-3 e DU145 foram semeadas em placas de 12 poços. Cada placa, contendo apenas uma linha celular, foi incubada com a mesma dosagem de um dos fármacos (docetaxel<sub>(IC50)</sub>, 5-AzaC<sub>(IC50)</sub> ou 50uM de bicalutamida) por 24 horas, deixando-as repousar por 72 horas e tratando-as por 24h novamente, como mostra a Figura 10.

**Placa 1 (Sem tratamento)****Placa 2****Placa 3**

**Figura 10:** As células PC3 e DU145 foram plaqueadas, cada linha separadamente, em 5 placas de 12 poços cada. As placas, numeradas de 1 a 5, como ilustrado, receberam tratamento com a mesma dose de fármaco (docetaxel<sub>(IC50)</sub>, 5-AzaC<sub>(IC50)</sub>) por diferentes períodos de tempo: 48 horas, divididas em dois tratamentos de 24 horas cada (Placa 2) e 24 horas (Placa 3), além da placa controle, que não recebeu tratamento (Placa 1). As células foram plaqueadas com 24 horas de antecedência (P), tempo suficiente para adesão (A) celular ao fundo da placa. Os tratamentos foram realizados através da incubação das células com meio de cultura acrescido de fármaco (T) e, após cada tempo determinado para o tratamento, esse meio foi substituído por meio de cultura sem fármaco, até que se completasse o tempo de incubação – 96 horas – e em seguida, foram destacadas para se fazerem as devidas marcações para posterior análise por citometria (C).

Os itens 3.4.1.1, 3.4.1.2 e 3.4.1.3 foram seguidos das etapas descritas abaixo:

**Marcação com CD44**

Após o tempo de ensaio determinado para cada grupo, as células foram destacadas com meio de dissociação com e sem tripsina, para as linhas PC-3 e DU145, respetivamente, e contadas pelo método do Azul de Tripán.

Em cada tubo teste foram colocadas  $1,5 \times 10^5$  células que, após centrifugação a 805gs por 5min, foram incubadas com 100  $\mu$ l de solução contendo tampão fostato salino (PBS), 1% albumina sérica bovina (BSA) e 0,1% de azida de sódio.

Aos tubos, com exceção do tubo controle não marcado, foram adicionados 0,5uL de suspensão de anticorpo anti-CD44 diluído em solução constituída por PBS, 1% BSA e 0,1% azida de sódio. As amostras foram incubadas a 4°C, sob o abrigo de luz, por 30 min.

#### *Marcação com ALDH*

Após o término da incubação, completou-se o volume de cada um dos tubos com 1mL de PBS 1x cada, e centrifugou-se a 2000 rpm/5 minutos cada vez, para fazer a lavagem.

O sobrenadante de cada uma das amostras foi descartado e foram adicionados 500uL de reagente *ALDEFLUOR™*, homogeneizando no final com o auxílio do vórtex. Cada amostra foi dividida em 2 tubos, através da passagem de 250uL do primeiro tubo para um segundo tubo, como ilustrado na Figura 6. Cada uma das amostras foi de seguida Para cada amostra, a um dos tubos foram adicionados sequencialmente 5uL do inibidor DEAB e 1,25uL de reagente ALDH (BAAA). Ao outro tubo, somente foi adicionado 1,25uL de reagente ALDH (BAAA).

As amostras foram depois incubadas a 37°C, ao abrigo da luz, por 30 minutos. Após a incubação, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS 1x e uma vez com reagente *ALDEFLUOR™*, após o que se analisaram a amostras por citometria de fluxo.

#### *Leitura no citómetro de fluxo*

A amostra sem marcação (somente com as células) e as amostras contendo marcações individuais com cada um dos marcadores – CD44 e ALDH – foram utilizadas como parâmetros para estabelecer as configurações do citómetro em cada experiência.

Os canais FL1 e FL3 foram configurados para leituras dos sinais de ALDH e CD44, respetivamente. Para cada amostra, foram lidos  $1,5 \times 10^4$  eventos.

### **3.5 Avaliação da viabilidade celular após incubação com citostáticos e bicalutamida**

O ensaio de viabilidade celular foi realizado em paralelo com os ensaios de *ALDEFLUOR*, utilizando-se as mesmas linhas celulares, os mesmos tempos de incubação (nos termos referidos em 4.4.1.1, 4.4.1.2 e 4.4.1.3) e mesmas concentrações de fármacos (Tabela 1).

**TABELA I** – Plano de incubação das células PC3 e DU145 com docetaxel, 5-AzaC e bicalutamida, para avaliação da viabilidade celular por AlamarBlue.

Ensaio de viabilidade celular (Grupo A)						Ensaio de viabilidade celular (Grupo B)			
PC3	ST	4h	8h (4h+4h)	24h	48 (24h+24h)	PC3	ST	24h	48h (24h+24h)
5-AzaC <sub>(dose)</sub>	IC <sub>50</sub>	5-AzaC <sub>(dose)</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>				
Docetaxel <sub>(dose)</sub>	IC <sub>50</sub>	Docetaxel <sub>(dose)</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>				
Bicalutamida <sub>(dose)</sub>	50uM	50uM	50uM	50uM	50uM	Bicalutamida <sub>(dose)</sub>	50uM	50uM	50uM
DU145	ST	4h	8h (4h+4h)	24h	48 (24h+24h)	DU145	ST	24h	48h (24h+24h)
5-AzaC <sub>(dose)</sub>	IC <sub>50</sub>	5-AzaC <sub>(dose)</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>				
Docetaxel <sub>(dose)</sub>	IC <sub>50</sub>	Docetaxel <sub>(dose)</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>				
Bicalutamida <sub>(dose)</sub>	50uM	50uM	50uM	50uM	50uM	Bicalutamida <sub>(dose)</sub>	50uM	50uM	50uM

**Ensaio de viabilidade celular.** ST: sem tratamento; 4h: 4 horas de tratamento; 8h (4h+4h): 8 horas de tratamento, dividido em dois tratamentos de 4 horas cada, com um dia de intervalo entre eles; 24h: 24 horas de tratamento; 48h (24h+24h): 48 horas de tratamento, dividido em dois tratamentos de 24 horas, com intervalos de um dia (Grupo A) ou 72 horas (Grupo B) entre eles. As células inicialmente foram plaqueadas com uma densidade de  $5 \times 10^3$  células/poço (PC3) e  $6 \times 10^3$  células/poço (DU145).

Em todos os casos (curva de crescimento e ensaio de citotoxicidade), o meio de cultura de origem – Alfa-MEM (DU145) e RPMI-1640 (PC3) foram trocados por meios de cultura novos, porém acrescidos de 10% de corante resazurina (10x).

As leituras foram obtidas ao fim de 2 horas após adição do corante no ensaio da curva de crescimento. Já no ensaio de citotoxicidade, a leitura foi realizada quando o meio dos poços que continham as células não tratadas se transformou em rosa fluorescente.

Em ambos os testes, a leitura foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro nos comprimentos de onda 570 nm e 600 nm. O resultado final da absorvência foi determinado através da diferença das absorvências obtidas (570 – 600 nm).

Para a construção dos gráficos, as seguintes fórmulas foram utilizadas em ambos os ensaios:

$$\text{Morte Celular} = [100 - (\text{Abs}_{(a)} - \text{Abs}_{(res)})/(\text{Abs}_{(c)} - \text{Abs}_{(res)})] \times 100\%$$

$$\text{Viabilidade Celular} = (\text{Abs}_{(a)} - \text{Abs}_{(res)})/(\text{Abs}_{(c)} - \text{Abs}_{(res)}) \times 100\%$$

Sendo (a) = amostra tratada; (res) = resazurina; (c) = amostra controle – não tratada ou tratada somente com DMSO, quando for o caso.

### 3.6 Avaliação da capacidade clonogénica das células PC3 e DUI45 após incubação com citostáticos

O ensaio clonogénico é um método que determina a capacidade das células em proliferarem indefinidamente, sendo capazes de formar um clone ou uma colónia. (Munshi, Hobbs et al. 2005) Diversos protocolos já foram descritos, alguns adaptados à experiência e objetivos de cada investigador.

Segundo os protocolos, quanto maior a agressividade do tratamento (seja por uma maior dosagem ou um maior tempo de exposição ao fármaco), maior a densidade celular. Foram testadas diferentes densidades das células DUI45 e PC3 (500 – 1500 células/poço e 1000-5000 células/poço em placas de 12 e 6 poços, respetivamente) e incubadas com cada um dos fármacos com uma concentração correspondente ao IC<sub>50</sub> respetivo, por diferentes tempos (0, 4, 8, 24, 48 horas) (Tabela 2).

As células foram observadas diariamente até que se notasse a formação de pelo menos uma colónia composta por mais de 50 células nos poços das células não tratadas (tempo 0 h). Nesta etapa, retirou-se o meio de todos os poços, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e adicionou-se 1 ml de solução fixadora (ácido acético glacial/metanol 1:7) em cada poço. Após 5 minutos, retirou-se a solução fixadora e adicionou-se 1 ml de solução metanólica de Cristal Violeta (Sigma) a 0,5%, deixando corar por 2 horas. As placas foram depois lavadas em água corrente e expostas ao ar para secagem.

O número de colónias de cada  $n$  foi contado macroscopicamente, auxílio de lupa. Construiu-se um gráfico de sobrevivência celular através das seguintes fórmulas:

$$PE = [(\text{número de colónias formadas})/(\text{número de células semeadas})] \times 100\%$$

$$SF = [(\text{número de colónias formadas após o tratamento})/(\text{número de células semeadas})] \times PE$$

Sendo PE = eficiência de plaqueamento (*plate efficiency*) e SF = fração de sobrevivência.

**TABELA 2** – Plano de incubação das células PC3 e DU145 com citostáticos, em função da densidade celular.

PC3 ou DU145		
Tratamento (docetaxel <sub>(IC50)</sub> ou 5-AzaC <sub>(IC50)</sub> )		
Nº células/poço	tempo de incubação	Dose
500	sem fármacos	-
600	4 horas	IC <sub>50</sub>
700	8h (4h+4h)	IC <sub>50</sub>
1000	24 horas	IC <sub>50</sub>
1500	48 horas (24h+24h)	IC <sub>50</sub>

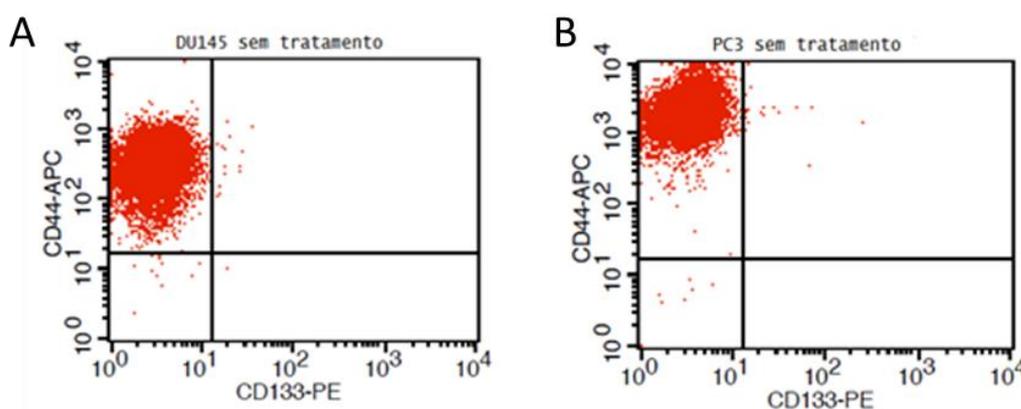
**Ensaio clonogénico.** A densidade celular aumenta de acordo com o tempo de tratamento. Variando de 500 células/poço para o grupo sem tratamento e 1500 células/poço para o grupo tratado por 48 horas (divididas em dois tratamentos de 24 horas cada e um dia de intervalo entre eles).

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Avaliação da expressão de CD44/CD133, marcadores de células estaminais em células de cancro da próstata

Como já referido anteriormente, vários estudos indicam um suposto fenótipo das CEC representado pela expressão dos marcadores  $CD44^+/\alpha_2\beta_1^{\text{High}}/CD133^+$ . Além disso, o CD133 é considerado por vários autores como um potencial marcador das CECs e/ou células iniciadoras do tumor (CIT) de outros tipos de cancro, além das da próstata, como por exemplo, cólon retal (Horst, Kriegl et al. 2009), cérebro (Singh, Clarke et al. 2003), glioma (Zeppernick, Ahmadi et al. 2008), pulmão (Eramo, Lotti et al. 2008) entre outros. Porém, o marcador foi normalmente detetado com sucesso em amostras de tecido ou esferas e não em linhas celulares, sendo demonstrado em alguns estudos, que a expressão desse marcador, nestas últimas, é praticamente nula (Ojima 2011).

Nos resultados obtidos pela marcação com anti-CD44 e anti-CD133 das células DU145 e PC3 sem incubação de qualquer fármaco (Figura 11), ambas se revelaram  $CD44^{++}/CD133^-$ . Devido às fortes evidências citadas, decidiu-se deixar de se usar a marcação para CD133 nestes testes.

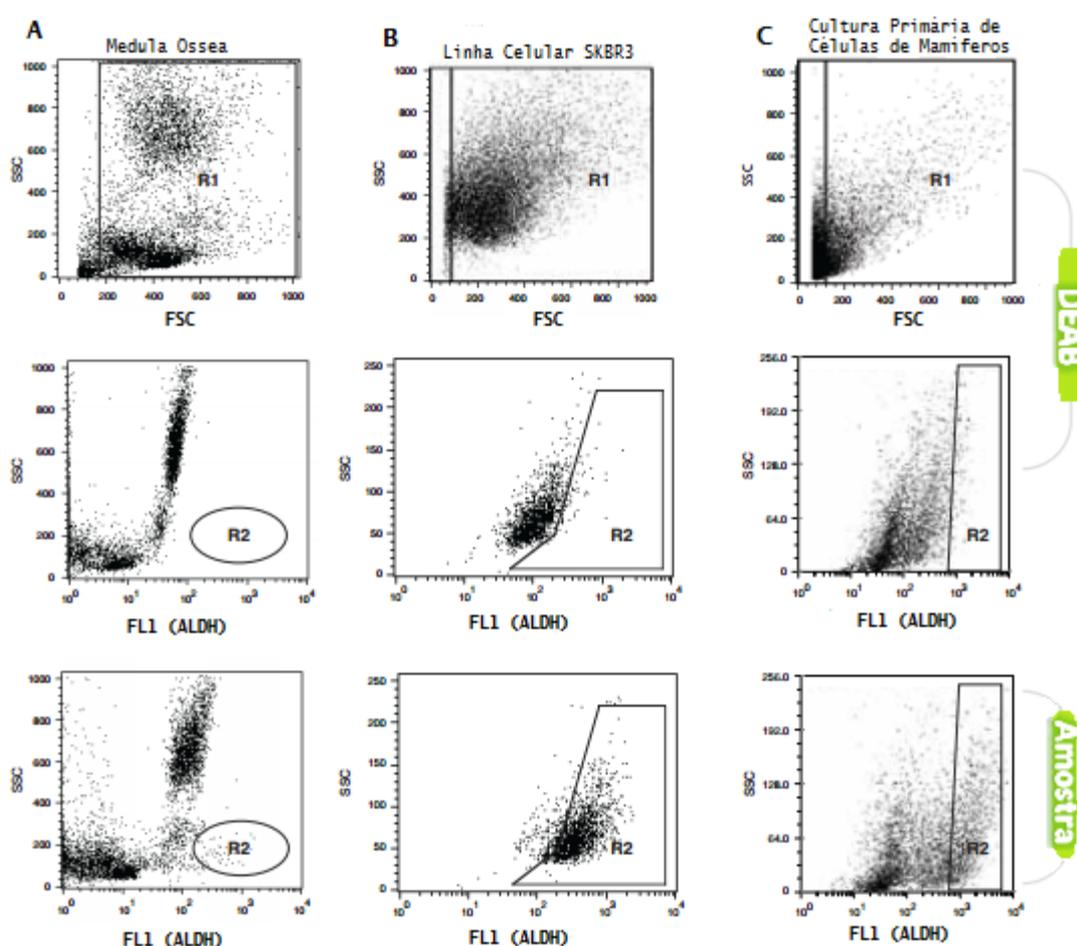


**Figura 11:** Análise por citometria de fluxo da marcação com CD44 e CD133 das células DU145 (A) e PC3 (B). Ambas apresentaram esboços positivos para marcação com CD44 (> 97%) e negativo para CD133 (<0,01%).

## 4.2 Avaliação do efeito de citostáticos na atividade de ALDH em células PC3 e DUI45

Segundo o protocolo de ALDEFUOR™ *assay kit*, o tempo de incubação da amostra com o reagente (BAAA) deve ser de 45 minutos. Porém, e como o próprio fabricante informa, o protocolo deve ser otimizado para cada para cada tipo de linha celular. Neste trabalho, e após várias tentativas, as experiências com ALDEFUOR foram realizadas com apenas 30 minutos de incubação ao invés de 45 minutos. Observou-se que com 45 minutos, as células apresentavam uma fluorescência muito elevada, dificultando a análise por citometria.

Os *gates* – sinalizados como R2 nas figuras abaixo – foram desenhados de acordo com as instruções também fornecidas pelo fabricante (Figura 12).



**Figura 12:** Um *gate* R1 foi desenhado de forma a abranger quase toda a população de células nos gráficos *side scatter*(SSC)x *forward scatter* (FSC). Para determinar o *gate* R2, fez-se primeiramente a leitura da amostra com DEAB e desenhou-se o *gate* na região “vazia”, onde praticamente não há células positivas para ALDH. A amostra é lida em seguida e as células que se encontrarem dentro do R2 são as células que expressam uma elevada atividade de ALDH (ALDH<sup>+</sup>). O modelo seguido

neste projeto foi o da linha celular SKBR3, uma vez que também são linhas celulares cancerígenas, porém, da mama. *Imagem adaptada do manual de instrução de ALDEFUOR™ assay kit, StemCell Technologies.*

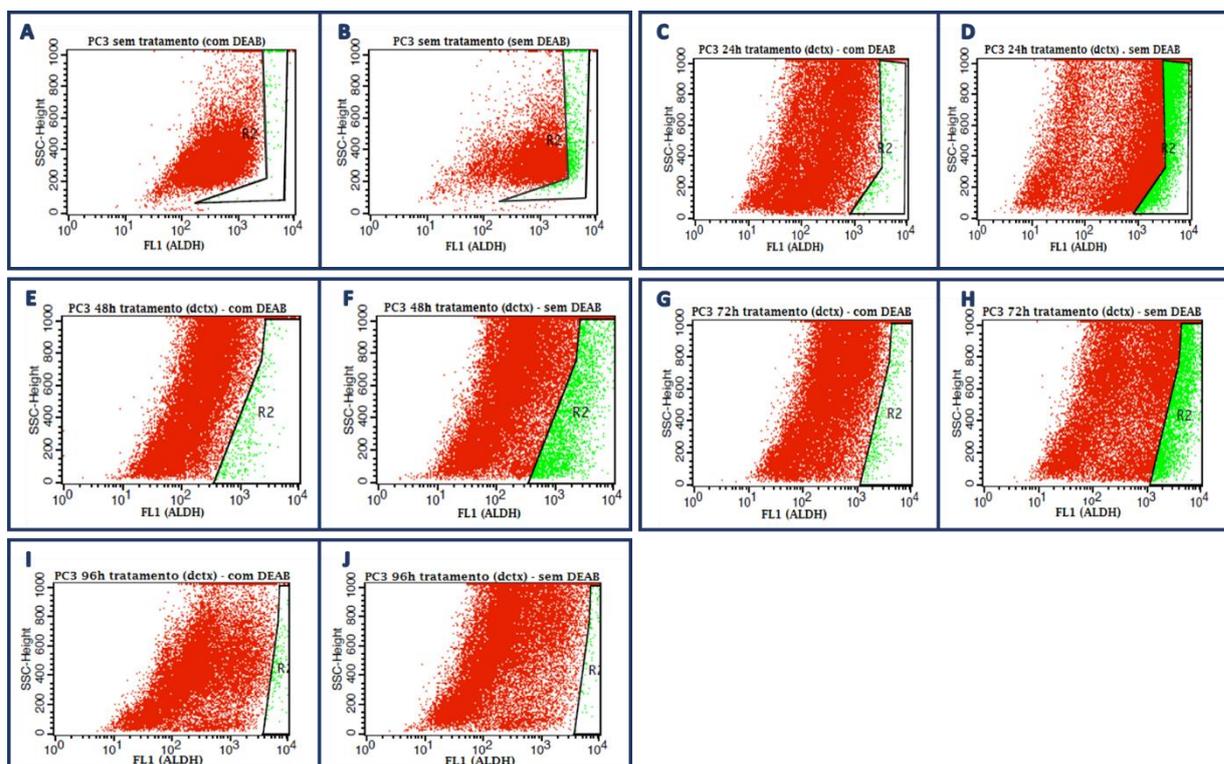
Determinaram-se *gates* individualmente para cada tempo de incubação/linha celular/fármaco, para cada uma das experiências realizadas (DUI45 incubadas 24 horas com docetaxel, PC3 incubadas 48 horas com bicalutamida p.e), uma vez que se observou que os diferentes tratamentos modificavam significativamente o esboço das células nas análises pelo citómetro, dificultando a manutenção de um desenho fixo para o *gate* R2.

#### 4.2.1 Avaliação da expressão da atividade de ALDH e expressão de CD44 em células PC3 após tratamento com docetaxel por 24, 48, 72 e 96 horas.

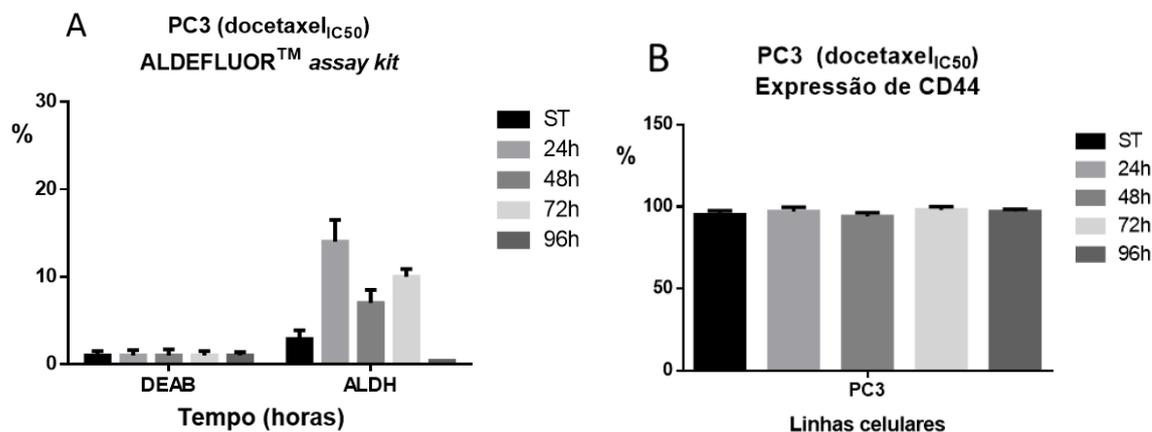
A incubação das células PC3 com docetaxel, numa concentração semelhante à do IC<sub>50</sub>, e por períodos crescentes desde 24 a 96 h, conduziu a um aumento das células ALDH positivas (células com atividade elevada da ALDH) (Figura 14A). Em relação ao grupo de células não incubadas com qualquer fármaco, notou-se um aumento médio de 12% após 24 horas (Figura 13C e D), 7% após 48 horas (Figura 13E e F), 9% após 72 horas (Figura 13G e H) e nenhum aumento após 96 horas (Figura 13I e J).

Considerando que os resultados obtidos após 24 (Figura 13 e 14A) e 48 (Figura 13 e 14A) horas de incubação foram promissores, decidiu-se continuar os testes em torno das condições experimentais com esta duração.

Em relação à marcação com CD44, em todas as amostras, o nível de expressão deste marcador permaneceu praticamente constante (Gráfico 2B) – em torno de 93-99% - o que era esperado, uma vez que o CD44, isolado, é considerado um marcador de células cancerígenas.



**Figura 13: Efeito do tempo de incubação de docetaxel<sub>IC50</sub> na expressão da atividade de ALDH nas células PC3, - ALDEFLUOR™ assay kit.** As amostras que receberam o inibidor DEAB serviram de controle para a determinação do gate R2 de cada condição testada: sem fármaco (A,B), 24 h (C,D), 48 h (E,F), 72 h (G,H) e 96 h de incubação com docetaxel (I,J). Foram lidos 15000 eventos para cada amostra.

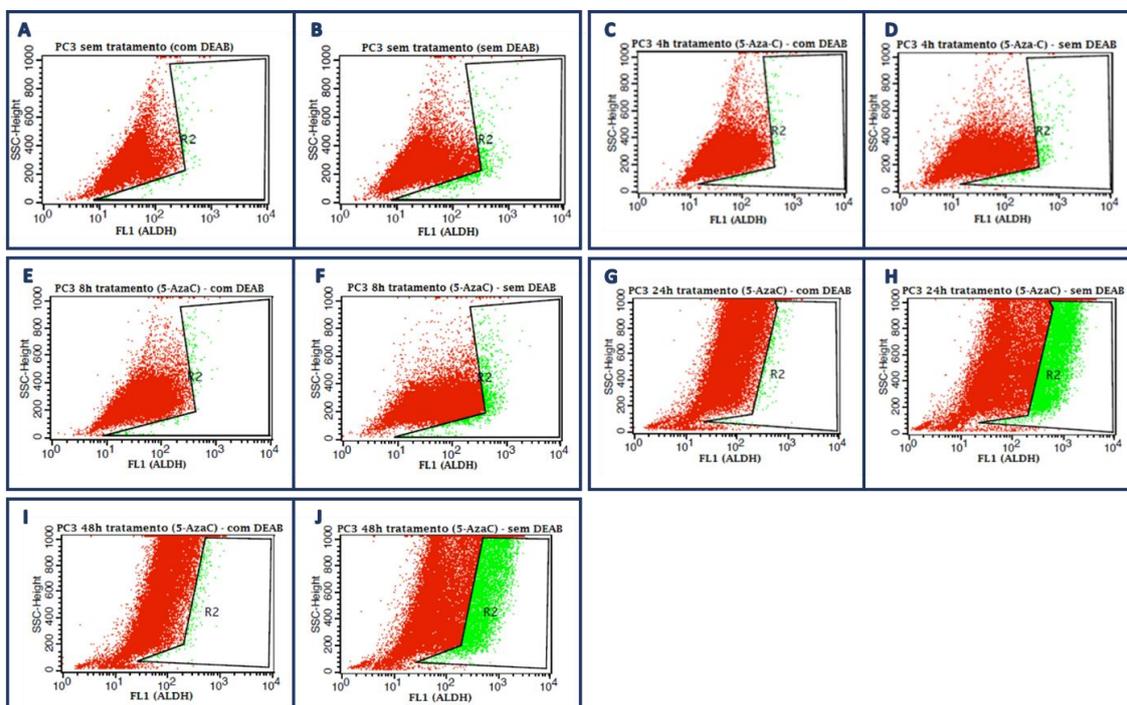


**Figura 14: Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH e do marcador CD44 em células PC3 após o tratamento por docetaxel.** A percentagem de células ALDH<sup>+</sup> (A) e da expressão de CD44 (B) foram calculadas pela média obtida através de três repetições da experiência. No gráfico A, o valor de DEAB foi fixado para 1% em todas as análises. **ST**: células sem tratamento; **4h**: células tratadas por 4 horas; **8h**: células tratadas por 8 horas, divididas em dois tratamentos de 4 horas cada, com intervalo de um dia entre eles; **24h**: células tratadas por 24 horas; **48h**: células tratadas por 48 horas, divididas em dois tratamentos de 24 horas cada e um intervalo de um dia entre eles.

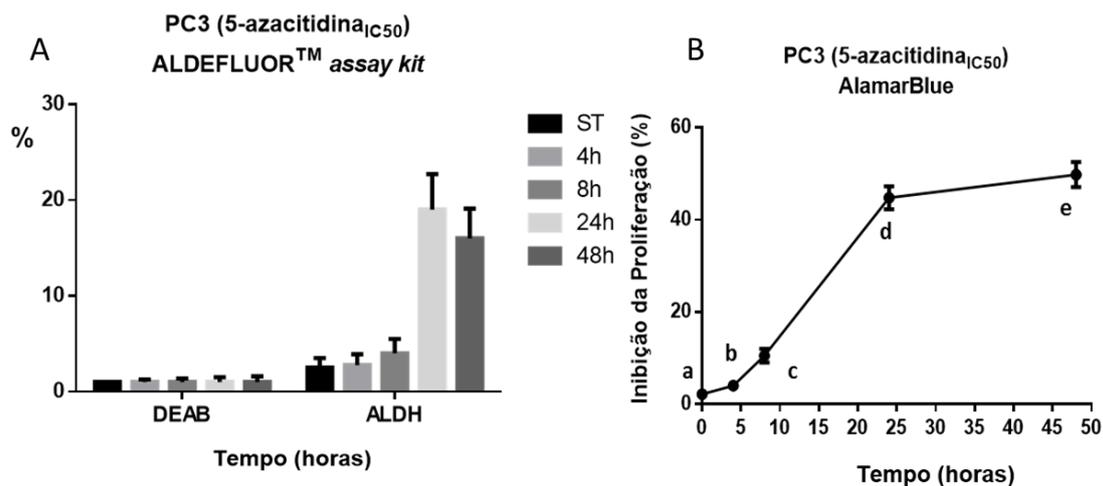
#### 4.2.2 Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH em células PC3 e DU145 após tratamento com bicalutamida e citostáticos (docetaxel e 5-AzaC) por 4, 8, 24 e 48 horas

##### Células PC3

Observou-se um aumento significativo do número de células que expressam alta atividade de ALDH (ALDH positivas) após 24 (Figura 15C e D) e 48 (Figura 15E e F) horas de tratamento com 5-AzaC. As células ALDH positivas tiveram uma média de 17,5% (Figura 15 e 16A) de aumento nas amostras que receberam 24 horas de tratamento e 13,5% (Figura 15 e 16A) nas amostras com 48 horas de tratamento, em relação às células não tratadas. No entanto, o teste com AlamarBlue demonstrou que em paralelo a esse aumento ocorreu também um aumento da inibição da proliferação, atingindo cerca de 45% (Figura 16B) após 24 horas de tratamento e 50% (Figura 16B) após 48 horas de tratamento. Nas células tratadas por 4 e 8 horas não foi observado um aumento significativo de células ALDH positivas (0,3% e 1,2%, respectivamente) – Figura 15 e 16A - nem de inibição da proliferação (3,5% e 10% respectivamente) – Figura 16B -, apresentando índices muito próximos aos das células sem tratamento.

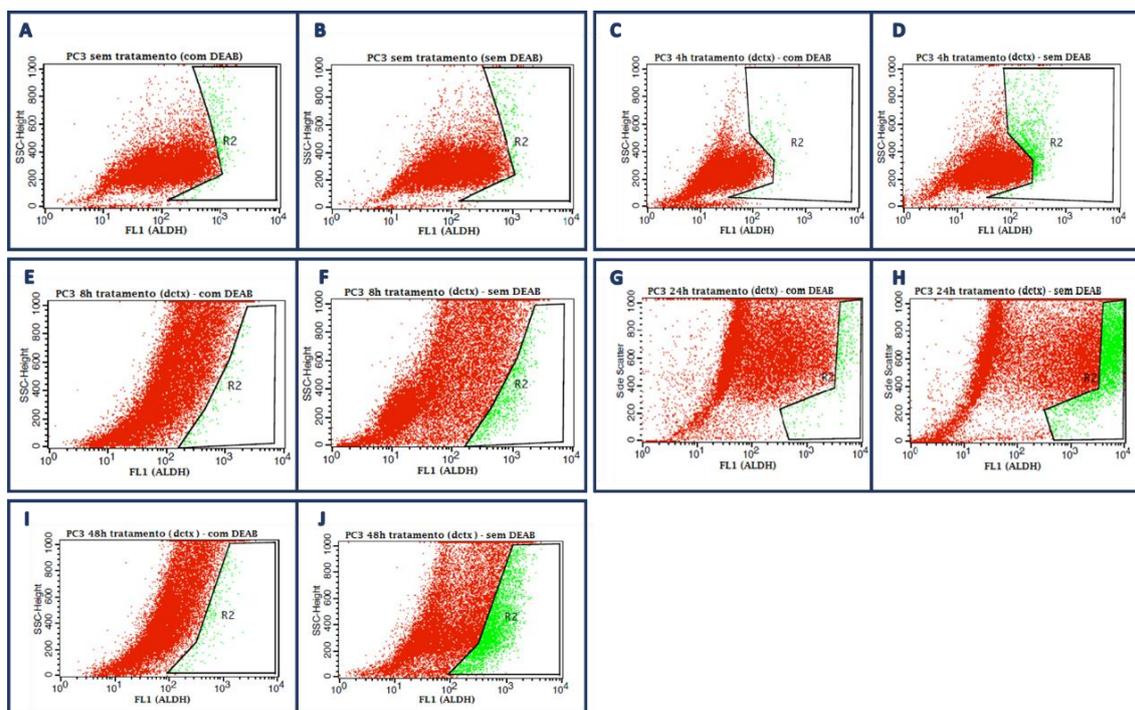


**Figura 15: Efeito sobre a expressão da atividade de ALDH nas células PC3 tratadas com 5-AzaC<sub>150</sub> em função do tempo de incubação (4, 8, 24 e 48 horas) – ALDEFUORT™ assay kit.** As amostras que receberam o inibidor DEAB serviram de controle para a determinação do gate R2 de cada condição testada: sem fármaco (A,B), 4 h (C,D), 8 h, dividido em dois tratamentos de 4 h cada, com uma de diferença entre eles (E,F), 24 h (G,H) e 48 h, dividido em dois tratamentos de 24 h cada, com um dia de diferença entre eles (I,J). Foram lidos 15000 eventos para cada amostra.

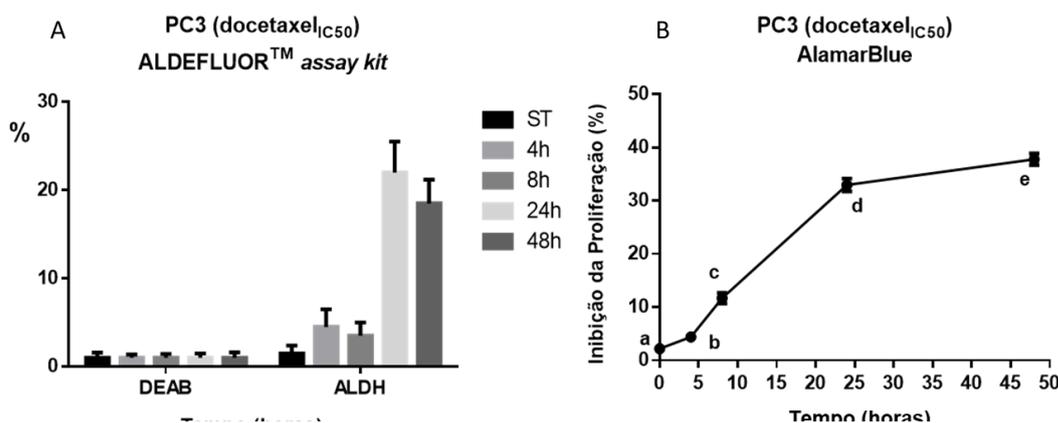


**Figura 16: Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH e do índice de inibição da proliferação em células PC3 após o tratamento por 5-AzaC.** Em ambos os gráficos, os valores foram calculados pela média obtida através de três repetições da experiência. No gráfico A, o valor de DEAB foi fixado para 1% em todas as análises. **ST**: células sem tratamento; **4h**: células tratadas por 4 horas; **8h**: células tratadas por 8 horas, divididas em dois tratamentos de 4 horas cada, com intervalo de um dia entre eles; **24h**: células tratadas por 24 horas; **48h**: células tratadas por 48 horas, divididas em dois tratamentos de 24 horas cada e um intervalo de um dia entre eles.

Seguindo o resultado observado anteriormente (Figuras 15 e 16), as células PC3 tratadas com docetaxel notou-se um considerável aumento do número de células ALDH positivas após 24 horas de tratamento (uma média de 20,5%) e após 48 horas de tratamento (17%, em média) – Figuras 17 e 18A. O mesmo aumento não foi tão significativo nas células que receberam tratamento por 4 e 8 horas - 3,0% e 2,0%, respectivamente (Figuras 17 e 18A). O índice de inibição da proliferação também acompanhou o aumento do número de células ALDH positivas, apresentando uma média de 4% (4 horas de tratamento), 11,5% (8 horas de tratamento), 33% (24 horas de tratamento) e 38% (48 horas de tratamento) – (Figura 18B).

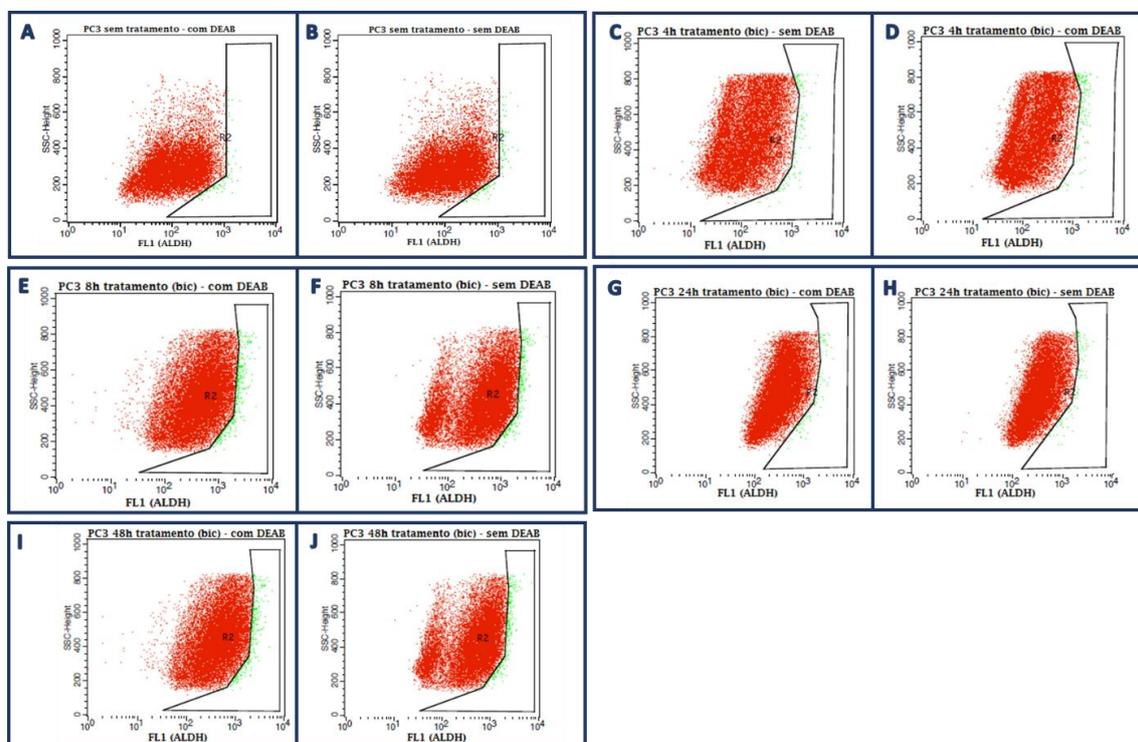


**Figura 17: Efeito sobre a expressão da atividade de ALDH nas células PC3 tratadas com docetaxel<sub>IC50</sub> em função do tempo de incubação (4, 8, 24 e 48 horas) – ALDEFLUOR™ assay kit.** As amostras que receberam o inibidor DEAB serviram de controle para a determinação do gate R2 de cada condição testada: sem fármaco (A,B), 4 h (C,D), 8 h, dividido em dois tratamentos de 4 h cada, com uma de diferença entre eles (E,F), 24 h (G,H) e 48 h, dividido em dois tratamentos de 24 h cada, com um dia de diferença entre eles (I,J). Foram lidos 15000 eventos para cada amostra.

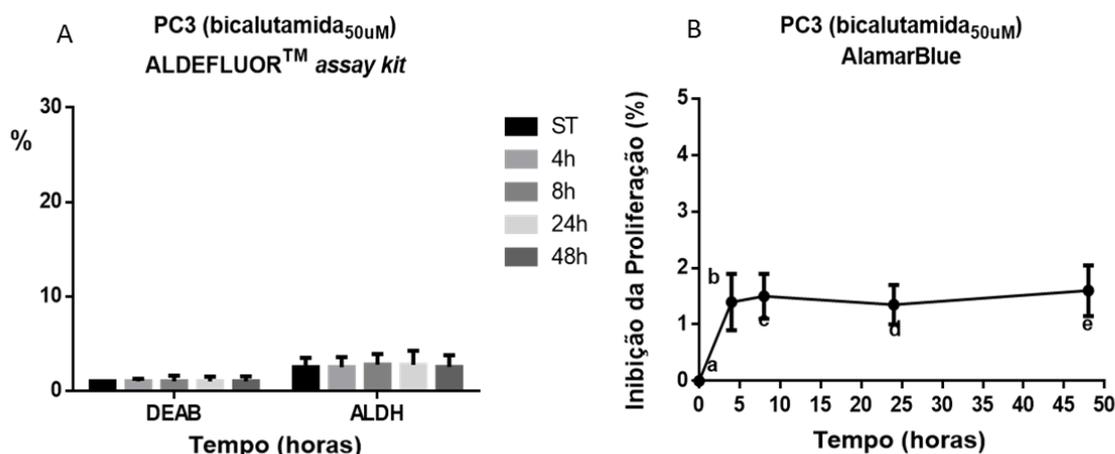


**Figura 18: Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH e do índice de inibição da proliferação em células PC3 após o tratamento por 5-AzaC.** Em ambos os gráficos, os valores foram calculados pela média obtida através de três repetições da experiência. No gráfico A, o valor de DEAB foi fixado para 1% em todas as análises. **ST**: células sem tratamento; **4h**: células tratadas por 4 horas; **8h**: células tratadas por 8 horas, divididas em dois tratamentos de 4 horas cada, com intervalo de um dia entre eles; **24h**: células tratadas por 24 horas; **48h**: células tratadas por 48 horas, divididas em dois tratamentos de 24 horas cada e um intervalo de um dia entre eles.

O tratamento com bicalutamida não demonstrou grande impacto sobre as células PC3. Houve um aumento do número de células ALDH positivas em relação as amostras contendo o inibidor DEAB, porém esse aumento permaneceu praticamente constante, independentemente do tempo de tratamento recebido pelas células (Figuras 19 e 20A). O índice de inibição da proliferação também permaneceu praticamente inalterado, revelando uma média de 2,1- 2,5% de morte em todos os tempos de tratamento (Figura 20B).



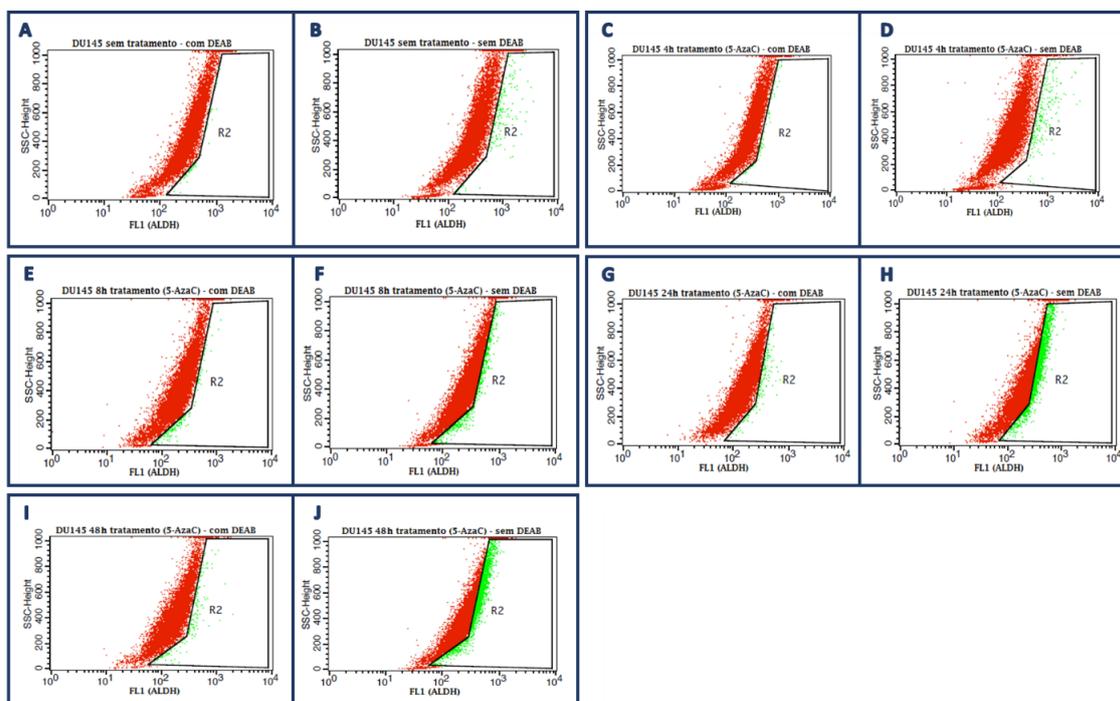
**Figura 19:** Efeito sobre a expressão da atividade de ALDH nas células PC3 tratadas com bicalutamida(50 $\mu$ M) em função do tempo de incubação (4, 8, 24 e 48 horas) – ALDEFLUOR™ assay kit. As amostras que receberam o inibidor DEAB serviram de controlo para a determinação do gate R2 de cada condição testada: sem fármaco (A,B), 4 h (C,D), 8 h, dividido em dois tratamentos de 4 h cada, com uma de diferença entre eles (E,F), 24 h (G,H) e 48 h , dividido em dois tratamentos de 24 h cada, com um dia de diferença entre eles (I,J). Foram lidos 15000 eventos para cada amostra



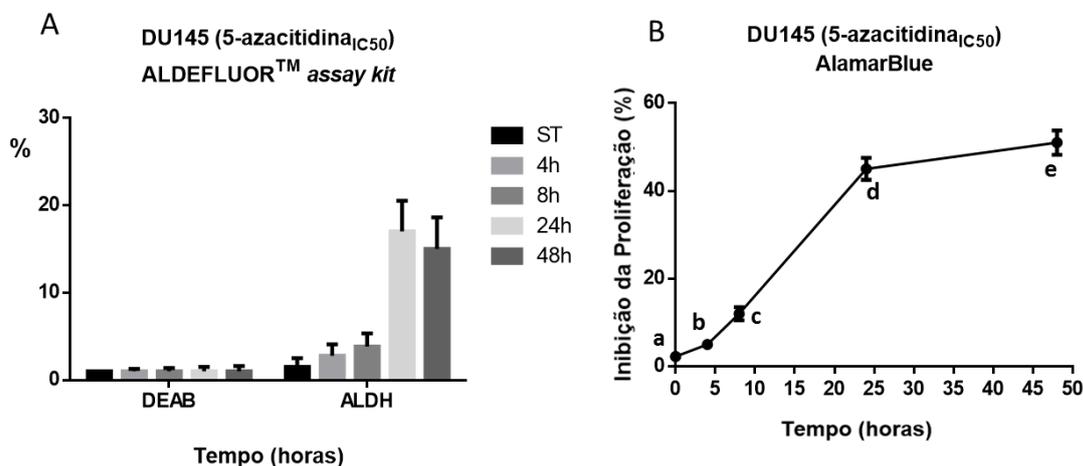
**Figura 20: Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH e do índice de inibição da proliferação em células PC3 após o tratamento por bicalutamida.** Em ambos os gráficos, os valores foram calculados pela média obtida através de três repetições da experiência. No gráfico A, o valor de DEAB foi fixado para 1% em todas as análises. **ST**: células sem tratamento; **4h**: células tratadas por 4 horas; **8h**: células tratadas por 8 horas, divididas em dois tratamentos de 4 horas cada, com intervalo de um dia entre eles; **24h**: células tratadas por 24 horas; **48h**: células tratadas por 48 horas, divididas em dois tratamentos de 24 horas cada e um intervalo de um dia entre eles.

### Células DUI45

Após o tratamento das células DUI45 com 5-AzaC, observou-se um aumento médio de 16,5% do número de células ALDH positivas no grupo tratado por 24 horas e de 12,5% no grupo tratado por 48 horas (Figuras 21 e 22A). A inibição da proliferação atingiu índices médios de 41% para as células com 24 horas de tratamento e 50% para as com 48 horas de tratamento (Figura 22B). Os tratamentos de 4 e 8 horas não surtiram grande efeito, ocorrendo um aumento de células de ALDH positivas de 1,30% e 3,35%, (Figuras 21 e 22A) e uma inibição da proliferação de 5% e 12%, respectivamente (Figura 22B).

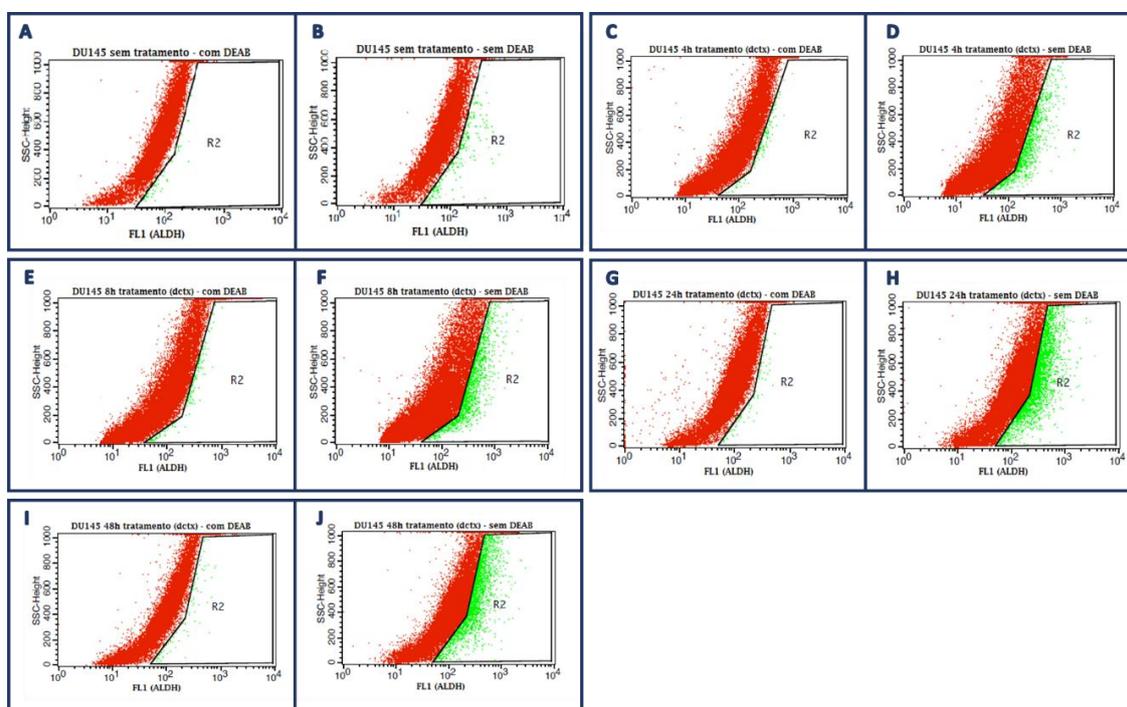


**Figura 21: Efeito sobre a expressão da atividade de ALDH nas células DU145 tratadas com 5-AzaC<sub>IC50</sub> em função do tempo de incubação (4, 8, 24 e 48 horas) – ALDEFLUOR™ assay kit.** As amostras que receberam o inibidor DEAB serviram de controle para a determinação do gate R2 de cada condição testada: sem fármaco (A,B), 4 h (C,D), 8 h, dividido em dois tratamentos de 4 h cada, com uma de diferença entre eles (E,F), 24 h (G,H) e 48 h, dividido em dois tratamentos de 24 h cada, com um dia de diferença entre eles (I,J). Foram lidos 15000 eventos para cada amostra.

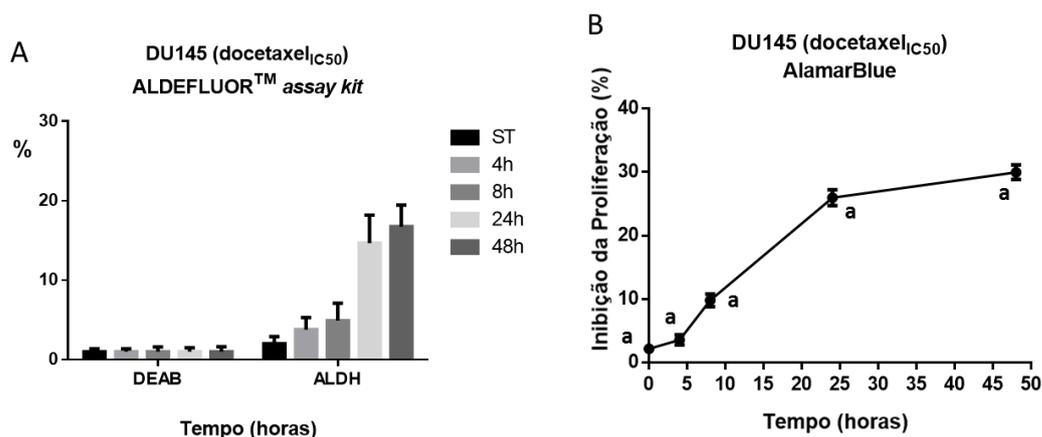


**Figura 22: Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH e do índice de inibição da proliferação em células DU145 após o tratamento por 5-AzaC.** Em ambos os gráficos, os valores foram calculados pela média obtida através de três repetições da experiência. No gráfico A, o valor de DEAB foi fixado para 1% em todas as análises. **ST:** células sem tratamento; **4h:** células tratadas por 4 horas; **8h:** células tratadas por 8 horas, divididas em dois tratamentos de 4 horas cada, com intervalo de um dia entre eles; **24h:** células tratadas por 24 horas; **48h:** células tratadas por 48 horas, divididas em dois tratamentos de 24 horas cada e um intervalo de um dia entre eles.

Os resultados gerados na sequência da incubação das células DUI45 com docetaxel, tal como verificado com as células PC3, aproximaram-se bastante dos resultados com 5-azacitidina. O aumento do número de células ALDH positivas em relação às células não tratadas foi em média 12,7% e 14,3% para as células com 24 e 48 horas de incubação, respetivamente (Figuras 23 e 24A). O índice de inibição da proliferação ficou em torno de 26,0% e 30,0% para as células com 24 e 48 horas de tratamento, respetivamente (Figura 24B). O tratamento por 4 e 8 horas mais uma vez não demonstrou grande impacto, produzindo um índice de inibição da proliferação de 3,6% e 10,0% (Figura 24B), e um aumento de células ALDH positivas de 1,80% e 2,90% em média (Figuras 23 e 24A), respetivamente.

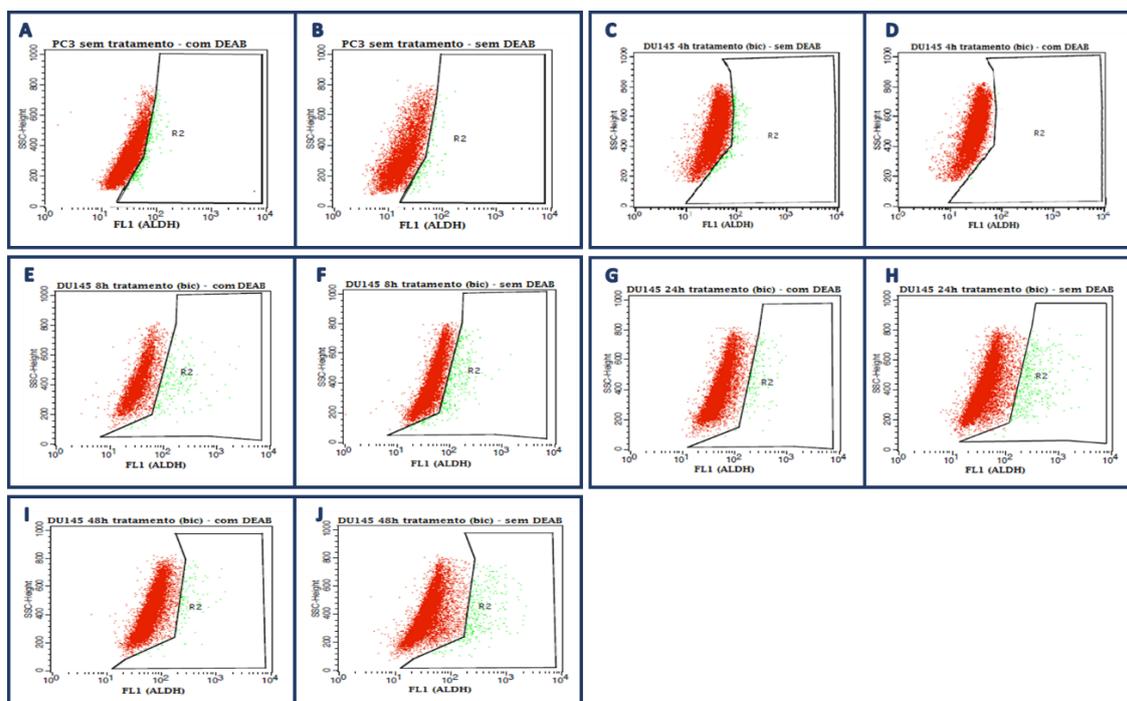


**Figura 23: Efeito sobre a expressão da atividade de ALDH nas células DUI45 tratadas com docetaxel<sub>1</sub> em função do tempo de incubação (4, 8, 24 e 48 horas) – ALDEFUOR™ assay kit.** As amostras que receberam o inibidor DEAB serviram de controlo para a determinação do gate R2 de cada condição testada: sem fármaco (A,B), 4 h (C,D), 8 h, dividido em dois tratamentos de 4 h cada, com uma de diferença entre eles (E,F), 24 h (G,H) e 48 h, dividido em dois tratamentos de 24 h cada, com um dia de diferença entre eles (I,J). Foram lidos 15000 eventos para cada amostra.



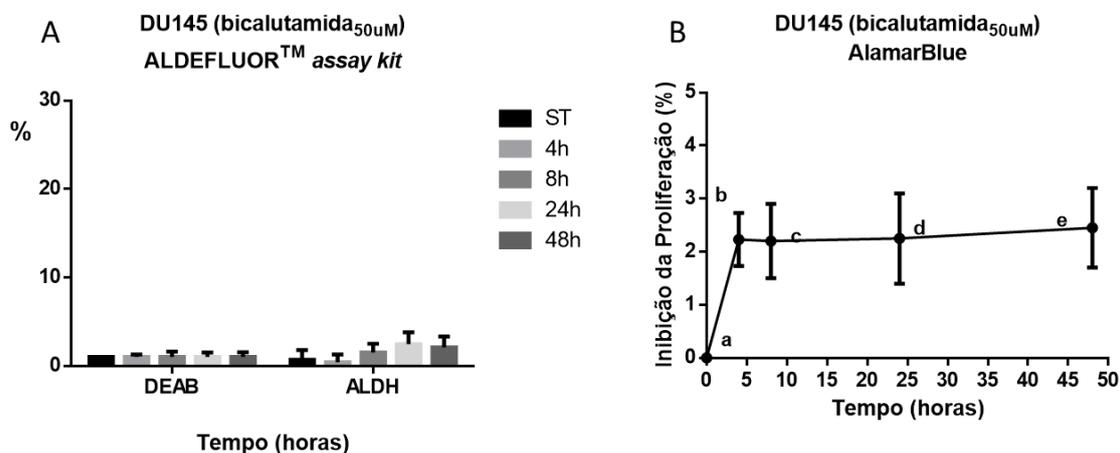
**Figura 24: Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH e do índice de inibição da proliferação em células DU145 após o tratamento por docetaxel.** Em ambos os gráficos, os valores foram calculados pela média obtida através de três repetições da experiência. No gráfico A, o valor de DEAB foi fixado para 1% em todas as análises. **ST**: células sem tratamento; **4h**: células tratadas por 4 horas; **8h**: células tratadas por 8 horas, divididas em dois tratamentos de 4 horas cada, com intervalo de um dia entre eles; **24h**: células tratadas por 24 horas; **48h**: células tratadas por 48 horas, divididas em dois tratamentos de 24 horas cada e um intervalo de um dia entre eles.

O tratamento das células DU145 com bicalutamida demonstrou, novamente semelhante à PC3, que o fármaco desencadeou um efeito residual nas células testadas, uma vez que não houve um aumento significativo tanto das células ALDH positivas (Figura 25 e 26A) quanto da inibição da proliferação (Figura 26B).



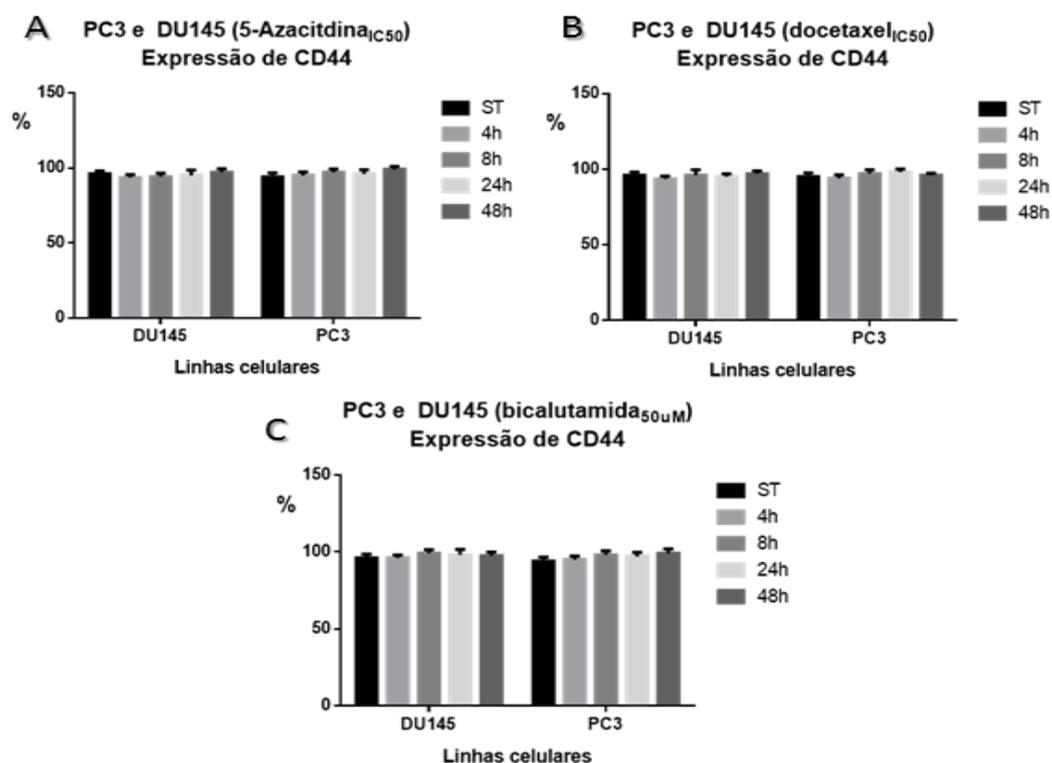
**Figura 25: Efeito sobre a expressão da atividade de ALDH nas células DU145 tratadas com bicalutamida(50µM) em função do tempo de incubação (4, 8, 24 e 48 horas) – ALDEFLUOR™ assay kit.** As amostras que receberam o inibidor DEAB

serviram de controlo para a determinação do *gate* R2 de cada condição testada: sem fármaco (A,B), 4 h (C,D), 8 h, dividido em dois tratamentos de 4 h cada, com uma de diferença entre eles (E,F), 24 h (G,H) e 48 h, dividido em dois tratamentos de 24 h cada, com um dia de diferença entre eles (I,J). Foram lidos 15000 eventos para cada amostra.



**Figura 26: Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH e do índice de inibição da proliferação em células DU145 após o tratamento por bicalutamida.** Em ambos os gráficos, os valores foram calculados pela média obtida através de três repetições da experiência. No gráfico A, o valor de DEAB foi fixado para 1% em todas as análises. **ST**: células sem tratamento; **4h**: células tratadas por 4 horas; **8h**: células tratadas por 8 horas, divididas em dois tratamentos de 4 horas cada, com intervalo de um dia entre eles; **24h**: células tratadas por 24 horas; **48h**: células tratadas por 48 horas, divididas em dois tratamentos de 24 horas cada e um intervalo de um dia entre eles.

No entanto, a expressão deste marcador foi similar tanto para as PC3 quanto para as DU145 após os tratamentos com os três fármacos, apresentando uma variação entre 91-99% (Figuras 27A, B e C).



**Figura 27: Avaliação da expressão do marcador CD44 nas linhas celulares DU145 e PC3 após o tratamento com bicalutamida, docetaxel e 5-AzaC.** Em todos os gráficos, os valores foram calculados pela média obtida através de três repetições da experiência **ST**: células sem tratamento; **4h**: células tratadas por 4 horas; **8h**: células tratadas por 8 horas, divididas em dois tratamentos de 4 horas cada, com intervalo de um dia entre eles; **24h**: células tratadas por 24 horas; **48h**: células tratadas por 48 horas, divididas em dois tratamentos de 24 horas cada e um intervalo de um dia entre eles.

Os resultados decorrentes de qualquer uma das incubações realizadas, foram semelhantes tanto para as DU145 como para as PC3. Em ambos os casos, observou-se um aumento do número de células com expressão de alta atividade de ALDH após 24 e 48 horas tratamento. O mesmo aumento não foi notado para as células incubadas durante 4 e 8 horas. Sabe-se que o mecanismo de ação do docetaxel se baseia no bloqueio da mitose e o *doubling-time* celular foi calculado para aproximadamente 25 horas (PC3) e 26 horas (DU145). Já o mecanismo de ação do 5-azacitidina ainda não foi totalmente esclarecido em relação ao momento exato em que o fármaco causa a morte das células. Rhee, Bachman et al. (2002) demonstraram que o tratamento com 5-azacitidina em células cancerígenas levou à reativação de um gene inibidor do ciclo celular, o *p16INK4a*. Outros estudos têm evidenciado a ação do 5-Aza-C como um modelador do ciclo celular não somente em células cancerígenas, mas também em células musculares (Montesano, Luzi et al. 2013), por exemplo.

Van den Hoogen et al. (2010) defenderam que a alta atividade de ALDH nas células poderia ser um marcador para CIT e células iniciadores de metástase (CIM) do cancro da próstata,

depois de demonstrarem que as células ALDH<sup>+</sup> foram capazes de formar colónias maiores e em maior número pelo em ensaios clonogénicos e apresentarem uma maior expressão dos marcadores de CEC/progenitores do tumor – integrina  $\alpha_2$ /CD44 – que as células ALDH<sup>-</sup>. Jeter et al. (2011) detetaram um aumento de células DUI45 ALDH positivas após a indução do gene NANOG, um gene que tem sido considerado promotor de características estaminais.

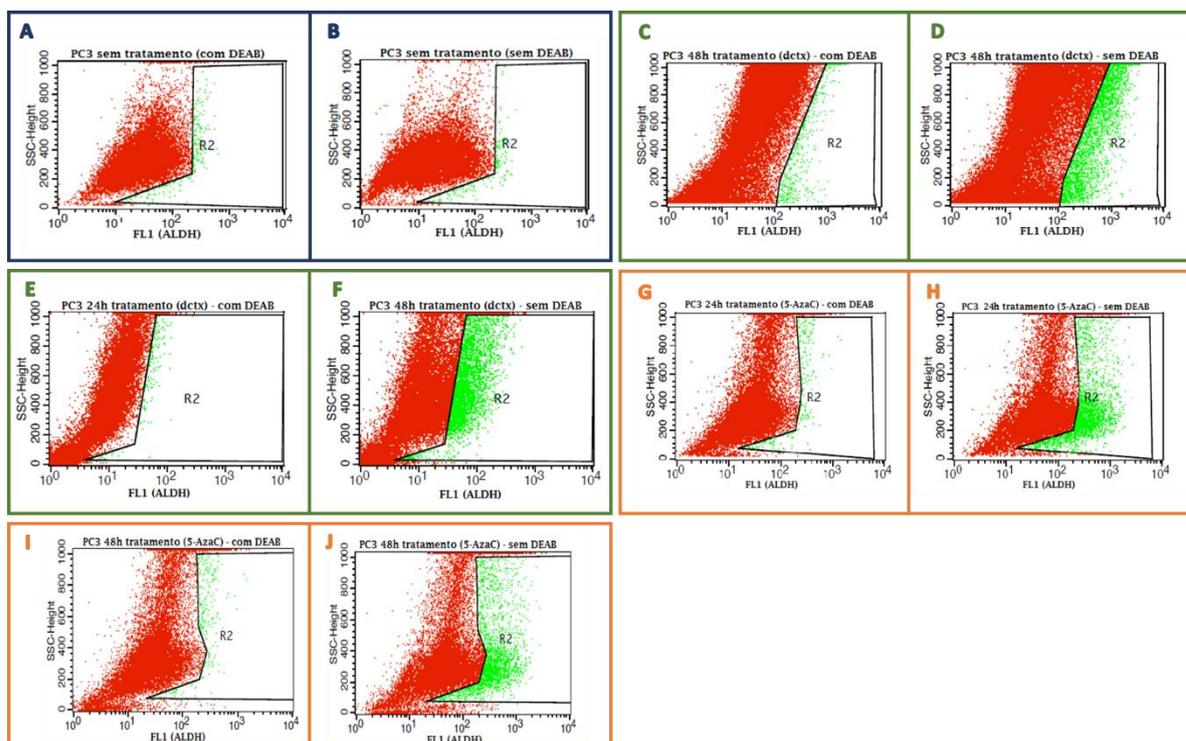
O aumento do número de células ALDH positivas, aliado ao aumento do índice de inibição da proliferação demonstra que, provavelmente, o aumento da expressão de alta atividade de ALDH não seja desenvolvido pelas células em resposta ao tratamento, mas sim, devido à maior inibição da proliferação das células menos resistentes. Após a morte das outras células, as células ALDH positivas provavelmente ganharam destaque, uma vez que, segundo evidências diversas (Croker, Goodale et al. 2009; Huang, Hynes et al. 2009; Jiang, Qiu et al. 2009; Li, Su et al. 2010; Marcato, Dean et al. 2011; Croker and Allan 2012; Shenoy, Butterworth et al. 2012), são células com resistência à terapia. Baseado no princípio dos métodos, é possível tentar entender a diferença entre estes resultados. O ALDEFLUOR só atua em células viáveis, assim como o AlamarBlue. No entanto, na citometria de fluxo, as células são devidamente contadas pelo método do Azul de Tripán, antes da marcação, tornando-se possível uma seleção das células viáveis para análise. Logo, no grupo de células não tratadas, o número de células viáveis é muito maior que no grupo incubado durante 24 horas, sendo a probabilidade de “escolher” células com alta expressão de ALDH menor. Como as células após incubação de 24 horas já sofreram grandes perdas e morte, as células viáveis contadas serão provavelmente aquelas células mais resistentes à terapia, com uma maior probabilidade de seleção das células ALDH positivas. Já com a análise por AlamarBlue, esta contagem não é realizada e todas as amostras recebem a mesma concentração de reagente, independentemente do número de células viáveis ali presentes, logo, as células que receberam um tratamento por mais tempo, apresentarão uma menor densidade celular, resultando numa menor deteção da viabilidade.

Como um maior número de células ALDH positivas foi detetado após 24 e 48 horas de tratamento, decidi realizar-se uma terceira experiência para tentar perceber se o tempo entre os tratamentos causaria alguma variação nestes resultados. Ao invés de incubar somente 96 horas como nas secções 4.2.1 e 4.2.2, na secção 4.2.3 o tempo de incubação foi de 192 horas (96 horas + 96 horas). Um grupo foi incubado apenas nas primeiras 24 horas e

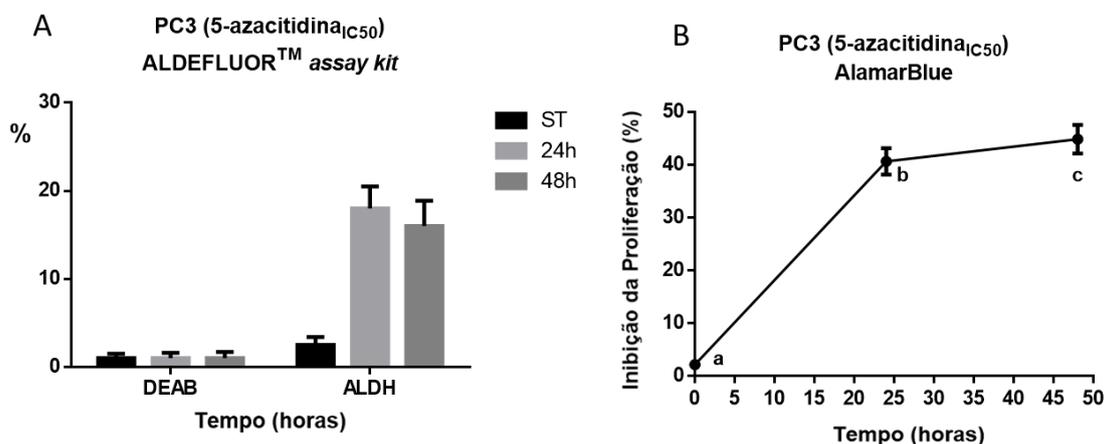
deixado em repouso, por mais 168 horas sem tratamento. O outro grupo foi tratado nas primeiras 24 horas, deixado em repouso por mais 72 horas ( $24 + 72 = 96$  horas) e recebeu novamente tratamento por mais 24 horas, totalizando 48 horas de tratamento. Por fim foi deixado em repouso sem fármaco até completar as 192 horas de incubação (secção 4.2.3).

#### 4.2.3 Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH em células PC3 e DU145 após tratamento com citostáticos por 24 e 48 horas com um maior intervalo entre as incubações

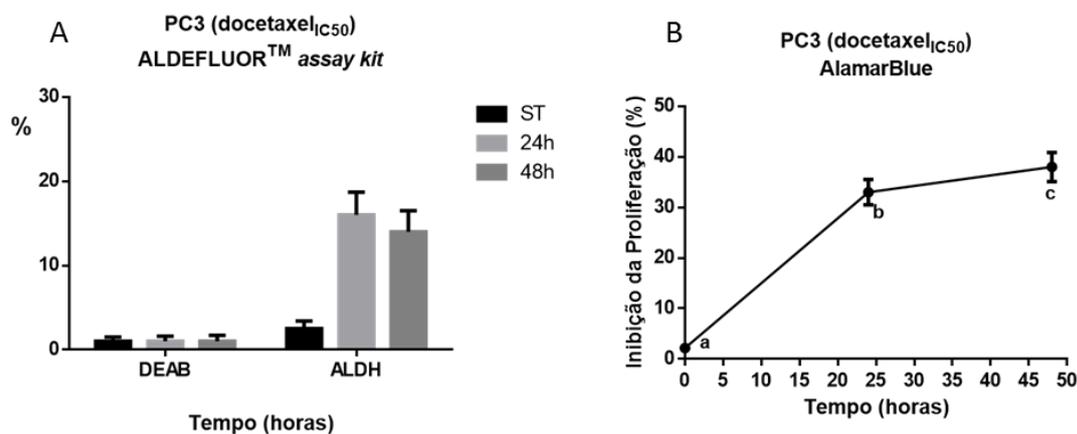
Apesar de um maior intervalo - 72 horas - entre os tratamentos de 48 horas, não foi observada uma diferença relevante entre os níveis de células ALDH positivas obtidos deste teste e dos testes apresentados na secção 5.3.2, com apenas 24 horas de intervalo entre as incubações correspondentes. Nas células PC3 ocorreu um aumento de 13,5% e 11,5% no número de células ALDH positivas após 24 e 48 horas de incubação com docetaxel, respetivamente (Figura 28 e 30A) Os índices de inibição da proliferação também permaneceram semelhantes à experiência anterior, apresentando-se em torno de 35% e 39% após 24 e 48 horas de tratamento, respetivamente (Figura 29B). Após o tratamento com 5-AzaC, notou-se um aumento de 15,5% após 24 horas e 13,4% após 48 horas de tratamento (Figura 28 e 29A) O índice de inibição da proliferação apresentou-se por volta de 43,5% e 48%, após 24 e 48 horas de tratamento, respetivamente.



**Figura 28: Efeito sobre a expressão da atividade de ALDH nas células PC3 tratadas com docetaxel  $IC_{50}$  e 5-Aza $IC_{50}$  em função do tempo de incubação (24 e 48 horas) – ALDEFLUOR™ assay kit.** As amostras que receberam o inibidor DEAB serviram de controlo para a determinação do gate R2 de cada condição testada: sem fármaco (A,B), 24 h com docetaxel (C,D), 48 h com docetaxel (E,F), 24 h com 5-AzaC (G,H) e 48 h com 5-AzaC (I,J). Os tratamentos de 48 h foram divididos em dois tratamentos de 24 h cada, com 72 h de diferença entre ele. Foram lidos 15000 eventos para cada amostra.

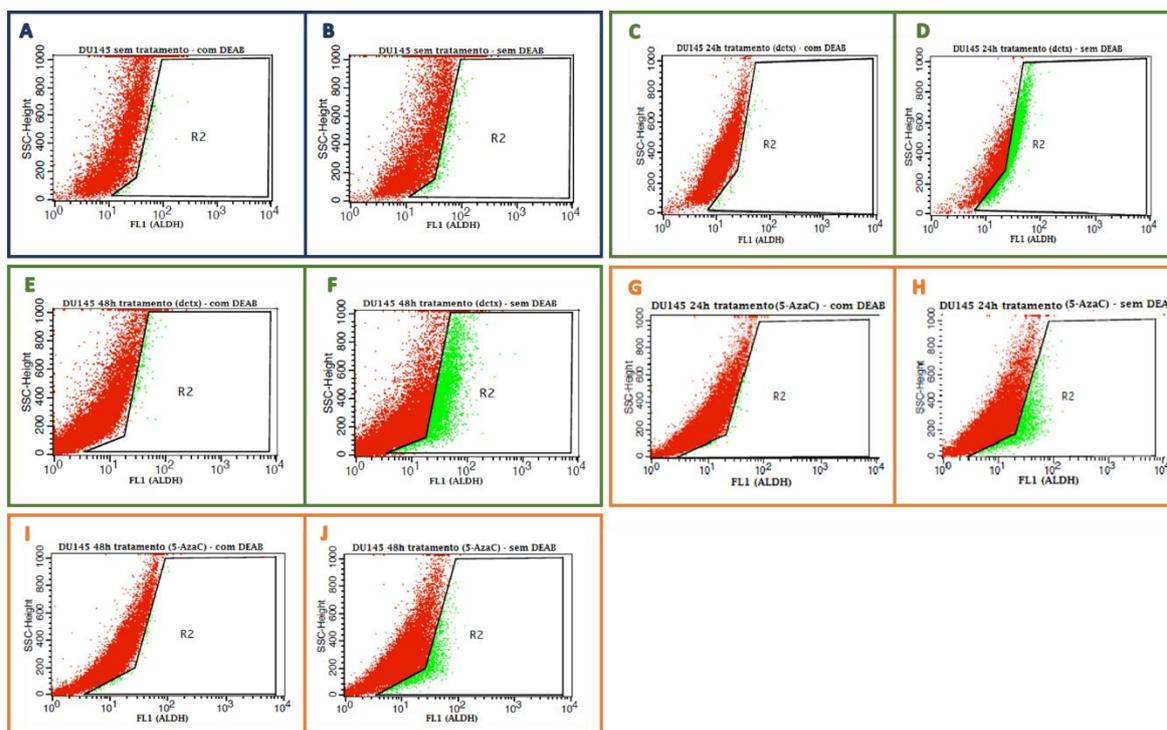


**Figura 29: Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH e do índice de inibição da proliferação em células PC3 após o tratamento por 5-AzaC.** Em ambos os gráficos, os valores foram calculados pela média obtida através de três repetições da experiência. No gráfico A, o valor de DEAB foi fixado para 1% em todas as análises. **ST:** células sem tratamento; **24h:** células tratadas por 24 horas; **48h:** células tratadas por 48 horas, divididas em dois tratamentos de 24 horas cada e um intervalo de 72 horas entre eles.

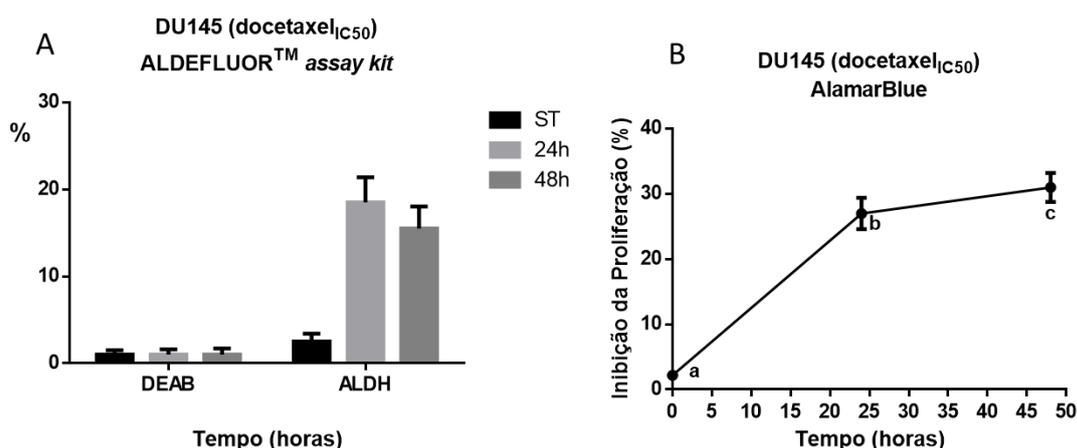


**Figura 30: Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH e do índice de inibição da proliferação em células PC3 após o tratamento por docetaxel.** Em ambos os gráficos, os valores foram calculados pela média obtida através de três repetições da experiência. No gráfico A, o valor de DEAB foi fixado para 1% em todas as análises. **ST**: células sem tratamento; **24h**: células tratadas por 24 horas; **48h**: células tratadas por 48 horas, divididas em dois tratamentos de 24 horas cada e um intervalo de 72 horas entre eles.

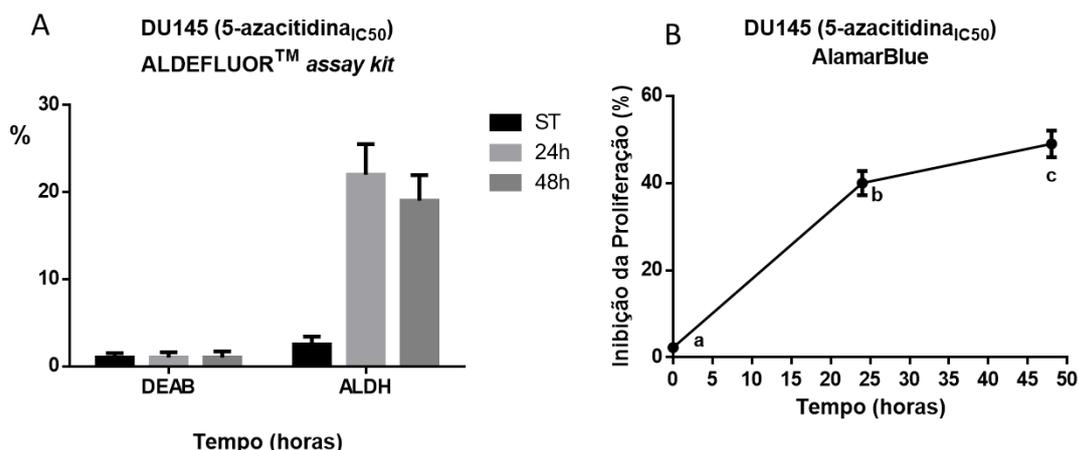
Nas células DUI45, ocorreu um aumento de 16,5% e 14,0% após o tratamento por 24 e 48 h com docetaxel (Figuras 31 e 32A) e de 18,5% e 16,5%, respectivamente, com 5-AzaC (Figura 31 e 33A). Os índices de inibição da proliferação após os tratamentos por 24 e 48 horas foram de 29,0% e 32,0%, respectivamente, para as células tratadas com docetaxel (Figura 32B) e de 45,0% e 50,0%, respectivamente, para as células tratadas com 5-AzaC (Figura 33B).



**Figura 31:** Efeito sobre a expressão da atividade de ALDH nas células DU145 tratadas com docetaxel  $IC_{50}$  e 5-AzaC  $IC_{50}$  em função do tempo de incubação (24 e 48 horas) – ALDEFLUOR™ assay kit. As amostras que receberam o inibidor DEAB serviram de controle para a determinação do gate R2 de cada condição testada: sem fármaco (A,B), 24 h com docetaxel (C,D), 48 h com docetaxel (E,F), 24 h com 5-AzaC (G,H) e 48 h com 5-AzaC (I,J). Os tratamentos de 48 h foram divididos em dois tratamentos de 24 h cada, com 72 h de diferença entre ele. Foram lidos 15000 eventos para cada amostra.

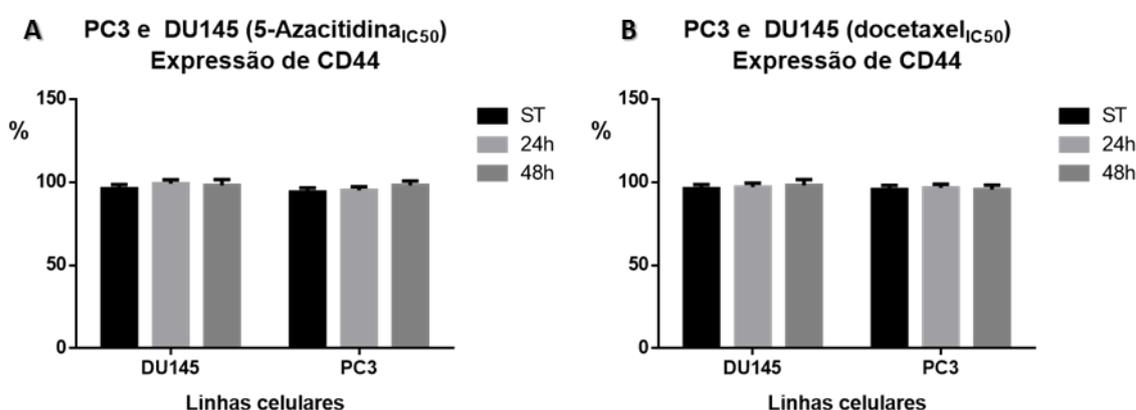


**Figura 32:** Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH e do índice de inibição da proliferação em células DU145 após o tratamento por docetaxel. Em ambos os gráficos, os valores foram calculados pela média obtida através de três repetições da experiência. No gráfico A, o valor de DEAB foi fixado para 1% em todas as análises. **ST:** células sem tratamento; **24h:** células tratadas por 24 horas; **48h:** células tratadas por 48 horas, divididas em dois tratamentos de 24 horas cada e um intervalo de 72 horas entre eles.



**Figura 33: Avaliação da expressão de alta atividade de ALDH e do índice de inibição da proliferação em células DU145 após o tratamento por 5-AzaC.** Em ambos os gráficos, os valores foram calculados pela média obtida através de três repetições da experiência. No gráfico A, o valor de DEAB foi fixado para 1% em todas as análises. **ST**: células sem tratamento; **24h**: células tratadas por 24 horas; **48h**: células tratadas por 48 horas, divididas em dois tratamentos de 24 horas cada e um intervalo de 72 horas entre eles.

Assim como nos testes anteriores, as células marcadas com ALDEFLUOR também foram marcadas com CD44. Praticamente todas as células apresentaram uma expressão de CD44 maior que 97% (Figura 34).

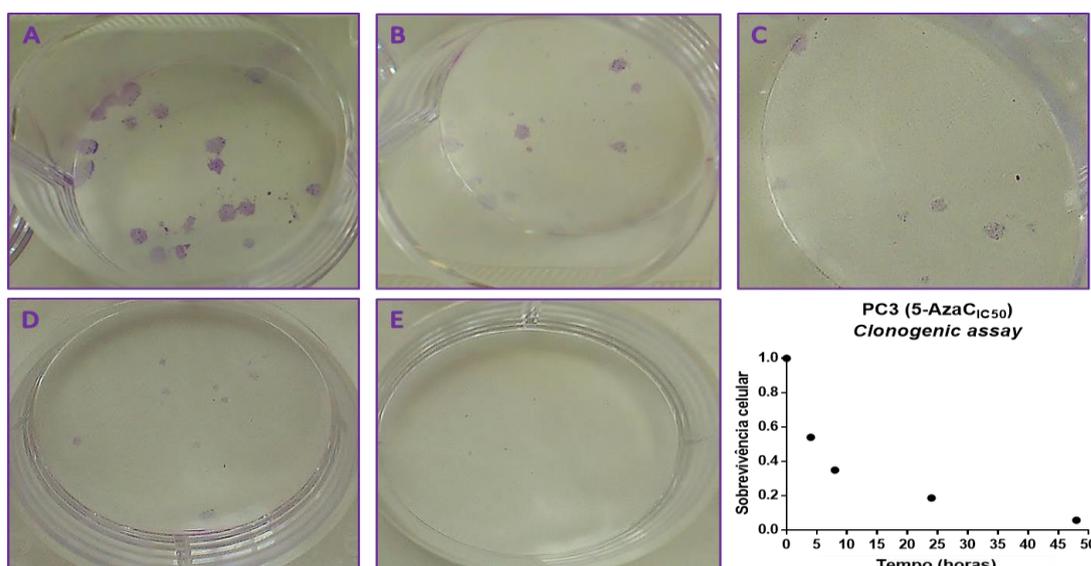


**Figura 34: Avaliação da expressão do marcador CD44 nas linhas celulares DU145 e PC3 após o tratamento por docetaxel e 5-AzaC.** Em todos os gráficos, os valores foram calculados pela média obtida através de três repetições da experiência. **ST**: células sem tratamento; **24h**: células tratadas por 24 horas; **48h**: células tratadas por 48 horas, divididas em dois tratamentos de 24 horas cada e um intervalo de 72 horas entre eles.

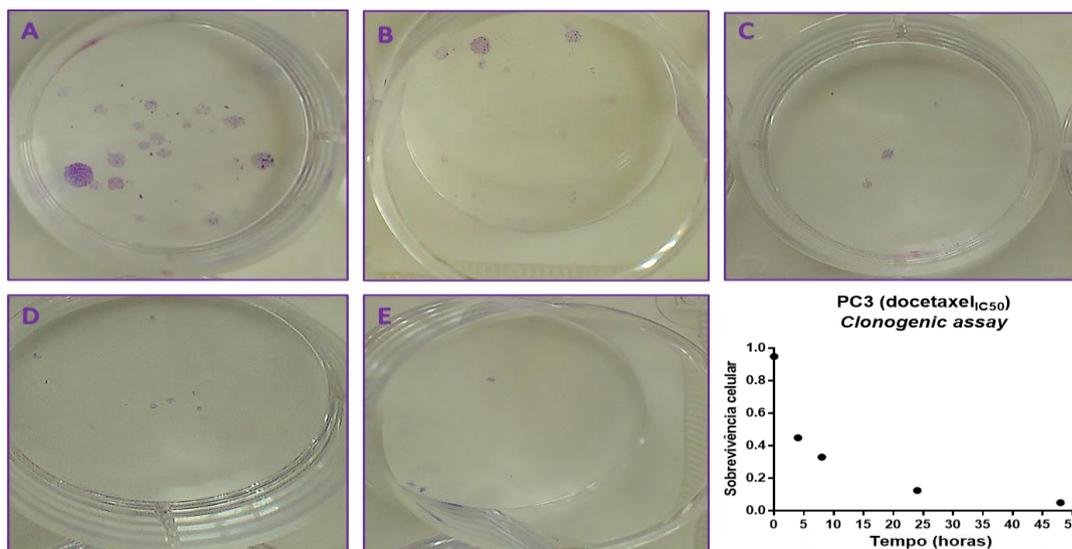
As linhas células PC3 e DU145 apresentaram um aumento do número de células ALDH positivas após incubação de 24 horas e 48 horas com ambos os citostáticos. Decidiu-se realizar um ensaio clonogênico utilizando os mesmos tempos de incubação e mesmo fármacos para tentar avaliar se estes grupos que apresentam células com maior expressão de ALDH também teriam maior capacidade clonogênica.

### 4.3 Avaliação da capacidade clonogénica das células PC3 e DUI45 após incubação com citostáticos

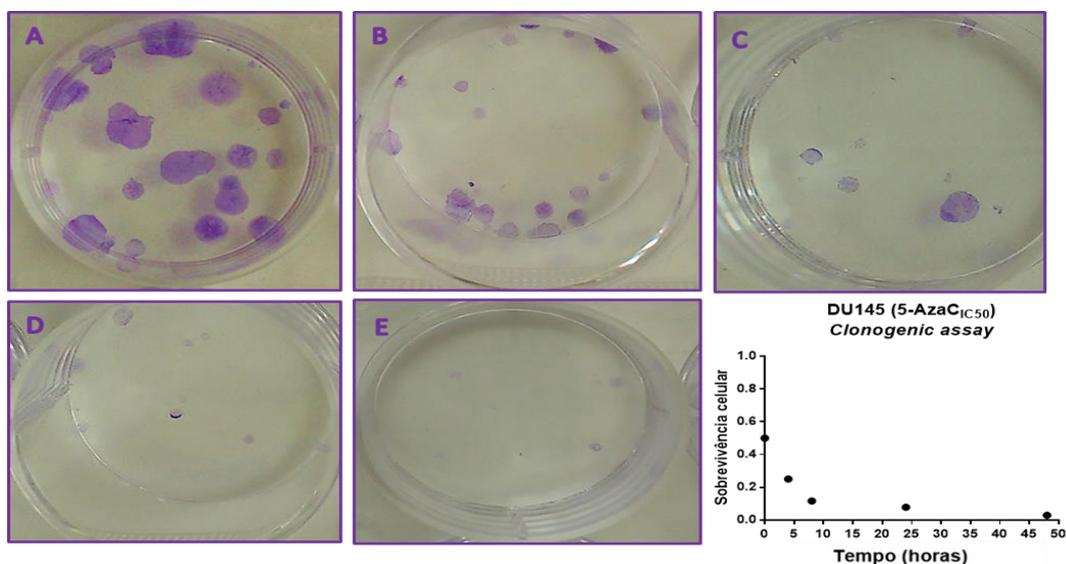
As células foram fixadas quando ocorreu a formação de colónias (50 ou mais células) pelos grupos sem qualquer incubação com os citostáticos (grupo controlo), o que aconteceu após 10 dias com as PC3 (Figuras 35 e 36) e 14 dias com as DUI45 (Figuras 37 e 38). Como pode ser observado nas imagens abaixo, houve uma grande diferença entre o número de colónias formadas pelas células sem tratamento e pelas demais. Apesar de tanto as DUI45 quanto as PC3 tratadas por 4 e 8 horas – por docetaxel e 5-AzaC - não terem demonstrado grandes diferenças em relação às não tratadas durante as análises com ALDEFLUOR e AlamarBlue, o mesmo não ocorreu neste ensaio. Visualmente, nota-se que as células que receberam tratamento por 4 e 8 horas tiveram uma capacidade de formação de colónias bem inferior às células sem tratamento.



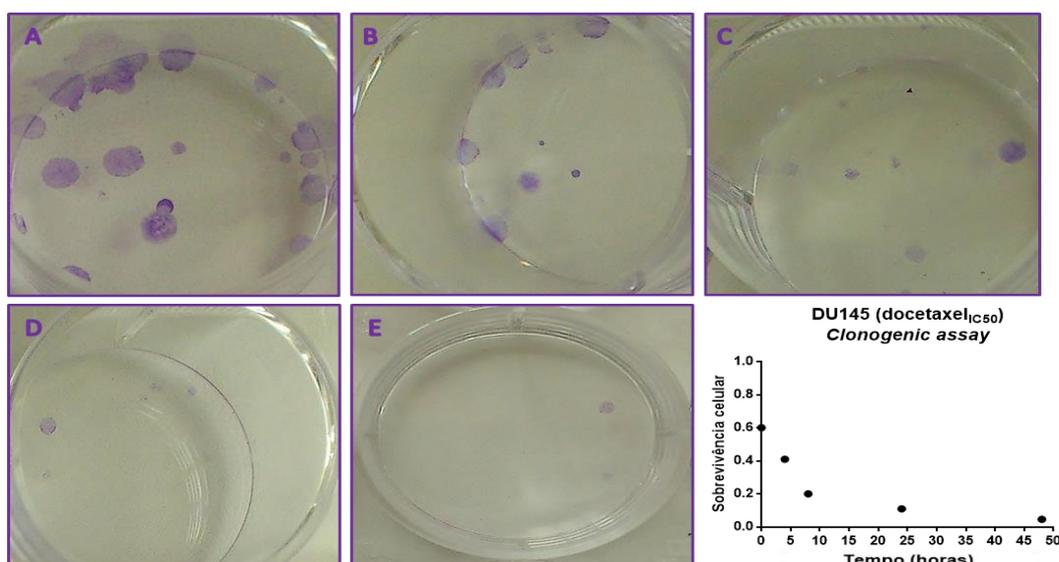
**Figura 36: Formação de colónias pelas células PC3 após tratamento com 5-AzaC em função do tempo de tratamento (4, 8, 24 e 48 horas).** As células PC3 foram plaqueadas em diferentes densidades: 500 células (A), 600 células (B), 700 células (C), 1000 células (D) e 1500 células (E) por poço e tratadas com 5-AzaC<sub>IC50</sub>. A: sem tratamento; B: 4 horas de tratamento; C: 8 horas de tratamento, dividido em dois tratamentos com 4 horas cada e um dia de diferença entre eles; D: 24 horas de tratamento; E: 48 horas de tratamento, dividido em dois tratamentos com 24 horas cada e um dia de diferença entre eles. As colónias foram fixadas e contadas após 10 dias de incubação. O gráfico ilustra a curva de sobrevivência celular traçada com auxílio das fórmulas de eficiência de plaqueamento e fração de sobrevivência (Materiais e Métodos).



**Figura 37: Formação de colônias pelas células PC3 após tratamento por docetaxel em função do tempo de tratamento (4, 8, 24 e 48 horas).** As células PC3 foram plaqueadas em diferentes densidades: 500 células (A), 600 células (B), 700 células (C), 1000 células (D) e 1500 células (E) por poço e tratadas com 5-AzaC<sub>IC50</sub>. A: sem tratamento; B: 4 horas de tratamento; C: 8 horas de tratamento, dividido em dois tratamentos com 4 horas cada e um dia de diferença entre eles; D: 24 horas de tratamento; E: 48 horas de tratamento, dividido em dois tratamentos com 24 horas cada e um dia de diferença entre eles. As colônias foram fixadas e contadas após 10 dias de incubação. O gráfico ilustra a curva de sobrevivência celular traçada com auxílio das fórmulas de eficiência de plaqueamento e fração de sobrevivência (Materiais e Métodos).



**Figura 38: Formação de colônias pelas células DU145 após tratamento por 5-AzaC em função do tempo de tratamento (4, 8, 24 e 48 horas).** As células DU145 foram plaqueadas em diferentes densidades: 500 células (A), 600 células (B), 700 células (C), 1000 células (D) e 1500 células (E) por poço e tratadas com 5-AzaC<sub>IC50</sub>. A: sem tratamento; B: 4 horas de tratamento; C: 8 horas de tratamento, dividido em dois tratamentos com 4 horas cada e um dia de diferença entre eles; D: 24 horas de tratamento; E: 48 horas de tratamento, dividido em dois tratamentos com 24 horas cada e um dia de diferença entre eles. As colônias foram fixadas e contadas após 10 dias de incubação. O gráfico ilustra a curva de sobrevivência celular traçada com auxílio das fórmulas de eficiência de plaqueamento e fração de sobrevivência (Materiais e Métodos).



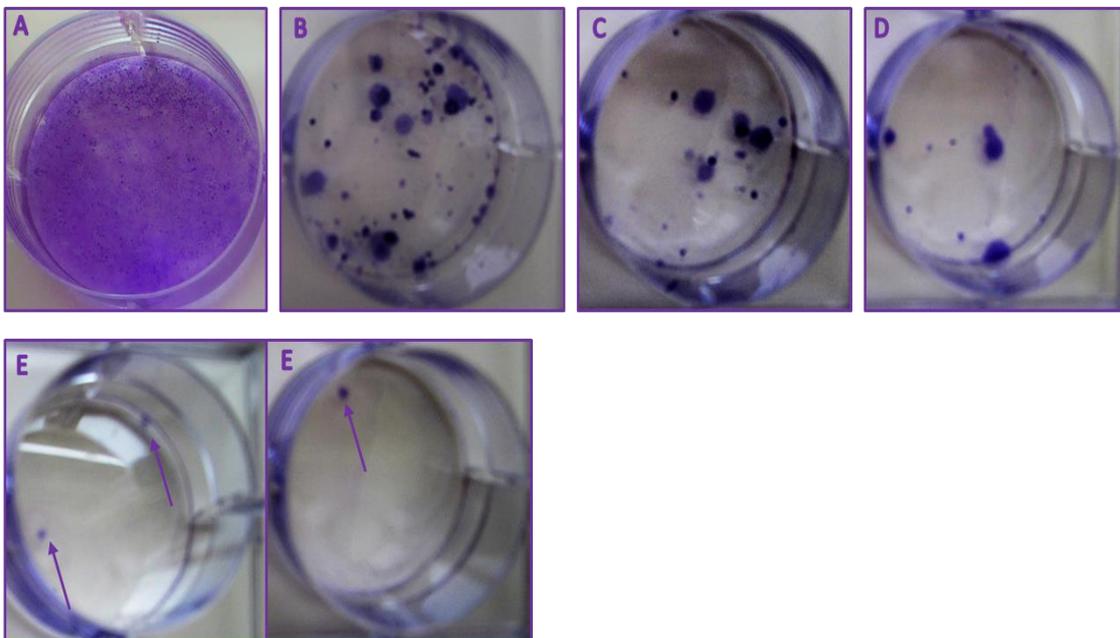
**Figura 39: Formação de colónias pelas células DU145 após tratamento por docetaxel em função do tempo de tratamento (4, 8, 24 e 48 horas).** As células DU145 foram plaqueadas em diferentes densidades: 500 células (A), 600 células (B), 700 células (C), 1000 células (D) e 1500 células (E) por poço e tratadas com 5-AzaC<sub>150</sub>. A: sem tratamento; B: 4 horas de tratamento; C: 8 horas de tratamento, dividido em dois tratamentos com 4 horas cada e um dia de diferença entre eles; D: 24 horas de tratamento; E: 48 horas de tratamento, dividido em dois tratamentos com 24 horas cada e um dia de diferença entre eles. As colónias foram fixadas e contadas após 10 dias de incubação. O gráfico ilustra a curva de sobrevivência celular traçada com auxílio das fórmulas de eficiência de plaqueamento e fração de sobrevivência (Materiais e Métodos).

Existe uma diferença importante entre os ensaios de AlamarBlue e o ensaio clonogénico: ambos avaliam, de uma certa forma, a viabilidade celular. No entanto, poderíamos refletir até que ponto uma célula seria considerada viável. Há células que são viáveis, mas com a proliferação inibida, porém não são capazes de formar clones/colónias, devido a diferentes fatores, como por exemplo, células que tiveram seu metabolismo afetado após a incubação com um agente citostático. A diferença entre os dois ensaios encontra-se exatamente nesta questão. O AlamarBlue é um teste que avalia a viabilidade celular de uma forma mais ampla, ou seja, não é capaz de identificar se a célula é suficientemente viável para formar um clone. O ensaio clonogénico vai um pouco mais além e avalia a capacidade de uma célula, após exposição a um fator de agressão (p.e: radioterapia, quimioterapia, hipóxia), em formar um clone ou uma colónia.

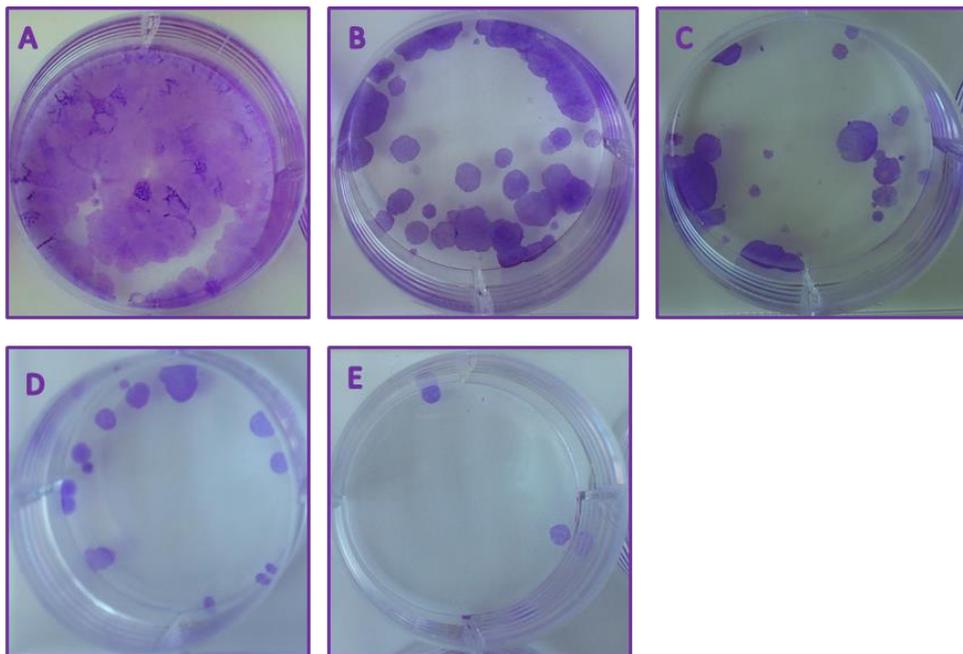
Nos resultados ilustrados acima é possível ver a maioria das colónias macroscopicamente. O protocolo deste ensaio indica que as etapas de fixação e contagem devem ser realizadas no momento em que as células não tratadas formarem colónias com 50 ou mais células. Porém, ao serem observadas ao microscópio, notou-se a presença de muitas células viáveis isoladas e/ou em pequenas colónias (com menos de 15 células) nos grupos que incubados com os citostáticos. Estas, mediante tempos de incubação mais prolongados, poderiam,

provavelmente, formar colónias maiores. Tanto o 5-azacitidina, quanto o docetaxel são fármacos bastante agressivos e mesmo que não levem à morte celular, produzem um efeito sobre o metabolismo destas células. Como o objetivo do ensaio clonogénico é justamente testar a capacidade de uma célula em formar um clone ou colónia, talvez se estas células ficassem incubadas por tempo suficiente para a recuperação deste enfraquecimento, poderíamos ter uma real noção da amplitude da ação do agente quimioterapêutico. Teriam elas sido afetadas pelo fármaco a ponto de, apesar de não terem sofrido apoptose, perderem a capacidade de formação de clones/colónias ou será que apenas necessitariam de mais tempo para recuperação?

As figuras abaixo ilustram um teste realizado com o objetivo de tentar entender melhor esta questão. As células foram tratadas com docetaxel durante 24, 48, 72 e 96 horas e depois deixadas incubar até que se notasse a formação de colónias pelo grupo tratado por 96 horas – o tratamento mais agressivo. As PC3 formaram colónias após 21 dias de incubação, ou seja, 17 após a troca do meio com fármaco por meio sem fármaco (Figura 40) e as DU145 após 27 dias - 23 dias após o tratamento por 96 horas (Figura 41). Notou-se, no entanto, que apesar de demonstrarem uma recuperação, nas amostras tratadas por 24 horas, as células (DU145 e PC3) não conseguiram repovoar o poço, mesmo com o maior período de incubação.



**Figura 40: Formação de colónias pelas células PC3 após tratamento por docetaxel em função do tempo de tratamento (24, 48, 72 e 96 horas).** As células PC3 foram plaqueadas em diferentes densidades: 500 células (A), 1000 células (B), 1500 células (C), 2000 células (D) e 2500 células (E) por poço e tratadas com docetaxel<sub>IC50</sub>. A: sem tratamento; B: 24 horas de tratamento; C: 48 horas de tratamento; D: 72 horas de tratamento; E: 96 horas de tratamento. As colónias foram fixadas e contadas após 21 dias de incubação.



**Figura 41: Formação de colónias pelas células DU145 após tratamento por docetaxel em função do tempo de tratamento (24, 48, 72 e 96 horas).** As células DU145 foram plaqueadas em diferentes densidades: 500 células (A), 1000 células (B), 1500 células (C), 2000 células (D) e 2500 células (E) por poço e tratadas com docetaxel<sub>IC50</sub>. A: sem tratamento; B: 24 horas de tratamento; C: 48 horas de tratamento; D: 72 horas de tratamento; E: 96 horas de tratamento. As colónias foram fixadas e contadas após 27 dias de incubação.

## 5. Conclusão

A pesquisa de marcadores específicos e eficazes para identificação das células com características estaminais é ainda alvo de forte investigação na atualidade. O ALDEFUOR tem sido amplamente utilizado nesta pesquisa, principalmente com o objetivo de marcar e isolar as células que expressem alta atividade de ALDH, um promissor marcador para estas células. Estas, depois de isoladas, podem ser utilizadas para inúmeras experiências, como ensaios de proliferação e invasão, identificação de possíveis marcadores, enriquecimento em condições especiais para formação de esferas, entre outros (Awad, Yustein et al. 2010; Shenoy, Butterworth et al. 2012; Mao, Joshi et al. 2013) No entanto, há ainda uma discordância entre os investigadores quanto à associação entre a alta atividade de ALDH e as células estaminais cancerígenas. Não foi totalmente esclarecido se esta atividade estaria ligada especificamente às CEC ou seria somente uma característica de células mais resistentes e com maior potencial maligno, como as células iniciadoras de tumor e as células iniciadoras de metástase.

As linhas celulares PC3 e DUI45 estão comumente presentes nas formas mais resistentes do cancro da próstata e foram incubadas com dois fármacos já utilizados na clínica, o docetaxel e 5-azacitidina, conhecidos pela sua agressividade de ação. Uma das maiores questões quando se trata de células/tumores resistentes à terapia é a origem dessa resistência. Neste contexto, é pertinente colocar a questão: seriam as células resistentes por algum fator ainda não esclarecido ou seria esta resistência desenvolvida após incubação com o fármaco?

Em suma, os resultados indicam que, após tratamento com o agente quimioterapêutico docetaxel, as células PC3 e DUI45 mostraram um aumento significativo na população de células com elevada expressão de atividade ALDH (até 20% vezes de aumento) pelo método ALDEFUOR. O mesmo foi observado com 5-azacitidina onde foi observado aumento de até 18%. Curiosamente, quando usamos a bicalutamida não foram observadas quaisquer alterações na população das células ALDH positivas antes e após o tratamento. Isto era esperado uma vez que a bicalutamida é um fármaco análogo da testosterona e depende da presença de recetores de androgénio, que não estão presentes nas linhas celulares testadas. Além disso, os resultados foram confirmados usando ensaios clonogénicos onde as células após um longo período de incubação com o fármaco e permaneceram algum tempo em estado de latência e posteriormente voltaram a formar colónias.

Tomados em conjunto os nossos resultados levaram-nos a hipótese de que o tratamento com citostáticos promove um enriquecimento da subpopulação de células ALDH positivas do câncer de próstata. Isto pode ter um grande significado biológico e clínico e abre novas janelas para o manejo desta doença devastadora. Num futuro próximo seria primordial identificar quais vias metabólicas são ativadas após o tratamento e são responsáveis por quimiorresistência. Isso levaria a revelar novos alvos terapêuticos que poderiam ser desenvolvidas para atingir especificamente as células estaminais cancerígenas e, portanto, evitar a recorrência do tumor.

## 6. Referências

- Al-Nasiry, S., N. Geusens, et al. (2007). "The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells." Hum Reprod **22**(5): 1304-1309.
- Angelo Oliveira, I. M. G., Maria Emília Monteiro Pereira, Paula Soares (2005). "Radioterapia no cancro da próstata " Acta Urológica: 17-25.
- Awad, O., J. T. Yustein, et al. (2010). "High ALDH activity identifies chemotherapy-resistant Ewing's sarcoma stem cells that retain sensitivity to EWS-FLI1 inhibition." PLoS One **5**(11): e13943.
- Batts, T. D., H. L. Machado, et al. (2011). "Stem cell antigen-1 (sca-1) regulates mammary tumor development and cell migration." PLoS One **6**(11): e27841.
- Bertram G. Katzung, S. B. M., Anthony J. Trevor (2005). "Basic & Clinical Pharmacology ".
- Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med **3**(7): 730-737.
- Burger, P. E., R. Gupta, et al. (2009). "High aldehyde dehydrogenase activity: a novel functional marker of murine prostate stem/progenitor cells." Stem Cells **27**(9): 2220-2228.
- Charafe-Jauffret, E., C. Ginestier, et al. (2010). "Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer." Clin Cancer Res **16**(1): 45-55.
- Clevers, H. (2011). "The cancer stem cell: premises, promises and challenges." Nat Med **17**(3): 313-319.
- Collins, A. T., P. A. Berry, et al. (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." Cancer Res **65**(23): 10946-10951.
- Crocker, A. K. and A. L. Allan (2012). "Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44(+) human breast cancer cells." Breast Cancer Res Treat **133**(1): 75-87.
- Crocker, A. K., D. Goodale, et al. (2009). "High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability." J Cell Mol Med **13**(8B): 2236-2252.
- Davies, D. (2007). "Cell Sorting by Flow Cytometry." Flow Cytometry: Principles and Applications: 257-277.
- Eramo, A., F. Lotti, et al. (2008). "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population." Cell Death Differ **15**(3): 504-514.
- Fabbri, F., S. Carloni, et al. (2006). "Sequential events of apoptosis involving docetaxel, a microtubule-interfering agent: a cytometric study." BMC Cell Biol **7**: 6.
- Furr, B. J. and H. Tucker (1996). "The preclinical development of bicalutamide: pharmacodynamics and mechanism of action." Urology **47**(1A Suppl): 13-25; discussion 29-32.
- Gottesman, M. M. (2002). "Mechanisms of cancer drug resistance." Annu Rev Med **53**: 615-627.
- Guimarães, E. A. A. C. R. (2009). "Conceitos e métodos para formação em laboratórios de saúde." Fundação Oswaldo Cruz: 2161-2521.
- Horst, D., L. Kriegel, et al. (2009). "Prognostic significance of the cancer stem cell markers CD133, CD44, and CD166 in colorectal cancer." Cancer Invest **27**(8): 844-850.

- Huang, E. H., M. J. Hynes, et al. (2009). "Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis." Cancer Res **69**(8): 3382-3389.
- Isaacs, J. T. and D. S. Coffey (1989). "Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia." Prostate Suppl **2**: 33-50.
- Jeter, C. R., B. Liu, et al. (2011). "NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation." Oncogene **30**(36): 3833-3845.
- Jiang, F., Q. Qiu, et al. (2009). "Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer." Mol Cancer Res **7**(3): 330-338.
- Kiziltepe, T., T. Hideshima, et al. (2007). "5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells." Mol Cancer Ther **6**(6): 1718-1727.
- Li, H. and D. G. Tang (2011). "Prostate cancer stem cells and their potential roles in metastasis." J Surg Oncol **103**(6): 558-562.
- Li, T., Y. Su, et al. (2010). "ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome." Lab Invest **90**(2): 234-244.
- Long, R. M., C. Morrissey, et al. (2005). "Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies." Clin Sci (Lond) **108**(1): 1-11.
- Mao, P., K. Joshi, et al. (2013). "Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(21): 8644-8649.
- Marcato, P., C. A. Dean, et al. (2011). "Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis." Stem Cells **29**(1): 32-45.
- Montesano, A., L. Luzi, et al. (2013). "Modulation of cell cycle progression by 5-azacytidine is associated with early myogenesis induction in murine myoblasts." Int J Biol Sci **9**(4): 391-402.
- Munshi, A., M. Hobbs, et al. (2005). "Clonogenic cell survival assay." Methods Mol Med **110**: 21-28.
- O'Brien, J., I. Wilson, et al. (2000). "Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity." Eur J Biochem **267**(17): 5421-5426.
- Ojima, G. B. a. I. (2011). "Prostate and Colon Cancer Stem Cells as a Target for Anti-Cancer Drug Development." Cancer Stem Cells Theories and Practice, Prof. Stanley Shostak: 307-225-308.
- Pazdur, R., A. P. Kudelka, et al. (1993). "The taxoids: paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere)." Cancer Treat Rev **19**(4): 351-386.
- Pfeiffer, M. J. and J. A. Schalken (2010). "Stem cell characteristics in prostate cancer cell lines." Eur Urol **57**(2): 246-254.
- Rhee, I., K. E. Bachman, et al. (2002). "DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells." Nature **416**(6880): 552-556.
- Shenoy, A., E. Butterworth, et al. (2012). "ALDH as a marker for enriching tumorigenic human colonic stem cells." Methods Mol Biol **916**: 373-385.
- Silverman, L. R. and G. J. Mufti (2005). "Methylation inhibitor therapy in the treatment of myelodysplastic syndrome." Nat Clin Pract Oncol **2 Suppl 1**: S12-23.

- Singh, S. K., I. D. Clarke, et al. (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res **63**(18): 5821-5828.
- Ucar, D., C. R. Cogle, et al. (2009). "Aldehyde dehydrogenase activity as a functional marker for lung cancer." Chem Biol Interact **178**(1-3): 48-55.
- Uphoff, C. C., S. A. Denkmann, et al. (2012). "Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with Plasmocin." J Biomed Biotechnol **2012**: 267678.
- van den Bergh, R. C., P. C. Albertsen, et al. (2013). "Timing of curative treatment for prostate cancer: a systematic review." Eur Urol **64**(2): 204-215.
- van den Hoogen, C., G. van der Horst, et al. (2010). "High aldehyde dehydrogenase activity identifies tumor-initiating and metastasis-initiating cells in human prostate cancer." Cancer Res **70**(12): 5163-5173.
- Visvader, J. E. (2011). "Cells of origin in cancer." Nature **469**(7330): 314-322.
- Wilding, G., M. Chen, et al. (1989). "Aberrant response in vitro of hormone-responsive prostate cancer cells to antiandrogens." Prostate **14**(2): 103-115.
- Young, L., J. Sung, et al. (2010). "Detection of Mycoplasma in cell cultures." Nat Protoc **5**(5): 929-934.
- Zeppernick, F., R. Ahmadi, et al. (2008). "Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients." Clin Cancer Res **14**(1): 123-129.