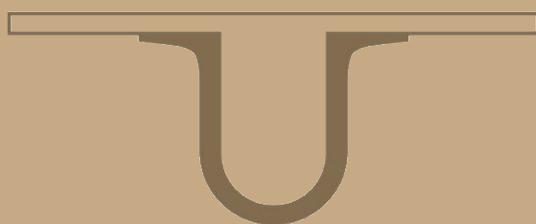




UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Beatriz Prazeres Serambeque

CÉLULAS ESTAMINAIS DO CANCRO DO ENDOMÉTRIO
A CHAVE PARA O TRATAMENTO PERSONALIZADO?

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica orientada pela Doutora Maria João da Silva Fernandes Leal Carvalho e pelo Professor Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2018

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

CÉLULAS ESTAMINAIS DO CANCRO DO ENDOMÉTRIO: a chave para o tratamento personalizado?

Beatriz Prazeres Serambeque

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica orientada pela Doutora Maria João da Silva Fernandes Leal Carvalho e pelo Professor Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2018



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA



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

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

A este projeto de investigação foi atribuído o Prémio de Investigação em Ginecologia 2016, financiado pela Sociedade Portuguesa de Ginecologia/Bayer, uma Bolsa de Investigação em Oncologia, de carácter individual, financiada pelo Núcleo Regional do Centro da Liga Portuguesa Contra o Cancro/CIMAGO e suporte financeiro disponibilizado pelo CIMAGO e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal) PEst-UID/NEU/04539/2013 e FEDER-COMPETE (FCOMP-01-0124-FEDER-028417 e POCI-01-0145-FEDER-007440).



The art and science of asking questions is the source of all knowledge.

Thomas Berger

Agradecimentos

No culminar de mais uma etapa do meu percurso académico, não poderia deixar de agradecer a todos os que, de alguma forma, contribuíram não só para a concretização deste projeto e para a realização deste manuscrito mas também para o alcance de um importante objetivo pessoal. Este trabalho apesar de ser de carácter individual, resulta de um trabalho de investigação no contexto de uma equipa multidisciplinar.

À Doutora Maria João Carvalho, médica especialista em Ginecologia e Obstetrícia no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) e Assistente Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, orientadora desta tese, agradeço todos os ensinamentos, ajuda, compreensão, paciência, incentivo, confiança e amizade constantes. Agradeço também todas as correções realizadas a este manuscrito.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira, Professor Auxiliar com Agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, orientador interno deste trabalho, agradeço toda a disponibilidade, ajuda e atenção ao longo do mestrado.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e diretora do Instituto de Biofísica desta instituição, agradeço a oportunidade de integrar a equipa de investigação por si liderada, a atenção e disponibilidade demonstradas, todos os ensinamentos e correções que me fazem aprender e crescer.

À Doutora Mafalda Laranjo, investigadora da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço toda a disponibilidade e atenção, todos os ensinamentos, a confiança, a ajuda constante, a paciência mas também todos os momentos de amizade, descontração e boa disposição diários. Agradeço o profissionalismo, o rigor e o espírito crítico que sempre me incutiu e que tão bem a caracterizam. Agradeço também todas as correções e sugestões realizadas a este manuscrito e a todo o trabalho de investigação.

À Professora Doutora Ana Margarida Abrantes, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e investigadora do Instituto de Biofísica desta instituição, agradeço o acolhimento na equipa de investigação, toda a disponibilidade, amizade, convívência e boa disposição constantes.

À Doutora Salomé Pires, investigadora da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço toda a amizade, paciência, entreajuda, a convívência e a boa disposição diária.

Ao Mestre Miguel Marto, agradeço todos os conselhos, amizade, ajuda e companheirismo em todos os momentos.

Aos Mestres Rui Caetano de Oliveira e Ana Gomes e à Dra. Carol Marinho, do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, agradeço toda a ajuda e disponibilidade para a realização deste projeto. Agradeço também, a todos os elementos deste serviço que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Artur Paiva, agradeço toda a disponibilidade, ajuda e atenção dispensados na realização e análise dos estudos de citometria de fluxo. Agradeço também, ao Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra pela oportunidade e particularmente, a todos os colaboradores da Unidade de Citometria de Fluxo pela ajuda e atenção prestados.

Aos Serviços Farmacêuticos do Hospital de Dia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, agradeço a cedência dos fármacos para a realização dos estudos de resposta à terapêutica.

Ao Núcleo Regional do Centro da Liga Portuguesa Contra o Cancro e ao CIMAGO (Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia), agradeço a atribuição da Bolsa de Investigação Individual em Oncologia e o financiamento disponibilizado a este projeto de investigação. Agradeço também à Sociedade Portuguesa de Ginecologia e à Bayer pela atribuição do Prémio de Investigação em Ginecologia 2016.

Ao Mestre João Casalta-Lopes, agradeço toda a amizade, disponibilidade, atenção e ajuda na análise estatística dos resultados deste projeto.

Às Doutoras Ana Brito e Ana Catarina Mamede, ao Doutor Fernando Mendes e ao Mestre João Encarnação, agradeço todos os ensinamentos e conselhos e os bons momentos passados na Biofísica.

À Dra. Cláudia Caridade, agradeço toda a disponibilidade, atenção e ajuda nas mais variadas tarefas do dia-a-dia. Obrigada pela paciência!

Aos Mestres e amigos Inês Marques, Rita Neves, Ricardo Teixeira, Gonçalo Brites, Rafael Teixeira, Nuno Almeida, João Ferreira e Cátia Domingues, agradeço toda a amizade e companheirismo ao longo destes anos. Obrigada por tudo! Pela paciência e acima de tudo pelo apoio e suporte constantes.

À Catarina Ferreira, Adriana Jesus, Simone Graça, Patrícia Oliveira e a todos os colegas do Instituto de Biofísica, agradeço a amizade, a partilha de conhecimentos e entreatajuda diários no laboratório.

Aos meus amigos de sempre, agradeço a ajuda e o acompanhamento nesta etapa, pela presença constante nos momentos bons e menos bons. Agradeço a compreensão e o perdão pelas ausências, por todos os momentos que partilhamos ao longo da vida, um obrigada sincero.

Aos amigos que fiz durante a licenciatura e o mestrado, agradeço por me acompanharem, por partilharem comigo momentos inesquecíveis, pela amizade que construímos, por todos os momentos de brincadeira e de diversão, um sincero obrigada a vocês também.

À minha família. Agradeço aos meus pais por serem os melhores do mundo. Agradeço todos os princípios, valores, educação, ensinamentos, incentivo e o amor que sempre me transmitiram. Obrigada pela confiança depositada, pelo orgulho que sentem e pelo acompanhamento constantes em todas as etapas da minha vida pessoal, do meu percurso académico e profissional e na conquista dos meus objetivos. Sem vós nada disto seria possível. Ao meu irmão, por ser sempre o meu companheiro e o meu amigo, pela presença constante,

obrigada por me aturares e pela partilha de todos os momentos. Aos meus avós, aos meus queridos avós, agradeço o amor e o carinho, o acompanhamento ao longo de toda a minha vida, a experiência de vida e todo o orgulho que sentem. Ao meu tio, agradeço ser o meu “irmão mais velho”, apesar da distância sei que estarás sempre disponível para mim. À minha “ama” pelo acompanhamento ao longo da minha vida, pelo carinho, orgulho e amizade, obrigada.

Ao Pedro, por todo o carinho, amor, compreensão, paciência, ajuda, por toda a partilha e por todas as vivências, um obrigada do fundo do coração.

Índice

Agradecimentos.....	vii
Índice.....	xi
Resumo.....	xv
<i>Abstract</i>	xvii
Introdução.....	19
Células estaminais do cancro.....	21
Cancro do endométrio.....	27
Classificação histológica.....	30
Marcadores moleculares.....	31
Opções terapêuticas.....	37
Terapêuticas dirigidas.....	38
Células estaminais do cancro do endométrio.....	42
Resistência à terapêutica.....	46
Objetivos.....	51
Material e métodos.....	55
Parte I — Estudo Fundamental.....	57
Células tumorais do endométrio: caracterização e avaliação da inibição da aldeído desidrogenase.....	57
Culturas celulares.....	57
Inibição da aldeído desidrogenase.....	58
Citotoxicidade dos inibidores da ALDH.....	58
<i>Western blot</i>	59
Protocolo de formação de esferas e derivadas aderentes diferenciadas.....	61
Capacidade de formação de esferas.....	62
Capacidade de autorrenovação.....	63
Área de projeção ocupada pelas esferas.....	63
Tempo de duplicação.....	64
Ensaio clonogénico.....	64

Citometria de fluxo.....	65
Expressão da ALDH e da P53	66
Análise estatística.....	66
Resposta à terapêutica	68
Quimioterapia.....	68
Atividade metabólica.....	68
Morte celular e resistência à terapêutica.....	69
Morte celular.....	69
<i>Western blot</i>	70
Danos no DNA	70
Análise estatística.....	72
Parte II – Estudo translacional.....	73
Caracterização das CSC do endométrio.....	73
Isolamento de CSC.....	73
Inibição da ALDH.....	74
Resposta personalizada à quimioterapia.....	74
Resultados e discussão.....	77
Parte I – Estudo fundamental	79
Caracterização das células tumorais do endométrio	79
CSC do endométrio: avaliação da inibição da aldeído desidrogenase.....	81
Inibição da aldeído desidrogenase.....	81
Avaliação da citotoxicidade.....	81
Avaliação da expressão da ALDH.....	83
Capacidade de Formação de Esferas.....	85
Capacidade de Autorrenovação.....	86
Área de projeção ocupada pelas esferas	86
Eficiência Clonogénica.....	87

Marcadores de células estaminais.....	88
CD133, CD44/CD24.....	88
ALDH.....	91
Expressão de P53	91
Discussão	92
Resposta à terapêutica.....	102
Atividade metabólica.....	102
Morte celular e resistência à terapêutica	110
Morte celular.....	110
Expressão de ALDH e de P53.....	111
Genotoxicidade.....	113
Discussão	114
Parte II – Estudo translacional.....	127
Descrição das características clínicas e patológicas das doentes.....	127
Caracterização das CSC do endométrio.....	128
Inibição da ALDH.....	128
Resposta personalizada à quimioterapia.....	130
Discussão	133
Conclusões e perspectivas futuras.....	137
Referências bibliográficas	141
Anexos	155
Índice de figuras	157
Índice de tabelas.....	164
Lista de abreviaturas e símbolos.....	165

Resumo

O cancro do endométrio é a neoplasia maligna do trato genital feminino mais frequente nos países ocidentais, que afeta mulheres habitualmente na pós-menopausa e tem o seu pico de incidência no início da sexta década de vida. Na generalidade, apresenta um prognóstico favorável, dado que a maioria das doentes tem o diagnóstico num estágio inicial, com doença confinada ao útero. No entanto, até 20% dos carcinomas endometriais apresentam-se como neoplasias agressivas, como lesões de alto grau ou com invasão miometrial, com risco de recorrência. As células estaminais do cancro (CSC, do inglês *cancer stem cells*) caracterizam-se como uma subpopulação de células cancerígenas indiferenciadas que apresentam capacidade de autorrenovação, de diferenciação, de resistência às terapêuticas convencionais e potencial metastático.

O objetivo principal deste trabalho foi o isolamento e caracterização de uma população de CSC do endométrio e a avaliação da inibição da via da aldeído desidrogenase (ALDH, do inglês *aldehyde dehydrogenase*), descrita como marcador desta população. Pretendeu-se estudar a resposta à terapêutica das CSC aos citostáticos utilizados na prática clínica e contribuir para esclarecer os mecanismos de resistência. Numa perspetiva translacional, com recurso a amostras de doentes com cancro do endométrio, pretendeu-se isolar e avaliar as CSC de modo a contribuir para o desenvolvimento de terapêuticas individualizadas.

A caracterização das CSC de linhas celulares de cancro do endométrio, compreendeu o isolamento de populações com capacidade para formar esferas, a avaliação de propriedades como a autorrenovação e a expressão de marcadores típicos de CSC (por citometria de fluxo e por *Western blot*). Avaliou-se também a influência dos inibidores da ALDH neste fenótipo. Avaliou-se a resposta aos fármacos carboplatina, paclitaxel e doxorrubicina, em termos de atividade metabólica, expressão de proteínas envolvidas na resistência à terapêutica e morte celular, assim como danos no DNA (do inglês, *deoxyribonucleic acid*).

O protocolo de formação de esferas também foi aplicado a amostras tumorais das doentes de modo a isolar e caracterizar as CSC. Paralelamente, foram preparadas secções tumorais e expostas aos mesmos fármacos de modo a avaliar a resposta à terapêutica por imunohistoquímica.

A ação do inibidor da ALDH, dietilaminobenzaldeído (DEAB, do inglês *diethylaminobenzaldehyde*), nas populações de CSC do endométrio, de facto, diminuiu a autorrenovação e as dimensões das esferas. As esferas de RL95-2 submetidas ao DEAB apresentaram aumento na expressão de CD133. No entanto outros fenótipos associados a CSC, como CD44⁺/CD24⁻, a expressão da ALDH e P53, não foram influenciados pelo inibidor.

As populações de CSC do endométrio apresentaram maior resistência à terapêutica com carboplatina, com paclitaxel e com doxorrubicina do que as populações aderentes. A linha parental e as derivadas aderentes, apresentaram um aumento dos níveis de caspase 3 após o tratamento com carboplatina,

acompanhado de diminuição da expressão da P53 nas células RL95-2 e da ALDH nas derivadas aderentes. O tratamento com carboplatina e doxorrubicina foi significativamente mais genotóxico nas populações aderentes em relação às populações de CSC.

Nas amostras de tumores endometriais humanos, foi possível otimizar o protocolo de isolamento de esferas e realizar culturas de fatias de tumor. A expressão de marcadores de CSC foi mais evidente em tumores com pior prognóstico. Na perspectiva de definir uma resposta personalizada ao tratamento verificou-se de facto uma sensibilidade variável entre os diferentes tumores. No futuro, a predição de resposta à terapêutica, prévia à definição do tratamento adjuvante, pode tornar-se uma realidade pela identificação dos citostáticos com o melhor desempenho nas CSC, população minoritária responsável pela quimiorresistência e recorrência.

Palavras chave: cancro do endométrio, células estaminais do cancro, aldeído desidrogenase, DEAB, resistência à terapêutica.

Abstract

Endometrial cancer is the most frequent malignant neoplasm of the female genital tract in Western countries, which affects postmenopausal women and has its peak incidence at the beginning of the sixth decade of life. In general, it presents a favorable prognosis, since the majority of the patients have the diagnosis at an early stage, with disease confined to the uterus. However, up to 20% of endometrial carcinomas present as aggressive neoplasms, such as high-grade lesions or myometrial invasion, with a risk of recurrence. Cancer stem cells (CSC) are characterized as a subpopulation of undifferentiated cancer cells that exhibit self-renewal, differentiation, resistance to conventional therapies and metastatic potential.

The aim of this work was the isolation and characterization of an endometrial CSC population and the evaluation of the ALDH pathway inhibition, described as a CSC marker. We intended to study the therapeutic response of CSC to cytostatics used in clinical practice and contribute for clarification of resistance mechanisms. In a translational perspective, using samples from patients with endometrial cancer, it was intended to isolate and evaluate CSC in order to contribute to the development of individualized therapies.

The characterization of CSC from endometrial cancer cell lines comprised isolation of sphere-forming populations, evaluation of self-renewal and expression of typical CSC markers (by flow cytometry and Western blot). The influence of ALDH inhibitors on this phenotype was also evaluated. The response to carboplatin, paclitaxel and doxorubicin was evaluated in terms of metabolic activity, expression of proteins involved in resistance to therapy and cell death, as well as DNA damage.

The sphere formation protocol was also applied to human tumor samples in order to isolate and characterize CSC population. In parallel, tumor sections were prepared and exposed to the same drugs in order to evaluate the therapy response by immunohistochemistry.

The action of the ALDH inhibitor, DEAB, on endometrial CSC populations, in fact, decreased self-renewal and sphere dimensions. RL95-2 spheres submitted to DEAB showed increased expression of CD133. However, other phenotypes associated with CSC, such as CD44⁺/CD24⁻, expression of ALDH and P53, were not influenced by the inhibitor.

Endometrial CSC populations were more resistant to carboplatin, paclitaxel, and doxorubicin than adherent populations. The parental cell line and the adherent derivatives showed an increase in caspase 3 levels after treatment with carboplatin, accompanied by a decrease in the expression of P53 and ALDH, in adherent populations respectively. Treatment with carboplatin and doxorubicin was significantly more genotoxic in adherent cells than CSC.

In human endometrial tumor samples, it was possible to optimize the protocol of spheres isolation and to perform cultures of tumor slices. Expression of CSC markers was most evident in tumors with poor

prognosis. From the perspective of defining a personalized response to treatment, there was a variable sensitivity between different tumors. In the future, the prediction of response to therapy, prior to the definition of adjuvant treatment, may become a reality by identifying cytostatics with the best performance in CSC, the minority population responsible for chemoresistance and recurrence.

Key words: endometrial cancer, cancer stem cells, dehydrogenase aldehyde, DEAB, therapy resistance

INTRODUÇÃO

Células estaminais do cancro

A origem do cancro ainda não está claramente esclarecida e, por isso, muitas hipóteses têm sido propostas até ao momento. As hipóteses sugerem que o cancro é causado por vírus, anomalias cromossómicas, mutações somáticas, alterações imunológicas, feridas não cicatrizadas, mecanismos não-mutagénicos e teorias relacionadas com a organização de tecidos (Allegra *et al.*, 2014).

As hipóteses mais comuns sustentam que o cancro é causado por uma acumulação de alterações genéticas, epigenéticas e transcricionais que conferem características próprias às células cancerígenas — que incluem proliferação, invasão, metastização, replicação ilimitada e angiogénese, bem como a capacidade de evitar a supressão do crescimento e a apoptose, características descritas como os *hallmarks* do cancro (Nassar e Blanpain, 2016).

Apesar de surgirem numa fase inicial de uma célula mutada, a maioria dos tumores malignos tornam-se muito heterogêneos, expressam diferentes marcadores e contêm células com elevado potencial de proliferação e de diferenciação. Dentro desta heterogeneidade de células malignas, existe um grupo minoritário de células, com características de crescimento dominante, que apresenta habilidade para regeneração e repovoamento tumoral, denominadas CSC (Allegra *et al.*, 2014; Nassar e Blanpain, 2016).

As CSC caracterizam-se como uma subpopulação de células cancerígenas indiferenciadas que apresentam capacidade de autorrenovação, elevado potencial proliferativo, de diferenciação, de resistência às terapêuticas convencionais e, são ainda dotadas de um fenótipo mais invasivo e metastático (Kato, 2012; Elbasateeny *et al.*, 2016; Kyo e Kato, 2015).

O conceito das CSC, baseou-se na observação de que, quando células cancerígenas de vários tipos foram testadas relativamente ao seu potencial proliferativo em vários ensaios *in vitro* e *in vivo*, apenas uma minoria de células apresentava uma proliferação extensiva. Desta forma, foi proposto que estas CSC sejam as "células originais" de um tumor, responsáveis pela tumorigénese, diferenciação tumoral, manutenção, disseminação e recidiva do tumor. As CSC, apesar de um grupo de células cancerígenas minoritária, mantêm-se em número suficiente e indiferenciadas para garantir a regeneração de novas CSC. As CSC podem diferenciar-se nas denominadas células amplificadoras transitórias (ATC, do inglês *amplifying trafficking cells*) com elevada capacidade proliferativa, mas limitada. Como resultado desta bi-potencialidade, as CSC apresentam maior capacidade de sobrevivência para formação de novos tumores, do que as ATC (Hubbard e Gargett, 2010; Allegra *et al.*, 2014).

Foram propostas duas teorias distintas de carcinogénese, o modelo hierárquico e o modelo estocástico, representados na Figura 1. De acordo com o modelo hierárquico de crescimento tumoral, todas as células cancerígenas de um tumor são heterogêneas e apenas um subconjunto de células atua como CSC,

apresentando extensas propriedades de autorrenovação, enquanto que as ATC apresentam capacidade proliferativa limitada e, eventualmente, diferenciam-se em células cancerígenas diferenciadas não proliferativas. O modelo estocástico de crescimento tumoral postula que todas as células cancerígenas são equipotentes e apresentam capacidade de autorrenovação ou de dar origem a células não proliferativas de forma estocástica (Allegra *et al.*, 2014; Nassar e Blanpain, 2016).

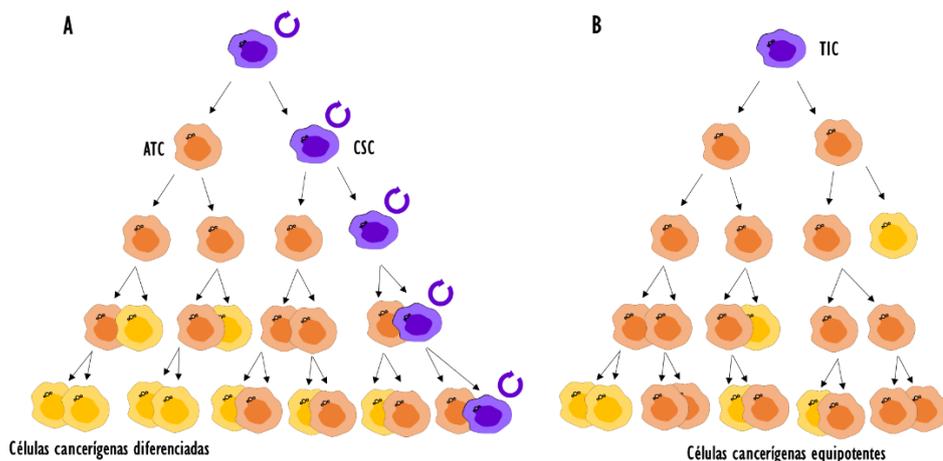


Figura 1 - Principais modelos de carcinogênese: o modelo hierárquico (A) e o modelo estocástico (B). O modelo hierárquico, contrariamente ao modelo estocástico, afirma que nem todas as células do tumor, mas apenas uma pequena subpopulação, apresenta capacidade de originar tumores. Abreviaturas: TIC, célula iniciadora tumoral (do inglês, *tumor initiating cell*) (Adaptado de Nassar e Blanpain, 2016).

Uma outra teoria propõe que a origem poderia ser uma célula progenitora comprometida que regride para um fenótipo tipo estaminal durante a transformação. Por outro lado, as CSC podem resultar da transformação oncogénica de células estaminais de tecido normal. Neste caso, pensa-se que as mutações nos mecanismos reguladores que controlam a autorrenovação das células estaminais, promovem o desenvolvimento de CSC e que, posteriormente, produzem células cancerígenas hierárquicas e heterogêneas. Isto sugere que a célula cancerígena original tem a capacidade de produzir múltiplos tipos de células, ou seja, têm plasticidade, uma capacidade distintiva das células estaminais. Existem vários estudos publicados que mostram que as CSC podem ser produzidas por transformação oncogénica da descendência de células estaminais. Alguns dados sugerem que as vias de sinalização que regularam as células estaminais podem ser semelhantes às das células cancerígenas. Sabe-se que as vias de autorrenovação de células estaminais normais, como a sinalização NOTCH, WNT e HEDGEHOG, representadas na Figura 2, também estão presentes em CSC e têm um papel fundamental na sua função (Allegra *et al.*, 2014).

A sinalização NOTCH, similar às vias WNT e HEDGEHOG, é uma via primordial que apresenta grande relevância para múltiplos aspetos da biologia do cancro, desde as CSC até à angiogénese e imunidade

tumoral. A sinalização NOTCH está envolvida principalmente na comunicação entre células próximas. A interação entre um ligando transmembranar numa célula e de um recetor transmembranar numa célula vizinha desencadeia uma clivagem proteolítica de duas fases do recetor; a primeira clivagem é mediada enzimaticamente pela desintegrina e metaloproteínase (ADAM) - ADAM 10 ou ADAM 17, também conhecida como enzima conversora do fator de necrose tumoral α (TACE) - e a segunda pela γ -secretase, que liberta um fragmento intracelular (NICD) para o citoplasma (Takebe *et al.*, 2015; William H. Matsui, 2016). O NICD sofre translocação para o núcleo onde interage com uma proteína de ligação ao DNA, a CSL, e regula a expressão de genes alvo, como os relacionados com a autorrenovação de CSC, tais como a Survivina, o *MYC*, o *NANOG*, o *OCT-4* e o *SOX2* (Koury, Zhong e Hao, 2017).

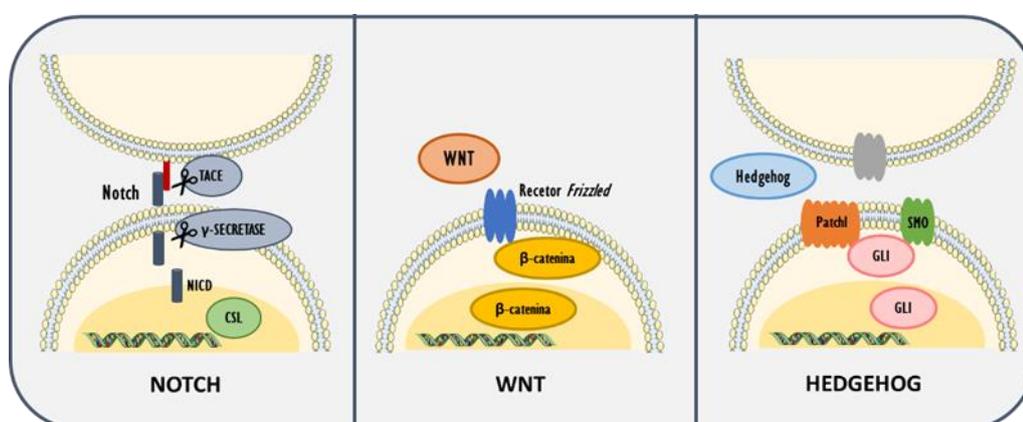


Figura 2 - Vias de sinalização de células estaminais NOTCH, WNT e HEDGEHOG. Abreviaturas: NICD, NOTCH intracelular domain; TACE, TNF- α converting enzyme; SMO, recetor smoothened (Adaptado de Takebe *et al.*, 2011; Vaz *et al.*, 2014; Carvalho, 2015) e de Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

A via WNT é uma via de sinalização complexa e evolutivamente conservada, que abrange 19 ligandos WNT e mais de 15 recetores. A via canónica é ativada quando ligandos WNT segregados por uma célula se ligam a recetores *Frizzled* e/ou às proteínas relacionadas com o recetor de lipoproteínas de baixa densidade (LRP, do inglês *low density lipoprotein receptor-related protein*) 5 e 6 numa célula vizinha, a β -catenina livre sofre translocação para o núcleo, liga-se aos fatores de transcrição e ativa a transcrição de vários genes alvo (William H. Matsui, 2016). Conjuntamente com as vias NOTCH e HEDGEHOG, a supressão da sinalização WNT levou ao desenvolvimento de agentes que podem interferir na carcinogénese, na invasividade tumoral e na metastização (Takebe *et al.*, 2015).

A via de sinalização HEDGEHOG está implicada durante o desenvolvimento embrionário e na reparação de tecidos normais, incluindo o sistema nervoso, o esqueleto, os membros, os pulmões, o coração e o intestino, e controla a proliferação celular, a diferenciação e a migração (Takebe *et al.*, 2015; William H.

Matsui, 2016). Os principais intervenientes nesta via incluem três ligandos HEDGEHOG - *Sonic*, *Indian* e *Desert* - o recetor *Patched* (PATCH1), a proteína transmembranar *Smoothed* (SMO) e 3 fatores de transcrição GLI, que modulam a ativação ou a repressão da via. O recetor PATCH1 funciona como um inibidor constitutivo de SMO quando é desocupado pelo ligando. Neste estado, a transcrição do gene alvo é reprimida por GLI3 e GLI2-R (forma repressora de GLI2). Após a ligação do ligando ao recetor, a influência inibitória do PATCH1 na SMO é removida, e a ativação da SMO resulta na translocação nuclear do *GLI* e indução da transcrição do gene alvo (Koury, Zhong e Hao, 2017; William H. Matsui, 2016). A maioria dos genes alvo está envolvida na proliferação, na sobrevivência e na angiogénese (Takebe *et al.*, 2015).

Além destas vias moleculares, ainda existem outras como a via JAK/STAT (do inglês, *janus tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription*), a MAPK/ERK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*), a PI3K/AKT (do inglês, *phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B*), a NF- κ B (do inglês, *nuclear factor kappa B*) e a TGF β (do inglês, *transforming growth factor- β*), implicadas no desenvolvimento embrionário, no cancro e nas CSC. A desregulação destas vias resulta na expansão de células estaminais, que pode ser um evento chave para iniciar a carcinogénese e o desenvolvimento de CSC (Allegra *et al.*, 2014).

A teoria das CSC, embora controversa, tem implicações importantes para a compreensão da biologia e do desenvolvimento de tumores malignos e constitui um alvo alternativo para terapêuticas antineoplásicas. Contudo, a identificação e a caracterização destas células continua a ser um desafio, devido à sua escassez nas massas tumorais (Hubbard e Gargett, 2010; Allegra *et al.*, 2014).

As metodologias frequentemente utilizadas para a deteção e o isolamento de CSC incluem classificação funcional (baseada em métodos imagiológicos), molecular, citológica e xenotransplantação, apresentadas na Tabela I (Islam *et al.*, 2015).

Vários métodos são usados para a identificação de CSC, como os ensaios clonogénicos ou os protocolos de formação de esferas que avaliam a capacidade com que uma única célula, prospectivamente, forma clones *in vitro* e tumores *in vivo* em animais imunocomprometidos. Além destes métodos, o ensaio de retenção da bromodesoxiuridina (BrdU, do inglês *bromodeoxyuridine*) foi utilizado para a identificação e para o isolamento de CSC (Kato, 2012).

Tabela I — Abordagens usadas na deteção e isolamento das CSC (Islam *et al.*, 2015). Legenda: MACS - *magnetic activated cell sorting*, RT-PCR - *real time - polymerase chain reaction*, RT-qPCR - *real time - quantitative polymerase chain reaction*.

Abordagem	Método
Seleção Citológica	Citometria de Fluxo, MACS
Seleção Funcional	Ensaio de Formação de Colónias, Protocolo de Formação de Esferas, ALDEFLUOR, Ensaio da População Lateral, Ensaio de Resistência à Terapêutica, Xenotransplantação
Seleção Molecular	RT-PCR, RT-qPCR
Seleção baseada em Imagem	Microscopia, Imunocitoquímica, Imunohistoquímica

As células de uma população lateral (SP, do inglês *side population*), identificadas com base na capacidade desta população celular remover o Hoechst 33342, um corante fluorescente, são populações constituídas por células estaminais. O fenótipo apresentado pela SP está associado a um alto nível de expressão do membro 2 da subfamília G da proteína transportadora de cassete de ligação a ATP (ABCG2, do inglês *ATP-binding cassette sub-family G member 2*), e por esta razão, apresenta resistência a citostáticos (Kato, 2012; Kyo e Kato, 2015).

Os métodos de triagem celular, como a citometria de fluxo e a separação celular ativada por magnetismo (MACS, do inglês *magnetic activated cell sorting*) separam CSC de células não estaminais do cancro, com base em diferentes moléculas de superfície celular e intracelular com alto desempenho e acuidade. Da mesma forma, a reação de polimerização em cadeia em tempo real (RT-PCR, do inglês *real time - polymerase chain reaction*) e a PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR, do inglês *real time - quantitative polymerase chain reaction*) são métodos moleculares, com grande especificidade, usados na deteção de CSC em doentes oncológicos. Além disso, técnicas como a imunocitoquímica, a imunofluorescência e a imunohistoquímica, são usadas para identificar as CSC com base no nível e no local de expressão de proteínas. O teste padrão para a deteção e o isolamento de CSC é a avaliação da sua capacidade tumorigénica *in vivo*, através de xenotransplantes em animais imunocomprometidos (Islam *et al.*, 2015).

As CSC foram identificadas em diferentes tipos de cancro através da utilização de combinações de antigénios de superfície celular, bem como de proteínas solúveis, denominados marcadores de CSC. Os marcadores de superfície de CSC variam de acordo com o tipo de tumor, pelo que um dos objetivos da investigação sobre as CSC é determinar a expressão de biomarcadores de superfície específicos para cada tipo de cancro (Allegra *et al.*, 2014; Islam *et al.*, 2015).

Embora existam alguns marcadores considerados específicos de CSC, estes podem não apresentar sensibilidade suficiente para serem identificados num grande número de células tumorais. Desta forma, alguns marcadores de superfície celular são frequentemente usados para identificar CSC, como o marcador

de diferenciação (CD, do inglês *cluster of differentiation*) 133, o CD44 e a ALDH como se mostra na Tabela 2 (Kato, 2012; Allegra *et al.*, 2014).

Tabela 2 — Marcadores de CSC comumente usados em diversos tipos de tumores (Islam *et al.*, 2015).

Marcador	Tipo de Tumor
ALDH	Mama, Cólon, Cabeça e Pescoço, Fígado, Pâncreas e Melanoma
CD44	Mama, Cólon, Estômago, Cabeça e Pescoço, Fígado, Ovário, Pâncreas e Próstata
CD90	Cérebro, Fígado, Mama e Pulmão
CD24	Mama, Estômago e Pâncreas
ABC5	Cólon e Melanoma
β -catenina	Cólon, Fígado, Ovário, Mama, Pulmão e Glioblastoma
CD133	Cérebro, Cólon, Endométrio, Fígado, Pulmão, Ovário, Pâncreas, Próstata e Mama
ABCG2	Pulmão, Mama e Cérebro
Kit/CD117	Ovário
SP	Glioma, Trato Gastrointestinal, Fígado, Pulmão e Tiróide

O CD133, também conhecido como PROM1 ou prominina, é um antigénio de superfície que foi identificado como um potencial marcador de CSC presente em diversos tumores malignos como os cerebrais, do cólon, do fígado e o da próstata. Embora a função do CD133 não seja claramente conhecida, foi proposto um papel na organização da membrana plasmática (Cervelló *et al.*, 2011; Allegra *et al.*, 2014).

O CD44, também conhecido como molécula de adesão celular, é uma glicoproteína de superfície celular expressa em linfócitos, monócitos e granulócitos, que foi identificada como um marcador de CSC da mama, da próstata, do pâncreas e da cabeça e pescoço (Allegra *et al.*, 2014; Elbasateeny *et al.*, 2016).

Além dos marcadores de superfície celular, proteínas intracelulares também foram usadas para isolar e detetar CSC, como a ALDH, uma enzima desintoxicante que oxida os aldeídos intracelulares e que desempenha um papel na diferenciação de células estaminais através do metabolismo do ácido retinóico. A atividade da ALDH pode ser usada para classificar uma subpopulação de células que exibem propriedades das células estaminais em diversos tipos de cancro, como a leucemia, o cancro da mama, do cólon, do fígado, do pulmão e do pâncreas, e em células normais (Islam *et al.*, 2015; La Porta, 2012).

Um tipo diferente de marcador de CSC é o transportador ABCG2, associado à resistência a múltiplos fármacos. É responsável pelo fenótipo da SP em vários tipos de cancro humano e nos correspondentes tecidos normais. Também é usado para identificar e isolar células somáticas estaminais/progenitoras (Kyo e Kato, 2015; Allegra *et al.*, 2014).

Cancro do endométrio

O endométrio é o revestimento mucoso interno do útero, que sofre renovação cíclica, diferenciação e desagregação ao longo da vida reprodutiva da mulher. Morfologicamente, esta mucosa, representada na Figura 3, é constituída por uma camada funcional superficial, que a cada ciclo é descartada quase na totalidade, e por uma camada basal que permanece intacta e apresenta capacidade de regeneração (Alcaraz *et al.*, 2009; Cervelló *et al.*, 2013; Darzi *et al.*, 2016; Pluchino e Taylor, 2016).

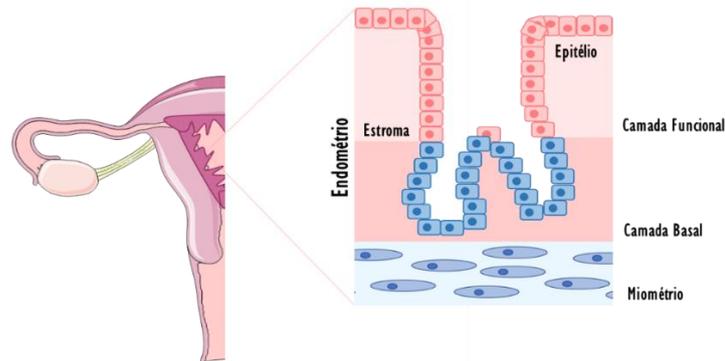


Figura 3 - Constituição do endométrio humano (Adaptado de Darzi *et al.*, 2016; Gargett, Schwab e Deane, 2016 e de Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

O endométrio, caracterizado como um tecido com uma extraordinária capacidade de remodelação, sofre estímulos hormonais apropriados durante cada ciclo menstrual, que ocorre aproximadamente 400 vezes desde a puberdade até à menopausa (Cervelló *et al.*, 2011; Cervelló *et al.*, 2013). Todos os meses, durante os primeiros 4 a 10 dias do ciclo menstrual, ocorre o crescimento do endométrio proliferativo a partir da camada basal, com 0,5-1 mm de espessura, para gerar uma nova camada funcional onde um embrião se irá implantar. À medida que os níveis circulantes de estrogénio aumentam durante a fase proliferativa do ciclo menstrual, as células epiteliais, estromais e vasculares proliferam rapidamente para gerar glândulas e estroma de suporte da camada funcional em crescimento. Após a ovulação, na fase secretora do ciclo, sob a influência da progesterona, há um bloqueio da divisão celular e promoção da diferenciação terminal do epitélio glandular. A diferenciação estromal em células decíduais ocorre em torno de vasos sanguíneos e sob o epitélio luminal onde um embrião se implanta. Na ausência de implantação embrionária, a camada funcional regride e desaparece com a menstruação e inicia-se um novo ciclo menstrual (Darzi *et al.*, 2016).

O cancro do endométrio é a neoplasia maligna do trato genital feminino mais comum no mundo ocidental, que afeta mulheres habitualmente na pós-menopausa e tem o seu pico de incidência no início da sexta década de vida (Alonso-Alconada *et al.*, 2014; Arora e Quinn, 2012). Embora o cancro do

endométrio, seja convencionalmente considerado uma doença maligna que ocorre em mulheres em pós-menopausa, 14% dos casos são diagnosticados em mulheres pré-menopáusicas, 5% dos quais em idades inferiores a 40 anos (Morice *et al.*, 2016).

A incidência do cancro do endométrio tem um aumento estimado de cerca de 1 a 2% por ano e de 50 a 100% até 2025. Este aumento da incidência, observado na Europa e na América do Norte, pode estar relacionado a uma maior prevalência de obesidade e de síndromas metabólicas, além do envelhecimento da população (Ali, 2014; Morice *et al.*, 2016; Tran e Gehrig, 2017; Di Cello *et al.*, 2017; Adishesh *et al.*, 2017).

O cancro do endométrio apresenta prognóstico geral favorável, dado que a maioria das doentes tem o diagnóstico numa fase inicial, com doença confinada ao útero (Arora e Quinn, 2012; Alonso-Alconada *et al.*, 2014; Ali, 2014; Tran e Gehrig, 2017). A sobrevivência aos 5 anos para doença inicial é de cerca de 96% (Arora e Quinn, 2012). No entanto, até 20% dos carcinomas endometriais apresentam-se como neoplasias agressivas, como lesões de alto grau ou com invasão profunda, com risco substancial de recorrência e de morte (Alonso-Alconada *et al.*, 2014).

Em relação aos fatores de risco para o desenvolvimento de um carcinoma endometrial, as mulheres caucasianas apresentam uma probabilidade mais elevada de desenvolver uma doença maligna ginecológica em comparação com as mulheres de raça negra. Em contraste, as mulheres de raça negra geralmente apresentam tumores não endometrioides, de alto grau e com estágio mais avançado na altura do diagnóstico, comparativamente com as mulheres caucasianas (Burke *et al.*, 2014).

Os estrogénios estimulam a taxa de atividade mitótica do endométrio e são responsáveis por alterações proliferativas que regeneram o endométrio após a menstruação, enquanto que a progesterona é responsável pelo efeito oposto, através da diminuição da concentração dos recetores de estrogénio (ER, do inglês *estrogen receptor*), resultando em alterações secretórias necessárias para a implantação. Assim, qualquer alteração biológica ou substância química que aumente a concentração de estrogénios sem oposição progestativa, constitui um aumento no risco de desenvolvimento de cancro do endométrio. Apesar do mecanismo de desenvolvimento do cancro do endométrio não estar completamente elucidado, acredita-se que, elevados níveis de estrogénio associados a défices de progesterona são fatores de risco para esta neoplasia (Ali, 2014).

Uma exposição prolongada aos estrogénios, especialmente sem oposição da progesterona, aumenta a divisão celular descontrolada do endométrio, causando um aumento da sua espessura. Um processo descontrolado de diferenciação de células aumenta a hipótese de mutação aleatória, erros de replicação no DNA e o possível desenvolvimento de células cancerígenas. Assim, a proliferação excessiva ou derramamento

inadequado no endométrio pode levar ao desenvolvimento de hiperplasia endometrial e, em alguns casos, progressão para cancro do endométrio. A menarca precoce, a nuliparidade, a infertilidade e antecedentes de ovário poliquístico são outros fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento de carcinoma do endométrio. A incidência destes fatores de risco é maior em mulheres com menos de 40 anos. Estas condições estão associadas à estimulação do endométrio com estrogénios sem oposição da progesterona (Ali, 2014; Arora e Quinn, 2012).

O risco de desenvolvimento do cancro do endométrio aumenta cerca de 10 vezes em mulheres com mais 23 Kg do que o seu peso corporal adequado, facto que constitui a obesidade como outro fator de risco no cancro do endométrio. A diabetes, o hiperinsulinismo e a hipertensão também são fatores conhecidos (Liu, 2007; Ali, 2014; Arora e Quinn, 2012).

A predisposição genética é outra das causas mais comuns no desenvolvimento do cancro do endométrio numa idade jovem. O cancro colorretal não poliposo hereditário (HNPCC, do inglês *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) é uma doença autossómica dominante causada por mutações numa família de genes de reparação de incompatibilidade. Mulheres com HNPCC têm um risco aumentado de 40 a 60% para o desenvolvimento de cancro do endométrio. Porém, o risco de mutação de HNPCC em mulheres diagnosticadas com cancro do endométrio com menos de 50 anos é mais difícil de definir (Arora e Quinn, 2012; Ali, 2014).

O tamoxifeno, um modelador seletivo dos recetores de estrogénios, que atua como agonista em tecido endometrial, está também associado ao aumento da incidência do cancro do endométrio (Burke *et al.*, 2014).

Outros fatores reprodutivos como o uso de contraceptivos orais, a multiparidade e uma gravidez em idade avançada têm sido apontadas como fatores com efeito protetor. Outros fatores como o abortamento, o uso de fármacos indutores de ovulação e de fertilização *in vitro* têm sido alvo de controvérsia (Colombo *et al.*, 2011; Ali, 2014).

Hemorragias uterinas anormais, nomeadamente metrorragias pós-menopausa, são os sintomas mais frequentemente apresentados por mulheres com hiperplasia ou carcinoma do endométrio. As doentes com doença avançada podem apresentar sintomas similares aos de cancro do ovário avançado, tal como dor pélvica ou abdominal, distensão abdominal, ou alteração nas funções intestinal e vesical (Sorosky, 2012; Burke *et al.*, 2014; Morice *et al.*, 2016).

Relativamente ao estadiamento do cancro do endométrio, este é realizado de acordo com o sistema de estadiamento da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO). Este sistema, baseia-se no estadiamento cirúrgico e inclui a avaliação da extensão da invasão miometrial e doença metastática local e

à distância. Em maio de 2009, foi publicado um novo sistema de estadiamento da FIGO, apresentado na Tabela 3 (Colombo *et al.*, 2011; Morice *et al.*, 2016).

No panorama clínico, um dos principais desafios é a identificação correta de doentes de baixo risco e de alto risco num contexto pré-operatório, de modo a que sejam fornecidas informações que sirvam de base a um melhor tratamento individualizado (Salvesen, Haldorsen e Trovik, 2012).

Tabela 3 — Sistema de estadiamento da FIGO para o cancro do endométrio (Colombo *et al.*, 2011).

Estádio	Definição
I	Tumor confinado ao corpo uterino
A	Sem invasão do miométrio ou invasão até metade do miométrio
B	Invasão igual ou superior a metade do miométrio
II	Invasão do estroma cervical, sem invasão externa ao útero
III	Invasão local ou regional
A	Invasão da serosa do corpo uterino e/ou anexos
B	Envolvimento vaginal e/ou paramétrico
C	Metastização nos gânglios linfáticos para-aórticos e/ou pélvicos
1	Gânglios linfáticos pélvicos positivos
2	Gânglios linfáticos para-aórticos positivos com ou sem gânglios linfáticos pélvicos positivos
IV	Invasão da mucosa vesical e/ou intestinal e/ou metastização à distância
A	Invasão da mucosa vesical e/ou intestinal
B	Metástases à distância, incluindo intra-abdominais e/ou dos gânglios linfáticos inguinais

Múltiplos fatores foram identificados para o risco elevado de recorrência em doença em estágio inicial: o subtipo histológico, a histologia de grau 3, a invasão miometrial $\geq 50\%$, a invasão de espaço linfovascular, as metástases nos gânglios linfáticos e o diâmetro do tumor >2 cm (Colombo *et al.*, 2011).

A sobrevivência global aos 5 anos para os estádios I e II do sistema da FIGO, varia entre 74 e 91%, entre 57 e 66% para o estágio III e entre 20 a 26% para o estágio IV (Takenaka *et al.*, 2016).

Classificação histológica

Na tumorigénese endometrial é frequentemente reconhecido um modelo dualístico, e geralmente denominado de tipo 1 e tipo 2, baseados no sistema de classificação de Bokhman de 1983 (Bansal, Yendluri e Wenham, 2009).

Os dois tipos de carcinomas endometriais apresentam características biológicas, clínicas e patológicas distintas. O cancro do endométrio do tipo 1 é o tipo mais prevalente, representa a maioria dos casos esporádicos, desenvolve-se através de proliferações glandulares anormais sob o efeito de elevados níveis de

estrogénio sem oposição, e geralmente é detetado num estágio precoce. A forma histológica de carcinomas endometriais do tipo 1 é frequentemente endometriode e de baixo grau (grau 1 ou 2), e expressa recetores de estrogénios e de progesterona (Bansal, Yendluri e Wenham, 2009; Ali, 2014).

Por outro lado, o cancro do endométrio do tipo 2 é menos frequente (cerca de 20% dos cancros do endométrio), menos dependente de hormonas, ocorre num ambiente atrófico, é mais frequente em mulheres com idade mais avançada e geralmente, é detetado numa fase mais avançada da doença. Clinicamente, os tumores do tipo 2 são marcados por um percurso clínico mais agressivo, e têm uma propensão para a disseminação precoce e mau prognóstico. Além disso, apresentam uma taxa de mortalidade mais elevada do que o cancro do endométrio do tipo 1 (Bansal, Yendluri e Wenham, 2009; Ali, 2014).

As outras formas de cancro do endométrio são classificadas como subtipos do cancro do endométrio do tipo 2, e incluem o adenocarcinoma seroso papilar e o adenocarcinoma de células claras, cujos fatores de risco ainda não foram bem identificados. São também detetados em estádios mais avançados e tendem a ser mais agressivos do que os adenocarcinomas endometrioides. Quando o cancro do endométrio apresenta características de mais do que um subtipo, é denominado de adenocarcinoma misto, e representa menos de 10% de todos os cancros do endométrio (Ali, 2014).

Marcadores moleculares

O *Biomarkers Definitions Working Group*, definiu marcador molecular ou biomarcador, como uma característica objetivamente mensurável e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, patológicos, ou respostas farmacológicas a abordagens terapêuticas (Banno *et al.*, 2012; Salvesen, Haldorsen e Trovik, 2012).

Os diferentes tipos de cancro do endométrio, tipo 1 e tipo 2, além de apresentarem características clínicas e morfológicas distintas, são distinguidos também por alterações genéticas (Bansal, Yendluri e Wenham, 2009).

O carcinoma do tipo endometriode, caracteriza-se por várias alterações genéticas, particularmente as que afetam proteínas ligadas à membrana celular e responsáveis pela adesão celular e transdução de sinalização (Liu, 2007; Bansal, Yendluri e Wenham, 2009). O gene *PTEN* (do inglês *phosphatase and tensin homolog*), o mais frequentemente alterado nos carcinomas deste tipo, em cerca de 83% dos casos e 55% em lesões pré-malignas, está localizado no cromossoma 10q23 e comporta-se como um gene supressor tumoral. O *PTEN* inibe a adesão e a migração celulares e antagoniza a via PI3K/AKT/mTOR (do inglês, *phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin*), representada na Figura 4. A perda de *PTEN*, resulta na ativação de AKT (do inglês *protein kinase B*) que, subsequentemente, regula

positivamente a atividade de mTOR (do inglês, *mammalian target of rapamycin*). Além disso, a perda de função de *PTEN* é um evento inicial na tumorigênese endometrial que pode ocorrer em resposta a fatores de risco endócrinos conhecidos e desempenha um papel como biomarcador imunohistoquímico para doença pré-maligna. A alteração genética subjacente em casos de perda de expressão de *PTEN* é, principalmente, a mutação e, menos frequentemente, a perda de heterozigotia sem mutação. A inativação de *PTEN* causada por mutação está associada ao estágio inicial e a uma sobrevivência favorável. A atividade de fosfatase lipídica do *PTEN* causa bloqueio do ciclo celular na fase G1/S. Além disso, a regulação positiva dos mecanismos pró-apoptóticos que envolvem as vias dependentes de AKT são mediados por *PTEN*, assim como a desregulação de mecanismos anti-apoptóticos através de BCL-2 (do inglês, *B-cell lymphoma 2*). Por conseguinte, a perda ou a alteração da expressão do gene *PTEN* resulta num crescimento celular aberrante e escape ao mecanismo de apoptose. A taxa de sobrevivência a 5 anos é de cerca de 80% nas doentes com mutações no gene, em comparação com uma taxa de 50% apresentada pelas doentes sem mutações (Liu, 2007; Bansal, Yendluri e Wenham, 2009; Tran e Gehrig, 2017).

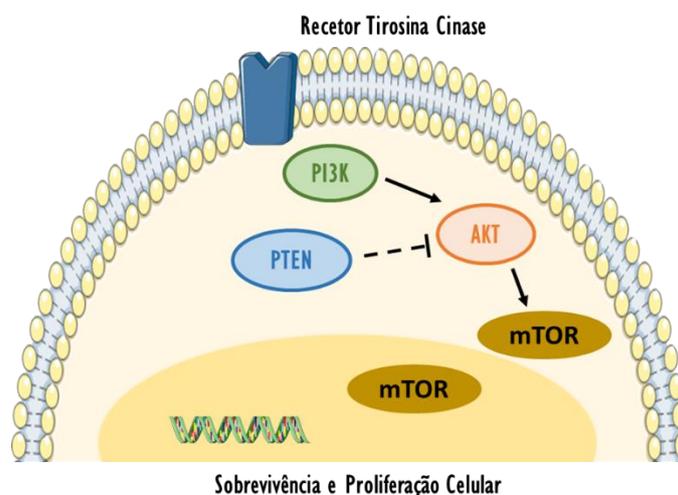


Figura 4 - Via de sinalização PI3K/AKT/mTOR. A perda da função de PTEN resulta na ativação de AKT, que subsequentemente regula positivamente a atividade mTOR (Adaptado de Slomovitz e Coleman, 2012 e de e de Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Outras alterações genéticas em cancros do endométrio endometrioides incluem a instabilidade microsatélite (MSI, do inglês *microsatellite instability*) e mutações específicas dos genes *K-RAS* (do inglês, *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) e β -*catenina*. A MSI é outra importante alteração genética no carcinoma endometriode e nas suas variantes, ocorrendo em cerca de 20 a 45% dos tumores esporádicos. A MSI refere-se à propensão para desenvolver alterações no número de repetições de elementos em microsatélites (por exemplo, pequenos segmentos de bases de DNA repetidos e encontrados

predominantemente ao longo do DNA não codificante) devido a erros de reparação do DNA ocorridos durante a replicação. A inativação do gene de reparação de DNA, o *MLH1* (do inglês, *mutL homolog 1*), pela metilação do promotor, parece ser a causa mais frequente de MSI em carcinomas endometrioides, seguida da perda de expressão de outros dois genes de reparação de DNA, o *MSH2* (do inglês *mutS protein homolog 2*) e o *MSH6* (do inglês *mutS homolog 6*). A MSI está associada à mutação *PTEN*, à ausência de sobreexpressão de *P53* e a um prognóstico favorável. A taxa de sobrevivência a 5 anos das doentes com MSI é de 77%, em comparação com 48% dos casos negativos (Liu, 2007; Bansal, Yendluri e Wenham, 2009).

O protooncogene *K-RAS* codifica uma proteína guanosina trifosfatase (GTPase, do inglês *guanosine triphosphate*) da membrana celular plasmática, que desempenha um papel importante durante a sinalização celular e está amplamente relacionado com o crescimento e a diferenciação tumoral. A presença de mutações *K-RAS* identificadas em 10 a 30% dos casos de hiperplasia endometrial indica que mutações *K-RAS* podem representar um evento inicial dentro de um subconjunto de carcinoma endometrial. As mutações *K-RAS* têm sido encontradas mais frequentemente em tumores com MSI, sugerindo que ambos os eventos podem ocorrer simultaneamente antes da expansão clonal. Contrariamente, não existem evidências de que as mutações *K-RAS* e *PTEN* ocorram no mesmo tumor (Liu, 2007; Bansal, Yendluri e Wenham, 2009).

A β -catenina, um componente da unidade proteica da E-caderina, é essencial para a diferenciação celular e a manutenção da arquitetura dos tecidos normais, e desempenha um papel importante na transdução de sinal. A mutação da β -catenina está presente em cerca de 20% dos carcinomas endometrioides. Estas mutações resultam na estabilização de proteínas que resistem à degradação, que se traduz posteriormente numa acumulação no núcleo e no citoplasma e numa ativação constitutiva do gene alvo. Diversos estudos que têm analisado cancros do endométrio revelam que a acumulação de β -catenina no núcleo, é significativamente mais frequente em lesões endometrioides (31 a 47%) do que nas não endometrioides (0 a 3%). As taxas de acumulação nuclear podem ser atribuídas a anomalias noutras proteínas da via de sinalização WNT, mas a função exata da β -catenina na tumorigénese endometrial permanece desconhecida. Alterações na expressão da β -catenina têm também sido demonstradas em hiperplasia atípica, pelo que parece representar um evento precoce na tumorigénese endometrial (Liu, 2007; Bansal, Yendluri e Wenham, 2009).

A E-caderina é uma proteína transmembranar com cinco domínios extracelulares e um domínio intracelular que se conecta à actina do esqueleto através de um complexo com a catenina citoplasmática. A diminuição da expressão de E-caderina está associada a uma perda das forças de coesão célula-célula e tem mostrado que precede a motilidade da célula tumoral, uma característica das linhas celulares tumorais com alto potencial metastático. A diminuição da expressão da E-caderina é encontrada em cerca de 5 a

40% dos carcinomas endometrioides. Os tumores negativos para a E-caderina são mais propensos a ser mal diferenciados ou não endometrioides, e estão associados a respostas modestas. A transição epitelial para mesenquimatosa (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*) permite que as células epiteliais se tornem semelhantes a células mesenquimatosas, com maior mobilidade e capacidade de invadir localmente, de intravasalar, de entrar em circulação, de extravasar e de resistir à apoptose. Os marcadores de EMT são conhecidos por estarem associados a tumores mais agressivos em diferentes órgãos. Nos carcinomas endometriais, as alterações dos marcadores relacionados com a EMT, como a E-caderina e a β -catenina, foram associadas a doença metastática e a sobrevivência reduzida (Liu, 2007; Wik *et al.*, 2013).

O *P16* é um gene supressor tumoral localizado no cromossoma 9p21. Este gene codifica uma proteína reguladora do ciclo celular e a sua inativação pode resultar num crescimento celular descontrolado. O mecanismo subjacente à expressão alterada do *P16* não é claro, uma vez que nem a metilação, a eliminação ou a mutação são frequentemente encontradas. A perda de expressão de *P16* está correlacionada com mutações no *K-RAS* e *TP53* e está associada a um estágio avançado, a alto grau, a tumores não endometrioides e a diminuição da sobrevivência (Liu, 2007).

As mutações no gene *TP53*, um gene supressor tumoral localizado no cromossoma 17, foram encontradas em aproximadamente 10 a 20% de carcinomas endometrioides, que são principalmente de grau 3. Após a ocorrência de danos no DNA, a P53 nuclear acumula-se e provoca paragem no ciclo celular, inibindo a fosforilação da ciclina-D1 do gene do retinoblastoma (Rb, do inglês *retinoblastoma*), promovendo a apoptose. Assim, a P53 mutada resulta numa proteína não funcional que se acumula na célula, que resulta na propagação de células aberrantes. As mutações *TP53*, são quase sempre associadas à aneuploidia e não parecem coexistir com mutações *PTEN* no mesmo tumor (Liu, 2007).

O oncogene *HER2/NEU* (do inglês, *human epidermal growth factor receptor 2*) codifica para um recetor transmembranar de tirosina cinase envolvido na sinalização celular. As mutações no *TP53* e a amplificação e a sobreexpressão de *HER2/NEU* caracterizam eventos tardios durante a progressão e a desdiferenciação do carcinoma endometriode. Ambas as alterações estão associadas a alto grau, a doença avançada e a mau prognóstico (Liu, 2007).

Relativamente aos carcinomas serosos, a alteração mais evidente, presente em cerca de 90% dos casos, é a mutação no gene *TP53*. As mutações no gene *TP53* estão presentes em cerca de 80% das lesões do carcinoma intra-epitelial do endométrio. Ao contrário do que acontece com os carcinomas endometrioides, a MSI é um acontecimento muito raro bem como as mutações no *PTEN* e no *K-RAS*. Outras alterações que parecem ocorrer com mais frequência em carcinomas serosos do que nos carcinomas endometrioides, são a inativação do gene *P16* e a sobreexpressão do *HER2/NEU* (Liu, 2007; Bansal, Yendluri e Wenham, 2009). A

inativação do *PI6* foi relatada em cerca de 45% dos carcinomas serosos, incluindo alguns carcinomas de células claras (Liu, 2007). Relativamente à sobreexpressão e à amplificação de *HER-2/NEU*, foram encontradas em cerca de 45% e 70% dos carcinomas serosos, respetivamente (Liu, 2007; Bansal, Yendluri e Wenham, 2009).

A expressão de E-caderina é negativa nos carcinomas serosos e reduzida nos carcinomas de células claras, no entanto, a alteração e a sobreexpressão de β -catenina, são raras neste tipo de carcinomas endometriais. Os tumores que não expressam E-caderina são mais propensos a ser pouco diferenciados ou não endometrioides e estão associados a um pior prognóstico. Tal como no carcinoma seroso, a inativação de MSI e do *PTEN*, raramente são encontradas em carcinomas de células claras. A mutação no *K-RAS* também está ausente neste tipo de tumores (Liu, 2007; Bansal, Yendluri e Wenham, 2009).

O carcinoma do endométrio é a doença maligna extracólica mais comum no HNPCC ou síndrome de Lynch, um distúrbio hereditário autossómico que aumenta a suscetibilidade à doença maligna. Foi relatado que a incidência cumulativa de cancro do endométrio, em mulheres com esta síndrome, é de 20% aos 70 anos, em comparação com 3% na população geral e a faixa etária de maior risco situa-se entre os 40 e 60 anos. Assim, no contexto desta síndrome, existem evidências de que o cancro do endométrio se desenvolve numa idade mais precoce do que na população geral. Estes carcinomas endometriais, estão relacionados com tumores do tipo I, dado que ocorrem em idade jovem, e são histologicamente do tipo mucinoso ou endometriode. Em portadoras de mutações MSH2, um estado elevado de MSI já estava presente na hiperplasia do endométrio sem atipia. É, assim, considerado um evento inicial durante o desenvolvimento do tumor (Liu, 2007).

Além das alterações nos oncogenes e dos genes supressores tumorais descritas anteriormente, várias outras moléculas e genes foram identificados como biomarcadores do cancro do endométrio. Estes incluem o indicador de proliferação Ki-67, os genes promotor e supressor de apoptose, *BAX* (do inglês, *Bcl-2-associated X protein*) e *BCL-2*, respetivamente, e os níveis de ER e de recetor de progesterona (PR, do inglês *progesterone receptor*) (Banno *et al.*, 2012).

A proliferação celular pode ser quantificada através da contagem do número de mitoses ou por imunohistoquímica da expressão de Ki67/MIB-1. A expressão de Ki67 está aumentada no adenoma seroso, nos tumores de alto grau e em regiões invadidas no cancro do endométrio (Banno *et al.*, 2012).

Frequentemente, os tumores apresentam perda da regulação do mecanismo de apoptose. No cancro do endométrio, a expressão de *BAX* pode ser perdida por mutação enquanto que o *BCL-2* apresenta uma expressão elevada na hiperplasia endometrial e uma expressão reduzida no cancro do endométrio (Banno *et al.*, 2012).

A carcinogénese endometrial é regulada pelo estrogénio e regulada negativamente pelos efeitos da progesterona. O estrogénio impulsiona a proliferação, enquanto a progesterona atua através dos recetores para neutralizar estes efeitos, promovendo a apoptose e inibindo a invasão. A progesterona é considerada um poderoso supressor tumoral do endométrio, uma função que tem sido explorada na terapêutica hormonal baseada em progestina, no tratamento do cancro do endométrio (Buhtoiarova, Brenner e Singh, 2016).

Em tumores endometriais do tipo endometriode de grau I e de grau II, os recetores ER- α são induzidos pelo estrogénio na ausência de progesterona. Um estudo analisou níveis circulantes de 18 corticoides e avaliou a correlação entre níveis hormonais em mulheres saudáveis pós-menopáusicas e em mulheres com diferentes tipos de cancro do endométrio. O estudo revelou que os níveis circulantes de todos os corticoides estavam associados a um risco aumentado de cancro do endométrio do tipo I e do tipo II e que o estrogénio foi preditivo de cancro do endométrio do tipo I de baixo grau, não invasivo. Os autores sugerem que o estrogénio circulante pode representar um biomarcador preditivo de aumento do risco de tumores recorrentes (Buhtoiarova, Brenner e Singh, 2016). Outros autores relataram que a expressão de ER- α em tumores do endométrio do tipo endometriode está associada à fase inicial, enquanto a expressão de ER- β , PR-A e PR-B está associada a tumores de baixo grau. Foi descrito que uma razão entre ER- α /ER- β menor que 1 é indicativo de uma taxa de sobrevivência livre de doença menor, enquanto uma relação de PR-A/PR-B superior a 1 foi descrita como associada a uma taxa de sobrevivência livre de doença e global menores. A ausência de ER- α em estádios iniciais foi independentemente associada à mortalidade causada pela doença, enquanto a ausência de PR-A foi um fator prognóstico independente para a recidiva (Buhtoiarova, Brenner e Singh, 2016). Singh e colaboradores descreveram que o estado do ER em cancro do endométrio pode prever a resposta à terapêutica hormonal intermitente, de tamoxifeno e de acetato de medroxiprogesterona, em doença avançada (Singh *et al.*, 2007).

As proteínas circulantes, constituem uma estratégia atraente devido ao fácil acesso para quantificação sucessiva por métodos automatizados. Os níveis elevados do antigénio do cancro CA-125, de calprotectina e do fator de diferenciação e crescimento 15, em amostras de sangue de doentes com cancro do endométrio, foram associados a um fenótipo agressivo em estudos retrospectivos. No entanto, são necessários mais estudos para se avaliar se existe algum valor clínico destes biomarcadores circulantes para o risco e estratificação da terapêutica e para a avaliação da progressão da doença, da recorrência ou da resposta ao tratamento (Salvesen, Haldorsen e Trovik, 2012).

Opções terapêuticas

A abordagem de primeira linha para as doentes com cancro do endométrio é o estadiamento cirúrgico, que permite uma avaliação mais precisa da extensão da doença, oferece informações prognósticas importantes e facilita a recomendação de terapêuticas adjuvantes. O estadiamento cirúrgico completo inclui a histerectomia total com anexectomia bilateral e linfadenectomia pélvica e para-aórtica (Salvesen, Haldorsen e Trovik, 2012; Meireles *et al.*, 2017).

Após histerectomia total com anexectomia bilateral, aproximadamente 75% das doentes apresentam doença em estágio I (Salvesen, Haldorsen e Trovik, 2012). Estas doentes que apresentam doença confinada ao útero e boa resposta à abordagem cirúrgica, estão associadas a uma probabilidade de 95% de sobrevivência livre de doença a 5 anos. Em doentes com doença avançada, esta probabilidade decresce significativamente para cerca de 57%, podendo atingir 20% (Sehouli *et al.*, 2008; Morice *et al.*, 2016).

O carcinoma endometrial do tipo seroso pode ser multifocal e a doença metastática à distância pode ser detetada na ausência de invasão miometrial. Um estadiamento cirúrgico abrangente semelhante ao do carcinoma do ovário deve ser realizado acrescentando omentectomia e biópsias peritoneais múltiplas (Salvesen, Haldorsen e Trovik, 2012).

A radioterapia primária é uma opção terapêutica para as doentes não elegíveis a tratamento cirúrgico ou subsequente recidiva após tratamento primário (Salvesen, Haldorsen e Trovik, 2012; Aapro *et al.*, 2003; Takenaka *et al.*, 2016). O tratamento da doença recorrente depende do estágio, da localização da recorrência e dos tratamentos anteriores. As doentes que apresentam risco intermédio ou alto de recorrência, podem ser elegíveis para radioterapia ou quimioterapia adjuvante ou ambas (Salvesen, Haldorsen e Trovik, 2012).

O local mais frequente de recorrência dos carcinomas do estágio I é a vagina. As recorrências vaginais isoladas em mulheres que não realizaram radioterapia são geralmente tratadas com radioterapia e braquiterapia. A braquiterapia é considerada terapêutica adjuvante padrão em doentes com carcinomas de estágio I com alto risco. As doentes que apresentem recorrência limitada à vagina, têm maior probabilidade de sobrevivência do que se a doença envolver a parede lateral pélvica (Salvesen, Haldorsen e Trovik, 2012; Morice *et al.*, 2016).

A radioterapia e a braquiterapia, como abordagens terapêuticas adjuvantes, não obtiveram resultados a nível da melhoria da sobrevivência das doentes, apesar de controlarem localmente a doença (Bestvina e Fleming, 2016).

A quimioterapia adjuvante é recomendada para estádios avançados ou histologias de alto risco mesmo em estádios iniciais. O regime de quimioterapia utilizado mais frequentemente em doença avançada ou

recorrente do endométrio inclui os derivados da platina como a carboplatina ou a cisplatina, a doxorubicina e o paclitaxel (Salvesen, Haldorsen e Trovik, 2012; Takenaka *et al.*, 2016).

O mecanismo de ação dos análogos da platina ainda não está bem esclarecido, mas pensa-se que o efeito citotóxico exercido nas células tumorais, em todas as fases do ciclo celular, seja devido à ligação ao DNA que resulta na inibição da sua síntese e das suas funções. A carboplatina é um análogo da platina de segunda geração que, além de ter como alvo o DNA, constatou-se que esta molécula se liga a proteínas nucleares e citoplasmáticas, o que possivelmente também contribuirá para o seu efeito citotóxico e antitumoral. O seu principal efeito adverso é a mielossupressão (Katzung, Masters e Trevor, 2014).

O paclitaxel é um éster alcaloide, pertencente ao grupo dos fármacos taxanos, que deriva do teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*) e do teixo europeu (*Taxus baccata*). A sua atividade anticancerígena é devida à sua ligação aos microtúbulos que, ocorrendo na ausência de proteínas a eles associadas, resultam na inibição da mitose e da divisão celular (Katzung, Masters e Trevor, 2014).

A doxorubicina pertence ao grupo das antraciclinas e os mecanismos propostos pela qual este fármaco atua nas células cancerígenas consistem na intercalação no DNA e na interrupção da sua reparação pela topoisomerase II e na geração de radicais livres. A cardiotoxicidade constitui o seu principal efeito secundário (Katzung, Masters e Trevor, 2014).

A terapêutica hormonal é frequentemente utilizada no tratamento do cancro do endométrio em fase avançada, particularmente em doentes com tumores de baixo grau ou que expressem ER e/ou PR. Os agentes comumente utilizados incluem progestativos, inibidores de aromatase e moduladores seletivos de ER (Ethier *et al.*, 2017). Em casos de doença em estágio avançado, observaram-se taxas de resposta de 33% para tratamento com tamoxifeno em alternância com medroxiprogesterona. Em casos de carcinomas do endométrio recorrentes ou metastáticos, os progestativos apresentaram uma taxa de resposta que variou de 11 a 56% (dependendo do grau), análogos da hormona de libertação da gonadotropina 11% e moduladores seletivos do ER entre 25 e 31% (Morice *et al.*, 2016).

Terapêuticas dirigidas

Na última década, as vias moleculares, representadas na Figura 5, têm sido alvo de especial atenção, e tal como noutros tipos de cancro, as terapêuticas dirigidas emergiram como excelentes opções de tratamento no cancro do endométrio (De Melo, Paulino e Garces, 2017). Através de técnicas de genómica e epigenómica, transcriptómica e proteómica, *The Cancer Genome Atlas* forneceu evidências convincentes de que os carcinomas endometriais podem ser classificados em quatro categorias: polimerase épsilon (POLE)

ultramutada, instabilidade microssatélite hipermutada, baixo número de cópias e alto número de cópias (Tran e Gehrig, 2017).

A compreensão acerca das mutações genéticas presentes no cancro do endométrio pode ser uma ferramenta importante para a classificação e a orientação de futuras terapêuticas dirigidas. Alvos comuns para terapêutica envolvem fármacos que afetam a apoptose, a transdução de sinal, a modificação epigenética, a progressão do ciclo celular, o enrolamento e degradação de proteínas, a ativação de recetores hormonais e a angiogénese (Tran e Gehrig, 2017).

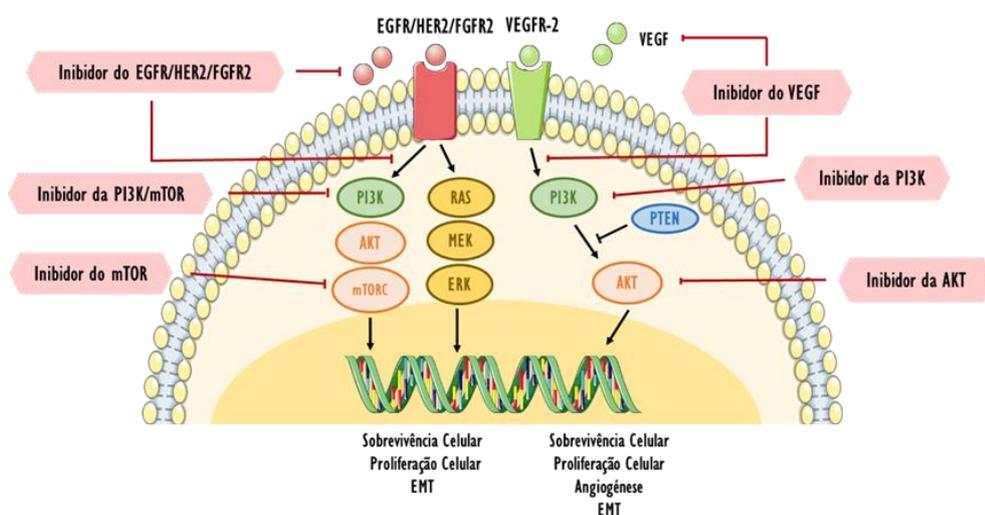


Figura 5 - Vias moleculares e potenciais alvos terapêuticos no cancro do endométrio (Adaptado de Dong *et al.*, 2014 e de de de Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Uma vez que um tumor atinge um ponto crítico de hipoxia, as neoplasias malignas requerem proliferação de novos vasos sanguíneos, denominada angiogénese, para crescer, progredir e metastizar. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) induz a formação de novos vasos sanguíneos e tem sido associado a um mau prognóstico. No cancro do endométrio, o VEGF foi correlacionado com a invasão profunda do miométrio, o maior grau histológico, a invasão do espaço linfovascular e a metástase dos gânglios linfáticos. O VEGF é consistentemente expresso numa maioria de carcinomas endometriais (Tran e Gehrig, 2017).

Vários estudos usaram o VEGF como alvo na tentativa de melhorar os resultados em doentes com cancro do endométrio, como os revistos por Tran e Gehrig. O bevacizumab é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante anti-VEGF-A que demonstrou ser o mais promissor em termos de taxas de resposta clínica em doença recorrente ou avançada. Há evidências de taxas de resposta moderada com ligeiro

aumento da sobrevivência livre de recorrência em diversos ensaios de fase II, com o uso de bevacizumab isoladamente ou em combinação com um inibidor de mTOR. Estudos iniciais onde combinaram bevacizumab com radioterapia para o tratamento do cancro do endométrio mostraram melhorar o controlo local. Um ensaio de fase II com bevacizumab em combinação com agentes citotóxicos, revelou resultados promissores, com um potencial benefício de sobrevivência. Um outro ensaio de fase II com bevacizumab, demonstrou uma taxa de resposta global de 13,5%, com sobrevivência livre de doença de 4,2 meses e 10,5 meses de sobrevivência global (Tran e Gehrig, 2017). Nenhum agente anti-angiogénico ou outros fármacos dirigidos estão aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para a terapêutica do cancro do endométrio, apesar do bevacizumab ser recomendado na terapêutica de carcinomas IIA pelas diretrizes da *National Comprehensive Cancer Network*. Um ensaio de fase II da combinação de bevacizumab e temsirolimus demonstrou uma taxa de resposta de 24,5%, contudo, alguns efeitos secundários observados foram considerados inaceitáveis (Bestvina e Fleming, 2016).

A talidomida, que tem um mecanismo de ação desconhecido como agente anti-angiogénico, foi previamente explorada como agente único no tratamento do cancro do endométrio. No entanto, a taxa de resposta não foi considerada suficiente para a investigação prosseguir (Tran e Gehrig, 2017).

A aflibercept é uma imunoglobulina G humana que atua como um recetor de ligação ao VEGF-A e neutraliza as isoformas de VEGF-A. O trabalho inicial mostrou-se promissor em cancro do endométrio, no entanto, um ensaio de fase II revelou uma baixa taxa de resposta e toxicidade significativa. O sorafenib, um inibidor de cinases que também inibe os recetores de VEGF, mostrou atividade limitada nos carcinomas endometriais. Da mesma forma, existem múltiplos inibidores de tirosina cinase de pequenas moléculas que possuem atividade inibitória no recetor de VEGF. Estes incluem dovitinib, nintedanib, brivanib e sunitinib. Os resultados dos ensaios de fase II com estes agentes mostraram eficácia limitada (Tran e Gehrig, 2017).

A sobreexpressão do recetor do fator de crescimento epidermal (EGFR, do inglês *epidermal growth factor receptor*) é comum no cancro do endométrio e tem sido correlacionada com o grau do tumor, a invasão profunda do miométrio e a mau prognóstico. A família EGFR consiste em quatro recetores distintos da superfície celular da tirosina cinase: o ErbB-1 (EGFR), o ErbB-2 (*HER2/NEU*), o ErbB-3 e o ErbB-4. Apesar do sucesso dos inibidores de EGFR noutras doenças malignas, resultados desencorajadores foram observados no cancro do endométrio devido a baixas taxas de resposta aos fármacos (Tran e Gehrig, 2017).

A sobreexpressão de *HER2/NEU* resulta em modulação da proliferação celular, diferenciação, migração, sobrevivência e regulação positiva das vias PI3K/AKT/mTOR e Ras/Raf/MAPK 77. Além disso, a sobreexpressão de *HER-2/NEU* foi demonstrada em carcinomas endometriais avançados (especificamente tumores do tipo 2) e está associado a um mau prognóstico (Tran e Gehrig, 2017). Um ensaio aleatório de fase II está em

curso, que avalia o uso da carboplatina e do paclitaxel em combinação com o trastuzumab. O ensaio pode esclarecer a utilidade deste anticorpo monoclonal em doentes com cancro do endométrio que sobreexpressam *HER2/NEU* (Tran e Gehrig, 2017). A expressão de HER2 foi detetada em 17% de carcinomas serosos e 16% de células claras. Foram estudadas várias associações terapêuticas com o trastuzumab, mas as taxas de resposta nestes estudos não foram promissoras (Bestvina e Fleming, 2016).

Recentemente, tem aumentado o interesse no estudo da combinação de inibidores de mTOR com terapêutica hormonal. A regulação ascendente da via PIK3/AKT/mTOR tem sido associada à resistência à terapêutica hormonal em linhas celulares do cancro do endométrio. Um ensaio, onde se testou a combinação de temsirolimus com acetato de megestrol e tamoxifeno, terminou numa fase precoce devido a um número excessivo de trombozes venosas, com uma taxa de 12,5% de trombose venosa profunda, de embolias pulmonares ou acidentes vasculares cerebrais, em comparação com a taxa de trombose venosa de 5%, observada com terapêutica isolada com acetato de megestrol (Fleming *et al.*, 2015). No entanto, um estudo posterior da combinação de everolimus e letrozol foi mais promissor, com uma taxa de resposta global de 32%. Neste estudo nenhum doente descontinuou a terapêutica devido a toxicidade significativa (Bestvina e Fleming, 2016).

Os inibidores de mTOR avaliados no cancro do endométrio incluem ridaforolimus, everolimus e temsirolimus. A revisão realizada por Tran e Gehrig revelou que os resultados dos ensaios com ridaforolimus mostraram baixas taxas de resposta com níveis modestos de doença estável e toxicidade significativa. Os ensaios de fase II com everolimus mostraram resultados modestos, mas apresentaram resultados promissores quando foram utilizados em combinação com letrozol. A combinação mostrou uma taxa de resposta moderada, no entanto, doentes com histologia endometriode tiveram respostas mais robustas em comparação com outras doentes (Tran e Gehrig, 2017). A resposta a everolimus em doentes portadoras de uma mutação específica foi a primeira relatada para inibidores de mTOR (Tran e Gehrig, 2017). Na generalidade, em carcinomas do endométrio, os inibidores de mTOR análogos de rapamicina aparentaram ter uma grande atividade em doentes não submetidos à quimioterapia. O temsirolimus produziu uma taxa de resposta de 14% em doentes não submetidos a quimioterapia, embora apenas uma taxa de resposta de 4% em pacientes com quimioterapia neoadjuvante (Oza *et al.*, 2011). Vários estudos não mostraram associação entre as alterações tumorais no gene *PTEN* ou as mutações em *PI3KCA* (do inglês, *phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha*) e o benefício clínico dos inibidores de mTOR. Um relatório descreveu um aumento significativo na taxa de resposta e na sobrevivência livre de doença em doentes que apresentavam mutações em AKT submetidos a tratamento com temsirolimus, sugerindo que esta pequena população pode obter benefícios do tratamento com inibidores de mTOR (Myers *et al.*, 2016; Bestvina e Fleming, 2016).

Devido ao impacto que o uso de inibidores das PARP (do inglês, *poly (ADP-ribose) polymerase*) causou nos resultados clínicos de doentes com cancro do ovário seroso de alto grau, com expressão do *BRCA 1/2* (do inglês, *breast cancer gene 1/2*), considerou-se necessário o desenvolvimento de inibidores das PARP em doenças com características semelhantes a nível de deficiências na reparação de DNA, como o cancro do endométrio. O cancro do endométrio do tipo seroso é caracterizado como um tumor genomicamente instável e que apresenta um elevado número de cópias genómicas. Estas características são semelhantes às dos tumores da mama triplo-negativo e tumores do ovário seroso de alto grau, o que pode também prever erros na reparação homóloga que sensibilizam a inibição das PARP (Rodríguez-Freixinos, Karakasis e Oza, 2016).

Uma das vias mais promissoras é a dos *immune checkpoint inhibitors*. A proteína de morte celular programada-1 (PD-1, do inglês *programmed cell death-1*) foi um dos primeiros recetores do *immune checkpoint* a ser alvo e foi encontrada uma expressão elevada em carcinomas do endométrio. PD-1 e PD-L1 (do inglês *programmed cell death-ligand 1*) foram detetados nos tecidos de carcinomas endometriais através de imunohistoquímica em 301 amostras tumorais. A marcação para PD-1 e PD-L1 foi positiva em 77,9% e 39,7% em carcinomas endometrioides, 68,2% e 10,2% em carcinomas serosos, 69,2% e 23,1% em carcinomas de células claras e 80,0% e 22,2% em carcinosarcomas, respetivamente (Gadducci e Guerrieri, 2017). Existe informação limitada sobre o uso destes agentes no tratamento do cancro do endométrio, no entanto, os ensaios continuam a decorrer (Tran e Gehrig, 2017).

Células estaminais do cancro do endométrio

O tecido endometrial, conhecido como um dos tecidos humanos que sofre ciclos de crescimento, regressão e desagregação, tem sido alvo de investigação ao longo dos anos, acerca da presença de células estaminais somáticas (SSC, do inglês *somatic stem cells*) endometriais, representadas na Figura 6 (Alcaraz *et al.*, 2009).

As SSC são definidas como subpopulações restritas de células quiescentes, de ciclo lento e indiferenciadas, presentes num tecido ou órgão de um organismo adulto. Estas células são caracterizadas por apresentarem uma alta capacidade proliferativa, multipotencialidade ou a capacidade de formar células diferenciadas do tecido ou células da origem embriológica de que derivam. Estas células são reguladas por um microambiente fisiológico específico, denominado nicho. Nichos específicos foram já identificados em muitos tecidos adultos e proporcionam o equilíbrio entre processos de autorrenovação e diferenciação das células estaminais presentes (Alcaraz *et al.*, 2009; Cervelló *et al.*, 2013).

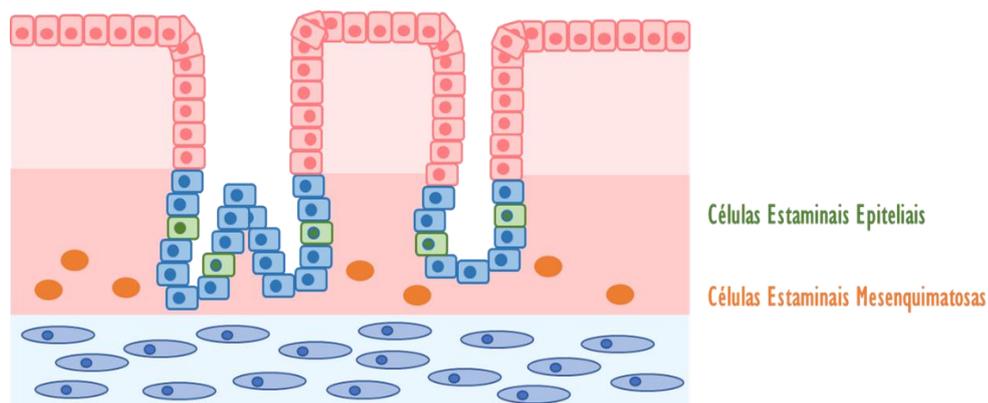


Figura 6 - Possível localização das células estaminais do endométrio (Adaptado de (Gargett, Schwab e Deane, 2016; Carvalho, 2015).

A primeira evidência para a existência de células estaminais epiteliais e estromais endometriais humanas, foi demonstrada em estudos clonogénicos, devido à capacidade destas células para formar colónias, uma das características típicas das células estaminais. Nestes estudos, foram obtidos dois tamanhos distintos de colónias, grandes e pequenas, que corresponderam a aglomerações de SSC e de ATC, respetivamente. A atividade das células estaminais do endométrio humano, com base na eficiência clonogénica, e alto potencial de proliferação e de diferenciação, corresponde às grandes colónias dos compartimentos epiteliais e estromais. Os autores levantaram a hipótese de que as grandes colónias (células epiteliais e estromais) seriam candidatas à população endometrial de SSC envolvida na regeneração do endométrio humano a partir da camada basal (Alcaraz *et al.*, 2009; Cervelló *et al.*, 2013).

Uma população celular, denominada por *label-retaining cells* (LRC), foi identificada *in vivo* no epitélio e no estroma de endométrio de rato, como candidatas a SSC. A abordagem de LRC identifica as SSC pela sua natureza quiescente e de ciclos lentos. Através de estudos de imunohistoquímica, conseguiram visualizar-se as células da população LRC, que retêm a BrdU, um possível marcador de células estaminais endometriais, revelando a sua localização e o nicho de células estaminais nas proximidades (Cervelló *et al.*, 2011; Carvalho, 2015).

O teste de exclusão de Hoechst é outro método para a identificação e isolamento de células estaminais em tecidos adultos na ausência de marcadores específicos conhecidos. Uma SP pode ser identificada por citometria de fluxo, através de um duplo comprimento de onda, após incubação de células alvo com o corante de ligação ao DNA, Hoechst 33342. Este fenómeno é devido à expressão de uma proteína membrana de resistência ao cancro da mama (BCRPI, do inglês *breast cancer resistance protein 1*), relacionada com células imaturas. Como resultado desta metodologia, diferentes populações de células podem ser separadas fisicamente. Uma SP epitelial e estromal foi identificada no endométrio humano. A percentagem média de

células da SP na fração epitelial foi de 0,21% durante a fase menstrual, 0,15% durante a fase proliferativa e 0,02% na fase secretora. No compartimento estromal, a SP foi de 3,9% durante a fase menstrual, provavelmente devido à mobilização desta população neste momento específico. Percentagens muito baixas de células da SP estromal foram identificadas nas fases proliferativa (0,06%) e secretora (0,1%) (Cervelló *et al.*, 2011).

As células estaminais mesenquimatosas (MSC, do inglês *mesenchymal stem cells-like*) definem-se como células estaminais adultas multipotentes com capacidade de diferenciação em linhagem mesodérmica, como osteócitos, adipócitos e condrócitos, bem como linhagens ectodérmica (neurócitos) e endodérmica (hepatócitos) (Ullah, Subbarao e Rho, 2015). Uma subpopulação de células estromais a CD146⁺/PDGF-R β ⁺ (do inglês, *platelet derived growth factor receptor-beta*) com características de MSC foi isolada de endométrio humano. A diferenciação destas células em linhagens adipogénicas, miogénicas, condrogénicas e osteoblásticas foi demonstrada aquando da cultura desta subpopulação com meios de indução apropriados. Estudos de microscopia confocal mostraram que as células coexpressoras de CD146 e de PDGF-R β tinham localização perivascular nas camadas funcional e basal (Cervelló *et al.*, 2011).

A primeira evidência da origem de CSC do endométrio foi sugerida em 1997, num estudo sobre uma linha celular derivada de um carcinosarcoma uterino. Neste estudo, as células que formaram colónias conseguiram manter esta capacidade durante séries de 50 passagens, e as colónias eram compostas por células fenotipicamente semelhantes às células de origem. Estas células clonais altamente proliferativas, expressavam marcadores imunohistoquímicos e moleculares semelhantes ao tecido parental, replicaram o fenótipo do tumor *in vitro* e foram definidas como células estaminais responsáveis pela propagação da linha celular. Embora estes resultados sejam promissores, não foram realizados estudos em células de carcinomas endometriais recém-isoladas, ou mesmo em linhas celulares de cancro do endométrio (Hubbard e Gargett, 2010).

Vários investigadores identificaram células putativas estaminais/progenitoras em SP de tumores sólidos e em linhas celulares cancerígenas, através de proteínas transportadoras associadas a resistência a múltiplos fármacos, sensíveis ao verapamil. Estudos de Friel e colaboradores, identificaram uma SP tumorigénica numa linha celular de cancro de endométrio humano que apresentava aumento da quimiorresistência e quiescência *in vitro* em relação a uma população não-SP. Estudos *in vitro* mostraram que as células de uma SP da linha celular AN3-CA, proliferam mais lentamente do que a fração não-SP correspondente. As células apresentaram propriedades de autorrenovação a longo prazo e acumulação na fase G1 do ciclo celular, o que sugere que as células estão em quiescência. As células da SP de AN3-2CA apresentaram resistência ao tratamento com paclitaxel em comparação com uma população não-SP. No entanto, não foram observadas

diferenças nos estudos com a cisplatina (Friel *et al.*, 2010). Outras investigações em SP da linha Hec-I também mostraram capacidade proliferativa e de autorrenovação *in vitro* por um longo período. Evidenciou-se que esta população SP gerou tumores maiores do que a fração não-SP correspondente, e os tumores formados pela SP eram fenotipicamente idênticos, aos tumores originais e também sofreram EMT durante o desenvolvimento (Kato *et al.*, 2010). Resultados preliminares obtidos com estudos com a linha celular de carcinoma endometrial Ishikawa, mostraram que continha uma fração SP. Além disso, estas células também apresentaram capacidade de formar esferas, característica comum das CSC (Cervelló *et al.*, 2011).

As células iniciadoras de tumores foram identificadas em leucemia e numa variedade de tumores sólidos com base na expressão diferencial de um ou mais marcadores de superfície celular, sugerindo que a heterogeneidade das células iniciadoras do tumor existe especificamente para cada tipo de tumor. Como revisto por Friel, alguns autores demonstraram a existência de células de cancro do endométrio com propriedades clonogénicas, com capacidade de autorrenovação, de diferenciação e tumorigénica, sustentando ainda a hipótese de que uma população de células estaminais do cancro pode ser responsável pela formação de tumores ou de lesões metastáticas. Outros investigadores identificaram o CD133 como um potencial marcador de células iniciadoras de tumor, em tumores sólidos do cérebro, da próstata, do cólon e, mais recentemente, do ovário e do endométrio. As células CD133⁺ foram associadas a um aumento na iniciação do tumor *in vivo*, divisão celular assimétrica e aumento da resistência a fármacos antineoplásicos, em comparação com as células CD133⁻. As células CD133⁺ isoladas de adenocarcinomas endometrioides apresentaram resistência à citotoxicidade induzida por cisplatina e paclitaxel. Estas células quando transplantadas em ratos imunocomprometidos, foram capazes de formar tumores que apresentaram fenótipo semelhante ao do tumor original. De uma forma global, estes dados suportam a hipótese de que o CD133 é expresso por carcinomas do endométrio humano e pode servir como marcador de células com maior capacidade tumorigénica (Friel *et al.*, 2010).

Apesar de existirem evidências de que as células CD133⁺ apresentam características de CSC, não existem evidências conclusivas de que o CD133 seja um marcador universal para as CSC do endométrio. Atualmente, sugere-se que o CD133 pode ser um marcador para o isolamento da população de CSC endometrial. Este marcador pode ser útil como fator prognóstico no carcinoma endometrial (Elbasateeny *et al.*, 2016).

Além do CD133, existem outras proteínas interessantes que podem ser expressas em CSC de tumores sólidos, como o carcinoma endometrial. O CD44 tem múltiplas funções biológicas, inicialmente implicadas no processo de invasão e de metastização, que atualmente é reconhecido como um marcador para células

iniciadoras de tumor em diferentes tecidos. Nos carcinomas do endométrio, este marcador é expresso em esferas provenientes de linhas celulares de cancro do endométrio (Elbasateeny *et al.*, 2016).

Estudos realizados em carcinomas endometriais, associaram uma elevada atividade da ALDH a um mau prognóstico. A população que apresentou elevada atividade da ALDH (ALDH^{hi}) do adenocarcinoma endometrial foi mais invasiva, anti-apoptótica e tumorigénica do que a população com baixa atividade (ALDH^{lo}) (Mamat *et al.*, 2011). A expressão desta enzima em células cancerígenas está também associada ao tamanho do tumor, à invasão de gânglios linfáticos e à doença recorrente. O aumento da atividade da enzima ALDH foi encontrado em populações de CSC em diversos tumores, como o cancro do endométrio, onde a expressão da enzima ALDH1 está associada à tumorigenicidade e à resistência à quimioterapia (Carvalho, 2015; Zee, Van Der *et al.*, 2015).

Resistência à terapêutica

Os tumores resistentes ao tratamento continuam a ser um grande desafio pelo que, existe uma necessidade de compreensão da razão pela qual os tumores não respondem às abordagens terapêuticas. A recorrência é particularmente comum em estádios avançados, e muitos tumores recorrentes tendem a ser quimiorresistentes. O desenvolvimento de novos tratamentos direcionados especificamente às células cancerígenas quimiorresistentes tem sido dificultado pelo desconhecimento dos mecanismos moleculares subjacentes à carcinogénese e à progressão tumoral, e à natureza heterogénea do tecido cancerígeno (An e Ongkeko, 2009).

As CSC podem desempenhar um papel importante na doença recorrente e metastática. Pelas razões apresentadas, a avaliação desta população pode ser importante para um melhor prognóstico e para a projeção de uma abordagem terapêutica eficaz (Cervelló *et al.*, 2011). Existem evidências de que as CSC conferem resistência à quimioterapia e à radioterapia em vários tipos de cancro (An e Ongkeko, 2009; Islam *et al.*, 2015).

Tal como as SSC, as CSC são relativamente quiescentes em comparação com células tumorais mais diferenciadas. Esta taxa de renovação lenta das CSC, confere-lhe uma defesa intrínseca contra os agentes antineoplásicos tradicionais, que são antiproliferativos e mais eficazmente alvo das células cancerígenas em divisão mais rápida (An e Ongkeko, 2009). No entanto, as CSC quiescentes ou que se replicam lentamente, mostram uma maior ativação dos pontos de controlo de danos do DNA do que as células tumorais não-estaminais, após serem irradiadas. Estudos apontam estes mecanismos como responsáveis pela resistência das CSC à radioterapia. Diferentes vias de sinalização, como WNT, HEDGEHOG, NOTCH, Oct-4 ou da família da Janus cinase, geralmente envolvidas na biologia de células estaminais, também parecem desempenhar um

papel na radiorresistência das CSC. Estudos demonstraram que a intervenção química ou a desregulação destas vias aumentou a sensibilidade terapêutica de CSC em vários tipos de cancro (Cervelló *et al.*, 2011; Islam *et al.*, 2015).

Por outro lado, as células estaminais geralmente expressam proteínas associadas à capacidade de efluxo de fármacos. Esta característica torna-as resistentes a muitas terapêuticas convencionais anticancerígenas, como a quimioterapia, a terapia hormonal ou a inibição molecular. No carcinoma endometrial, demonstrou-se que as células SP iniciadoras de tumores, são resistentes a agentes quimioterapêuticos convencionais *in vitro*, como a cisplatina e o paclitaxel (Cervelló *et al.*, 2011).

O aumento da expressão e da atividade da família de transportadores ABC, especialmente o ABCG2, correlaciona-se com fenótipos parecidos com células tumorais estaminais. Estudos demonstraram que a proteína transmembranar humana ABCG2 é um importante mediador da resistência a múltiplos fármacos. A ABCG2 (ou proteína de resistência ao cancro da mama: BCRP, ABCP, MXR) é um membro da família ABC composta principalmente por proteínas transmembranares. As proteínas ABC permitem o transporte de fármacos, lipídios, antibióticos, esteróis, sais biliares, péptidos, glicosídeos, nucleotídeos, metabolitos endógenos e iões. Dentro desta família, o ABCG2, a glicoproteína-P (Pg-P, do inglês *glycoprotein P*) (ABCB1/MDR1/Pg-P) e a proteína associada à resistência múltipla a fármacos (MDR, do inglês *multiple drug resistance*) (MRP1/ABCC1) são responsáveis pela maior parte da resistência a múltiplos fármacos em seres humanos (An e Ongkeko, 2009).

A expressão elevada destas proteínas em alguns tipos de tumor, como o cancro da mama, do pulmão, da bexiga, do ovário, da leucemia mieloide aguda, da mieloma e do sarcoma, resulta num efluxo, dependente de adenosina trifosfato (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*), de fármacos citotóxicos, pelo que a concentração dos fármacos dentro das células se mantém abaixo do nível citotóxico. Os três transportadores, ABCG2, Pg-P e MRP1, têm um amplo espectro de substratos e uma grande sobreposição na especificidade do fármaco, proporcionando resistência tumoral às principais classes de fármacos quimioterapêuticos, incluindo taxanos, antimetabolitos, inibidores de topoisomerase, bem como terapêuticas moleculares dirigidas, como inibidores de tirosina cinase como o sorafenib, o imatinib, o nilotinib, o gefitinib e o erlotinib (Cojoc *et al.*, 2015).

Em situações de stresse do microambiente, como a hipoxia, a falta de nutrientes ou a presença de fármacos, as CSC usam fontes de energia alternativas através da ativação de processos catabólicos que mantêm a homeostase metabólica e a viabilidade celular. Um mecanismo importante para a degradação e a reciclagem intracelular, bem como a homeostase, é a autofagia. Este mecanismo é suficiente para bloquear a invasão *ex vivo* de células progenitoras de cancro da mama e para reprimir a formação de esferas e a

formação de xenotransplantes *in vivo* (Cojoc *et al.*, 2015). Demonstrou-se também que o fluxo autofágico é significativamente maior em mamosferas do que nas células controlo. Neste sentido, a autofagia demonstrou ser superior nas subpopulações ALDH1⁺ de cancro da mama (Rao *et al.*, 2012). Noutros tipos de cancro, foi demonstrado que a autofagia é essencial para a manutenção de células progenitoras e tumorigenicidade. A autofagia mediou a sobrevivência das células iniciadoras de tumor, especialmente num ambiente hipóxico, como foi demonstrado no adenocarcinoma ductal pancreático (Cojoc *et al.*, 2015).

Vários trabalhos demonstraram que o efeito citoprotetor da autofagia nas CSC e noutras células cancerígenas contribui para a resistência à terapêutica em diversos tipos de cancro, como o melanoma, o cancro da próstata ou o cancro do pulmão de não pequenas células. Um estudo mostrou que a autofagia induzida por neuropilina-2 (NRP-2, do inglês *neuropilin-2*) aumenta a resistência à quimioterapia em linhas celulares do cancro da próstata e do pâncreas e que a inibição de NRP-2 supera essa resistência (Cojoc *et al.*, 2015).

Nas células estaminais, bem como nas CSC, o aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas aumenta o limiar para a indução de apoptose e protege diretamente as células contra a morte celular por esta via. Por exemplo, em CSC da mama e de leucemia mieloide aguda, a BCL-2 e a BCL-XL (do inglês, *B-cell lymphoma - extra large*) são altamente expressas. A análise proteómica direta de CSC colorretais e de células diferenciadas revelou que a apoptose era uma das principais vias moleculares afetadas, envolvendo a expressão de proteínas anti-apoptóticas chave. Através de um ensaio que permite medir diretamente o estado de apoptose das células, demonstrou-se que as CSC apresentavam menos sinais de apoptose do que as células diferenciadas o que, de certa forma, explica a resistência à quimioterapia convencional (Colak e Medema, 2014).

A ALDH é uma enzima pertencente à família das enzimas dependentes de NAD(P)⁺, envolvida em processos de desintoxicação e oxidação de vários aldeídos endógenos e exógenos nos seus ácidos carboxílicos fracos. A isoforma ALDH1A1 está envolvida no metabolismo da vitamina A (retinol), oxida o retinaldeído em ácido retinoico e sintetiza o ácido gama-aminobutírico (GABA, do inglês, *gamma-aminobutyric acid*), que desempenham um papel na manutenção e na diferenciação de células estaminais normais e de CSC (Cojoc *et al.*, 2015; Januchowski *et al.*, 2016a). A regulação e a função da ALDH em células estaminais normais e CSC estão representadas na Figura 7.

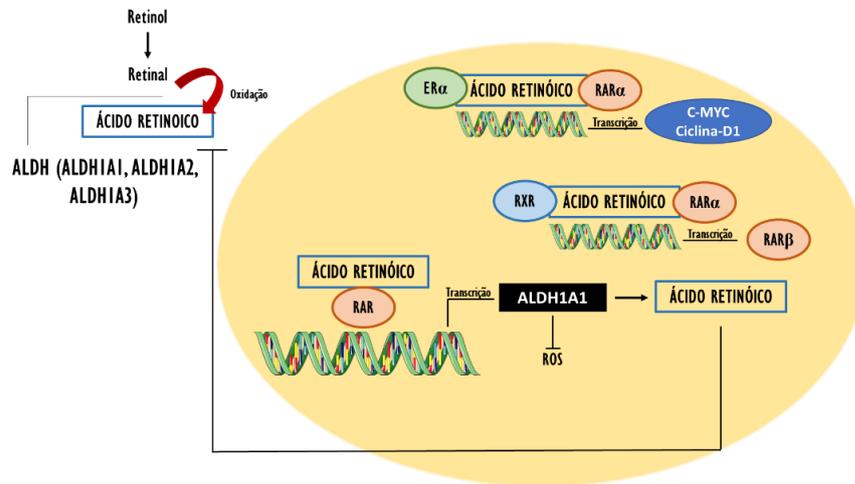


Figura 7 - A família ALDH metaboliza o ácido retinoico, regulando assim a autorrenovação, diferenciação e resistência tumoral de células estaminais normais e CSCs. O retinol captado pelas células é oxidado em retinal. O retinal é oxidado em ácido retinoico por enzimas ALDH. O ácido retinoico liga-se a dimeros de RAR α e RXRs para induzir a expressão dos seus genes alvo a jusante incluindo RAR β . Nas células que expressam ER α , o ácido retinoico pode ligar-se a dimeros de RXRs e ER α , bem como induzir a expressão de c-MYC e ciclina-D1. Abreviaturas: RAR, recetor de ácido retinoico; RXR, recetor de retinoide X; ER, recetor de estrogénio; ROS, espécies reativas de oxigénio. (Adaptado de Tomita *et al.*, 2016 e de e de Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Diversos estudos, indicam que a ALDH1A1 está envolvida na biologia de células estaminais normais e cancerígenas, e que desempenha um papel na resistência a fármacos dessas células (Januchowski *et al.*, 2016a; Januchowski, Wojtowicz e Zabel, 2013). O aumento da atividade da enzima ALDH foi encontrada em CSC de tumores do cólon, do ovário, da próstata e da mama. O aumento da expressão do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA, do inglês *messenger ribonucleic acid*) do gene ALDH1 foi detetado no cancro do endométrio e o seu nível de expressão correlaciona-se negativamente com a sobrevivência global das doentes (Van Der Zee *et al.*, 2015).

Num estudo experimental realizado pelo nosso grupo foram obtidas três populações de esferas e três populações de células derivadas aderentes a partir da linha celular de cancro do endométrio ECC-1. A avaliação de marcadores de estaminalidade e a expressão de ALDH foi realizada, e esta última revelou ser superior nas populações de esferas (Carvalho, 2015).

O aumento da expressão da ALDH1A1 em estudos com CSC de endométrio e em tecidos tumorais de doentes resistentes à quimioterapia, bem como em muitas linhas celulares resistentes a fármacos, levaram investigadores a determinar se a ALDH poderia ser usada como alvo molecular na terapêutica do cancro (Januchowski *et al.*, 2016a).

Estudos de Croker e colaboradores, mostraram que os inibidores da ALDH, como o ácido trans-retinoico (ATRA, do inglês *all-trans retinoic acid*) e o DEAB, sensibilizaram células do cancro da mama ALDH⁺ aos tratamentos com paclitaxel e com epirrubina (Croker e Allan, 2012).

O efeito do inibidor ATRA pode resultar da sua atividade de diferenciação. Em leucemia, o tratamento com ATRA aumentou o nível de ácido retinoico intracelular e, conseqüentemente, os níveis de ALDH1A1 e ALDH3A1 diminuíram e os promielócitos malignos diferenciam-se em neutrófilos maduros, mais sensíveis à quimioterapia. O papel do DEAB no aumento da sensibilidade das células ALDH⁺ para a quimioterapia não está claro. Como o DEAB inibe a atividade da ALDH, sugeriu-se que a ALDH, especialmente a ALDH1A1, possa desempenhar um papel direto na resistência a fármacos (Croker e Allan, 2012).

Januchowski e colaboradores, analisaram a expressão da ALDH, através da análise de microarrays da expressão gênica em seis linhas celulares de cancro do ovário resistentes a fármacos. As células resistentes ao paclitaxel e ao topotecano, apresentaram elevada expressão de ALDH1A1. Estes resultados foram confirmados por PCR, *western blot*, microscopia de fluorescência e pelo ensaio do ALDEFLUOR. Através do ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium), mostraram que o tratamento com ATRA e com DEAB, sensibilizou as células para os citostáticos. O mecanismo responsável pela sensibilização celular resultou na diminuição dos níveis das proteínas Pg-P e BCRP após o tratamento com os inibidores (Januchowski *et al.*, 2016a).

OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi o isolamento, a caracterização e a avaliação da resposta à terapêutica das CSC provenientes de linhas celulares de cancro do endométrio. Pretendeu-se estudar a inibição da enzima ALDH nestas populações tumorais do endométrio, de modo a esclarecer os mecanismos de resistência e o potencial para desenvolvimento de terapêuticas dirigidas.

Numa perspetiva translacional, pretendeu-se caracterizar as CSC do endométrio em tumores provenientes de doentes com cancro do endométrio e correlacionar com resultados clínicos e patológicos.

O objetivo da caracterização das CSC do endométrio compreendeu o isolamento das populações com capacidade de formação de esferas, a autorrenovação e os marcadores de CSC. Pretendeu-se também caracterizar as populações com propriedades de CSC quando submetidas aos inibidores da ALDH.

Nos estudos da resposta à terapêutica, o objetivo foi avaliar a ação dos fármacos carboplatina, paclitaxel e doxorrubicina, citostáticos usados na prática clínica no tratamento do cancro do endométrio, nas populações tumorais isoladas. Deste modo, foi estudada a influência deste tratamento na proliferação, expressão de proteínas envolvidas na resistência à terapêutica e morte celular, assim como danos no DNA.

No que concerne aos estudos com as amostras tumorais de doentes com cancro do endométrio, pretendeu-se otimizar o protocolo do isolamento de populações de CSC através do protocolo de formação de esferas e a caracterização destas populações tumorais no que respeita às propriedades estaminais. Com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de uma plataforma de resposta personalizada à terapêutica, avaliou-se a resposta dos tumores aos citostáticos utilizados na quimioterapia através do estudo de marcadores de CSC e de proliferação celular em fragmentos tumorais. Os resultados obtidos foram correlacionados com os dados clínicos de cada doente, particularmente o estadiamento inicial e o comportamento biológico do tumor.

MATERIAL E MÉTODOS

Parte I — Estudo Fundamental

Células tumorais do endométrio: caracterização e avaliação da inibição da aldeído desidrogenase

Culturas celulares

Neste trabalho experimental foram utilizadas duas linhas celulares de cancro do endométrio humano, RL95-2 e ECC-1, obtidas à *American Type Culture Collection* (ATCC). A linha celular RL95-2, uma linha de carcinoma endometriode humano do tipo I, de grau 2, obtida a 31 de outubro de 2017, foi propagada e cultivada em modo aderente com meio de cultura composto por *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM, Sigma D-5648) e uma mistura de nutrientes de Ham F12 numa proporção de 1:1 (F12, Sigma N-6760), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, do inglês, *fetal bovine serum*, Sigma F-7524), 0,005 mg/mL de insulina (Sigma I0516) e 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomicina, Sigma A5955). A linha celular ECC-1, uma linha de carcinoma endometriode humano do tipo I, de grau 2, obtida a 1 de junho de 2012, foi propagada e cultivada em modo aderente sob recomendações do fornecedor. Para a manutenção celular desta linha celular, utilizou-se o meio de cultura *Rooswell Park Memorial Institute 1640 medium* (RPMI, Sigma R6504), suplementado com 5% de FBS, 400 mM de piruvato de sódio (Gibco, I1360) e 1% de antibiótico.

Para a realização dos estudos, e pelo facto de se tratar de linhas celulares cultivadas em modo aderente, foi necessário destacar as células para a preparação de suspensões celulares. As culturas celulares foram lavadas com uma solução de tampão salino de fosfato (PBS, do inglês, *phosphate buffer saline*), uma solução constituída por cloreto de sódio na concentração de 137 mM (NaCl, JMGS, 037040005002212), por cloreto de potássio na concentração de 2,7 mM (KCl, Sigma, P9333), por dihidrogenofosfato de sódio na concentração de 10 mM (NaH₂PO₄, Merck, 6580.0500), por dihidrogenofosfato de potássio na concentração de 1,8 mM (KH₂PO₄, Sigma, P0662) e por ácido etilenodiaminotetracético na concentração de 5mM (EDTA, VWR - M101), com pH de 7.4, e incubadas com cerca de 2 mL de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma, T4049), durante cerca de 5 minutos a 37°C. Posteriormente, para a inativação da tripsina adicionaram-se 5 mL de meio de cultura. Para a contagem do número de células das suspensões celulares obtidas, uma alíquota de cada suspensão foi corada com azul tripano e colocada num hemocitómetro num microscópio ótico invertido (Nikon Eclipse TS 100) numa ampliação de 100x. O método de exclusão do azul tripano consiste num método baseado no princípio de que as células mortas, por terem a membrana celular destruída, coram de azul e as células viáveis, com uma membrana intacta, apresentam uma cor branca

brilhante (Strober, 2015). Após a contagem, o volume das suspensões celulares foi ajustado de modo a que se obtivessem as suspensões com a concentração desejada.

Inibição da aldeído desidrogenase

A resistência das CSC às terapêuticas convencionais resulta de diversos mecanismos, incluindo o aumento da expressão de enzimas detoxificantes, como a ALDH (Van Der Zee *et al.*, 2015) que, conseqüentemente contribui para a sobrevivência celular e para a resistência aos fármacos (La Porta, 2012). A expressão desta enzima em células neoplásicas está também associada ao volume tumoral, à invasão de gânglios linfáticos, à doença recorrente e a um mau prognóstico. O aumento da atividade da enzima ALDH foi encontrado em populações de CSC em diversos tumores, como o cancro do endométrio, onde a expressão da enzima ALDH1 está associada à tumorigenicidade e à resistência à quimioterapia (Carvalho, 2015; Van Der Zee *et al.*, 2015). Neste sentido, a enzima ALDH é considerada um importante alvo de estudo e através da avaliação da sua inibição, pretende-se investigar o seu papel na resistência à terapêutica em CSC do endométrio. Este estudo, poderá também contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas dirigidas e para a implementação de terapêuticas personalizadas.

Nos estudos de avaliação da inibição da ALDH, foram utilizados os compostos ATRA (SC-200898, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), DEAB (SC-238831, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) e JQ1 (Sigma, SML1524), descritos como inibidores desta enzima. As concentrações de inibidores, 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M e 50 μ M de ATRA, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M e 500 μ M de DEAB e 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM e 500 nM de JQ1, e o tempo de incubação de 48 horas, foram selecionados de acordo com estudos anteriores descritos na literatura (Croker e Allan, 2012; Januchowski *et al.*, 2016a; Yokoyama *et al.*, 2016; Alghamdi *et al.*, 2016).

Citotoxicidade dos inibidores da ALDH

O estudo iniciou-se com um teste de citotoxicidade, o ensaio de MTT, de modo a comprovar que as concentrações dos inibidores da ALDH a utilizar em ensaios posteriores não provocavam efeitos tóxicos por si só nas linhas celulares de cancro do endométrio, RL95-2 e ECC-1.

O MTT consiste num sal de tetrazólio solúvel em água que forma uma solução amarelada. Este sal é incorporado pelas células e é reduzido, principalmente por enzimas mitocondriais, para produzir cristais de formazano de cor azul escura. Este composto é impermeável à membrana celular e, por isso, vai ocorrer acumulação dentro de células viáveis. A capacidade das células de reduzir MTT fornece uma indicação da

integridade e atividade mitocondrial que, por sua vez, pode ser interpretada como uma medida da atividade metabólica e, conseqüentemente, da viabilidade (Maioli *et al.*, 2009).

Para tal, prepararam-se suspensões celulares com 80.000 células/mL que se incubaram durante 24 horas de forma a permitir a adesão das células. Após este período, administraram-se os inibidores da ALDH. O ensaio de MTT foi realizado 48 horas após a administração dos inibidores.

O meio da placa foi descartado e os poços foram lavados com PBS. O PBS foi descartado e nos poços foram introduzidos 150 μ L de uma solução MTT (0,5 mg/mL, Sigma M2128). A placa foi a incubar num local desprovido de luz a 37 °C durante 4 horas. De modo a solubilizar os cristais de formazano formados, introduziram-se nos poços 150 μ L de 2-propanol (Sigma, 278475) e colocou-se a placa a agitar durante cerca de 30 minutos. Posteriormente, quando todos os cristais já estavam dissolvidos, o conteúdo dos poços foi ressuspensionado e transferido para uma placa de 96 poços que foi lida num espectrofotómetro Biotek® Synergy HT a 570 nm e 620 nm.

Western blot

Para a avaliação da expressão da ALDH, as linhas celulares RL95-2 e ECC-1 foram submetidas à ação dos inibidores desta enzima, ATRA nas concentrações de 5 e de 10 μ M nas células RL95-2 e de 1, de 5 e de 10 μ M nas células ECC-1, DEAB nas concentrações de 50 e de 100 μ M nas células RL95-2 e de 25, de 50, de 100 e de 250 μ M nas células ECC-1, e JQ1 nas concentrações de 100 e de 250 nM nas células RL95-2 e de 50, de 250 e de 500 nM, nas células ECC-1, durante 48 horas. Posteriormente, realizaram-se extratos de proteína total das células submetidas a tratamento e dos respetivos controlos.

Para a preparação dos extratos de proteína total, retirou-se o meio de cultura, fez-se uma lavagem com PBS, retirou-se o PBS e adicionou-se uma solução de RIPA (tampão de radioimunoprecipitação), constituída por NaCl na concentração de 150 mM, por Tris-HCl na concentração de 50 mM a pH 7.4, por ácido etilenoglicoltetracético na concentração de 5 μ M (EGTA), por 1% de Triton-X, por 0,5% de DOC (do inglês, *2,5-Dimethoxy-4-chloroamphetamine*) e por 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS do inglês, *sodium dodecyl sulfate*, Sigma 436143), e suplementada com um *cocktail* de inibidores de proteases (cOmplete Mini, Roche 118 361 700 01) e 1 mM de DTT (do inglês, *dithiothreitol*). As células foram destacadas com ajuda de um raspador e as suspensões celulares transferidas para microtubos. Posteriormente, as suspensões celulares sofreram agitação no vórtex e foram submetidas a sonicação com uma amplitude de 30% (Sonicador VibraCell VC50, Sonic and Materials inc. USA), sempre em gelo. De seguida, foram centrifugadas durante 15 minutos a 13500 xG e os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos, posteriormente armazenados a -80°C e disponíveis para posterior análise por *Western Blot*.

Para a determinação da quantidade de proteína usou-se o método de BCA (do inglês, *bicinchoninic acid*, BCA TM protein assay kit, Pierce).

O *Western blot* é uma técnica de biologia celular e molecular importante e muito usada na detecção de proteínas específicas numa mistura complexa de proteínas de um homogeneizado de tecido ou de um extrato celular (Mahmood e Yang, 2012). A primeira etapa consiste na separação das proteínas de uma amostra por eletroforese em gel, separação esta feita com base no seu peso molecular, carga elétrica e ponto isoelétrico, ou então numa combinação destas características. Neste procedimento foram utilizados géis de poliacrilamida e uma solução desnaturante com SDS. Esta solução consiste num detergente que tem a capacidade de conferir carga negativa às proteínas, permitindo a sua separação por peso molecular através do eléctrodo positivo do gel de poliacrilamida. Deste modo, as proteínas migram a velocidades distintas aquando da aplicação de uma diferença de potencial no gel, onde as proteínas com menor peso molecular migram a uma velocidade superior e ficam localizadas no fundo do gel enquanto as proteínas com maior peso molecular, migram a uma velocidade inferior localizando-se, assim, no topo do gel. Depois da migração das proteínas, estas são transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês, *polyvinylidene difluoride*) e através de anticorpos específicos, as proteínas alvo são detetadas e analisadas. Nesta fase, introduz-se um anticorpo primário na amostra, onde ocorre a marcação de proteínas com antígenios. Com esta marcação, as proteínas podem ser identificadas mais facilmente através de um anticorpo secundário, que se liga de forma específica ao anticorpo primário. Uma amostra de cada um dos extratos, foi desnaturada a 100°C durante 7 minutos, após solubilização em solução desnaturante constituída por Tris na concentração de 100 mM, glicina na concentração de 100 mM, SDS na concentração percentual de 4%, ureia na concentração de 8 mM e azul de bromofenol na concentração de 0,01%. Os géis de acrilamida, na concentração de 10%, foram colocados na tina de eletroforese com tampão apropriado composto por Tris na concentração de 25 mM, glicina na concentração de 192 mM e SDS na concentração de 0,1%, com ajuste do pH a 8.3 (Bio-Rad 161-0772) e as amostras foram dispostas assim como o padrão de pesos moleculares (Precision PlusStandards, Dual Color, Bio-Rad ou NZYColour Protein Marker II, Nzytech, MB09002). A eletroforese foi constituída por uma primeira etapa de 10 minutos com uma diferença de potencial constante de 80 V e de uma segunda etapa de 80 minutos com uma diferença de potencial constante de 150 V. Para a realização da eletrotransferência, os géis foram colocados em contato direto com membranas de PVDF (membrana de fluoreto de polivinilideno, Bio-Rad) previamente ativadas em metanol. A eletrotransferência foi realizada no sistema Transfer-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a eletrotransferência, as membranas foram imediatamente bloqueadas

com solução de albumina sérica bovina (BSA, do inglês, *bovine serum albumine*) na concentração de 5% preparada em TBST (do inglês, *tris-buffered saline tween-20*), à temperatura ambiente.

Após 2 horas incubaram-se as membranas com os anticorpos primários, durante a noite, a 4°C e sob agitação constante. Para a deteção da ALDH utilizou-se o anticorpo anti-ALDH 1/2 H-8 preparado em ratinho (SC-166362, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

No dia seguinte foram realizadas 5 lavagens com TBS-T a 1%, e incubaram-se as membranas com o anticorpo secundário apropriado para o anticorpo primário, anti-ratinho (GE Healthcare, RPN5781), sob agitação constante e à temperatura ambiente durante cerca de 1 hora. As lavagens foram repetidas e as membranas foram depois incubadas com substrato enzimático (*ECF Western blotting Reagent Pack*, Amersham Biosciences, Reino Unido) durante aproximadamente 5 minutos e reveladas no leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000, Suécia). Os resultados deste estudo, foram analisados com recurso ao software ImageQuant e a expressão da ALDH foi normalizada ao veículo (solvente utilizado na diluição de cada inibidor), ao qual se atribui o valor de expressão 1. O controlo corresponde às culturas celulares não tratadas.

Protocolo de formação de esferas e derivadas aderentes diferenciadas

Atualmente, como abordagem funcional, a formação de esferas é particularmente útil para enriquecer o potencial das subpopulações de CSC, quando os marcadores de CSC não são específicos para a maioria dos tumores (Cao *et al.*, 2011).

Uma esfera consiste numa estrutura esférica e sólida que se desenvolve a partir da proliferação de uma única célula cancerígena progenitora/estaminal. Estas células crescem em meio sem soro bovino fetal, em condições não aderentes de modo a enriquecer as populações de CSC, como as únicas com capacidade de sobreviver e de proliferar neste ambiente. Geralmente, este ensaio é utilizado para se contabilizar a percentagem de CSC que constituem uma população de células tumorais (Johnson, Chen e Lo, 2013).

Em relação ao seu tamanho, este pode variar entre 50 a 250 μm e o número de esferas formadas pode ser usado para a caracterização da população de CSC dentro de uma população tumoral *in vitro* e em tumores formados *in vivo* (Johnson, Chen e Lo, 2013).

Neste trabalho obtiveram-se populações de células cancerígenas com uma conformação esférica e em suspensão, que passarão a denominar-se de esferas e populações de células derivadas das populações de esferas, que passarão a denominar-se de derivadas aderentes diferenciadas. As populações de esferas obtidas com as linhas celulares de cancro do endométrio, RL95-2 e ECC-1, passarão a ser denominadas por ESI RL95-2 e ESI ECC-1 (esferas de cancro do endométrio, do inglês *endometrial spheres*), respetivamente. As

derivadas aderentes diferenciadas, obtidas das populações de esferas das linhas RL95-2 e ECC-1, passarão a denominar-se GI RL95-2 e GI ECC-1 (gerações aderentes derivadas de esferas do endométrio, do inglês *generations of adherent derived endometrial spheres*), respetivamente.

O protocolo de formação de esferas utilizado neste trabalho foi adaptado de protocolos descritos em trabalhos anteriores (Dontu *et al.*, 2003; Ponti *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2008). Para a realização deste ensaio na linha RL95-2, as células foram cultivadas em condições não aderentes em placas de cultura em suspensão de 6 poços (Sarstedt, 83.3920.500) e frascos em suspensão (Sarstedt, 83.1813.500) revestidos com poli(2-hidroxietil-metacrilato) (poli-hema, Sigma, P3932). O meio de cultura utilizado foi constituído por DMEM e pela mistura de nutrientes de Ham F12 numa proporção de 1:1, bicarbonato de sódio (Fisher Chemical, S/4240/60) e metilcelulose (AlfaAesar, 45490) na concentração de 1%, e foi suplementado com putrescina na concentração de 100 µM (Sigma, P5780), insulina-transferrina-selénio-A (Gibco, 51300-044) na concentração de 1% e albumina sérica bovina na concentração de 4% (Nzytech, MB04602).

Para a realização deste ensaio na linha celular ECC-1, as células foram cultivadas em condições não aderentes em placas de cultura em suspensão de 6 poços revestidas com poli-hema. Na cultura celular, utilizou-se meio de cultura constituído por DMEM e pela mistura de nutrientes de Ham F12 numa proporção de 1:1 e por metilcelulose na concentração de 1%. O meio de cultura foi suplementado com putrescina a uma concentração de 100 µM e insulina-transferrina-selénio-A na concentração de 1%.

As esferas, obtidas de ambas as linhas celulares, foram suplementadas com fatores de crescimento, nomeadamente, o fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês *epidermal growth factor*, Sigma, E9644) e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF, do inglês *fibroblast growth factor basic*, Sigma, F0291), na concentração de 10 ng/mL, de 48 em 48 horas. As primeiras gerações de esferas obtiveram-se após 5 dias. As primeiras gerações de células derivadas aderentes de esferas, foram obtidas através da cultura das esferas, em modo aderente, em condições padrão da linha celular.

Para a avaliação da inibição da enzima ALDH, obtiveram-se populações de esferas de ambas as linhas celulares de cancro do endométrio, RL95-2 e ECC-1, sob a influência do inibidor DEAB.

Após a distribuição das suspensões celulares e do estabelecimento do protocolo de formação de esferas, foi adicionado o inibidor DEAB na concentração de 100 µM, a ambas as linhas celulares. O inibidor permaneceu no meio de cultura durante os 5 dias de duração do protocolo de formação de esferas.

Capacidade de formação de esferas

De modo a avaliar a aptidão que uma célula proveniente de uma população aderente possui para, de forma isolada, originar esferas, realizou-se o ensaio de capacidade de formação de esferas (Laranjo *et*

et al., 2018). Para a realização do ensaio, as células RL95-2 e ECC-1, foram distribuídas na concentração de 1×10^6 células por frasco de cultura em suspensão, previamente revestidos com poli-hema, em 6 mL de meio de cultura, conforme descrito no protocolo de formação de esferas. Este ensaio foi igualmente realizado nas esferas, de ambas as linhas celulares, sob influência do inibidor DEAB na concentração de 100 μ M.

Após 5 dias de protocolo, o número de esferas por frasco foi quantificado, com recurso a um hemocítmetro. Para este ensaio, consideram-se todos os grupos de células compactadas, de forma esférica e com densidade elevada, em suspensão e com um diâmetro superior a 40 μ m.

A capacidade de formação de esferas foi calculada através da Equação 1.

$$\text{Capacidade de formação de esferas (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de Esferas formadas}}{\text{N}^\circ \text{ de células aderentes distribuídas}} \times 100$$

Equação 1

Capacidade de autorrenovação

O ensaio de autorrenovação de esferas permite avaliar a aptidão que as células provenientes de esferas possuem para originarem novas esferas em suspensão, idênticas às esferas que as originaram (Laranjo *et al.*, 2018).

Para este ensaio, as populações de ESI RL95-2 e de ESI ECC-1, bem como as populações ESI RL95-2 e ESI ECC-1 obtidas sob influência da ação do DEAB, na concentração supramencionada, foram submetidas à tripsina de modo a obter células individualizadas em suspensão celular. As suspensões celulares obtidas foram distribuídas em placas de cultura de 6 poços em suspensão revestidas previamente com poli-hema, num volume de 3 mL por poço, a uma concentração celular máxima de 8×10^4 células por mL de meio de cultura usado no protocolo de formação de esferas, descrito anteriormente. Após 8 dias, consideraram-se todos os grupos de células esféricas, com densidade e compactadas e com um diâmetro superior a 40 μ m, com recurso a um hemocítmetro. A capacidade de autorrenovação foi calculada através da equação 2.

$$\text{Capacidade de autorrenovação (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de Esferas}}{\text{N}^\circ \text{ de células de esferas distribuídas}} \times 100$$

Equação 2

Área de projeção ocupada pelas esferas

A avaliação da área de projeção de esferas foi realizada através da quantificação da área média das esferas por plano (Laranjo *et al.*, 2018). Neste ensaio, as culturas celulares foram distribuídas em placas de

cultura de 6 poços ou em frascos em suspensão, previamente revestidos com poli-hema, em condições descritas anteriormente no protocolo de formação de esferas. No final do protocolo, as esferas obtidas, com e sem influência da concentração de 100 µM do inibidor DEAB, foram fotografadas com uma ampliação de 200x, em 10 campos aleatórios de cada poço ou frasco. Neste ensaio, utilizou-se um microscópio invertido (Nikon, Eclipse TS 100, Japão) com uma câmara Moticam 1080 e as esferas foram fotografadas com recurso ao software Motic Images Plus 3.0. A análise das fotografias foi realizada com o software Image J, através da delimitação da área das esferas, obtendo-se a área total em pixéis de cada poço ou frasco.

Tempo de duplicação

O tempo de duplicação de uma linha celular é um parâmetro de avaliação relevante, na medida em que, tratando-se de células cancerígenas, a velocidade de replicação e de propagação que apresentam é elevada. O tempo de duplicação foi calculado para as populações aderentes RL95-2 e GI RL95-2. Neste ensaio, as suspensões celulares foram distribuídas na concentração de 1×10^6 células em frascos de cultura aderente. A contagem do número de células total dos frascos foi realizada após 48 horas e o tempo de duplicação foi calculado através da Equação 3.

$$\text{Tempo de duplicação (horas)} = \text{Tempo de incubação} \times \left[\frac{\ln 2}{\ln \frac{N^{\circ} \text{ de células final}}{N^{\circ} \text{ de células inicial}}} \right]$$

Equação 3

Ensaio clonogénico

A eficiência clonogénica é definida como a capacidade que uma célula possui para formar uma colónia com 50 ou mais células em condições adequadas ao seu crescimento (Laranjo *et al.*, 2018).

Para avaliar a eficiência clonogénica das esferas obtidas das linhas celulares ECC-1 e RL95-2, denominadas ESI ECC-1 e ESI RL95-2, e das esferas submetidas à ação do inibidor DEAB na concentração de 100 µM, as suspensões celulares foram distribuídas em placas de cultura de 6 poços em condições aderentes na concentração de 1×10^3 células por poço. Após 12 dias, contabilizaram-se as colónias formadas. A eficiência clonogénica foi calculada através da equação 4.

$$\text{Eficiência clonogénica (\%)} = \frac{N^{\circ} \text{ de colónias contadas}}{N^{\circ} \text{ de células distribuídas por poço}} \times 100$$

Equação 4

Após 12 e 15 dias de incubação a 37°C numa incubadora, respetivamente, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com PBS. Posteriormente, adicionou-se cerca de 1 mL de metanol a 100% (Fisher Chemical, M/4000/FP21) por poço, e deixou-se a incubar à temperatura ambiente durante 15 minutos. O metanol foi descartado e adicionaram-se 2 mL de violeta de cristal a 0,5% em metanol, deixando-se à temperatura ambiente durante 15 minutos. Após este período, as placas foram bem lavadas com água para retirar o excesso de corante e deixaram-se secar à temperatura ambiente. Posteriormente, contaram-se as colónias coradas e calculou-se a eficiência clonogénica das populações.

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que utiliza um dispositivo de deteção ótico e eletrónico que realiza a medição simultânea de múltiplas características físicas e químicas de partículas microscópicas através de fluorescência. Estas partículas microscópicas são conjugadas com sondas ou com marcadores fluorescentes que, quando excitadas, emitem luz de menor frequência do que a fonte de luz. A luz emitida, captada pelos sensores, é analisada de acordo com as alterações do brilho de cada sensor e/ou da emissão de fluorescência. Este processo, resulta na formação de imagens em tempo real da fluorescência, dispersão e transmissão da luz, de cada célula. Esta técnica permite a medição de expressão de proteínas específicas e de ácidos nucleicos através de corantes fluorescentes e de anticorpos, do tamanho intrínseco e granularidade da célula, alterações de pH, tipos de morte celular, potencial de membrana mitocondrial, viabilidade celular, formação de espécies reativas de oxigénio, defesas antioxidantes, entre outros (Krishan *et al.*, 2001; Errante *et al.*, 2015; Serambeque, 2015).

Neste trabalho, esta técnica foi utilizada para análise da expressão de marcadores associados à estaminalidade das células cancerígenas, nomeadamente os marcadores CD24, CD44 e CD133. Estes marcadores, são comumente expressos por diversos tumores sólidos, como tumores da mama, do cérebro, colorretal e do endométrio (Sun *et al.*, 2017).

Para a realização deste ensaio, foram preparadas suspensões celulares com 1×10^6 células das populações RL95-2, G1 RL95-2, ESI RL95-2, ESI RL95-2 sob influência do DEAB, ESI ECC-I e ESI ECCI sob influência do inibidor, à concentração de 100 μ M. As células de cada população endometrial foram lavadas com PBS, de modo a retirar todo o meio de cultura, foram centrifugadas a 300 xG durante 5 minutos e colocaram-se em cerca de 500 μ L de PBS. De seguida, adicionaram-se os anticorpos, anti-CD24 marcado com alofocianina-H7 (APC-H7 Clone ML5; BD Biosciences), anti-CD44 marcado com *pacific blue* (PB; Biolegend, 103020) e CD133 marcado com alofocianina (APC; Miteny Biotec 293C3-APC) e incubaram-se durante 10 minutos à temperatura ambiente, e no escuro. A análise foi efetuada num citómetro FACS-Canto II (BD, San

José, C.A.A.) com o software FACSDiva (BD, San José, C.A.). Os resultados foram apresentados em média de intensidade de fluorescência expressos em unidades de fluorescência e representados por histograma para o marcador CD133 e em *Plot* para os marcadores CD24 e CD44.

Expressão da ALDH e da P53

Para os estudos de avaliação de expressão da ALDH e da P53, nas populações de RL95-2, derivadas aderentes de RL95-2, esferas obtidas de RL95-2 e de ECC-1, bem como as esferas de RL95-2 e de ECC-1 obtidas sob influência do inibidor DEAB, recorreu-se à técnica de *Western blot*, descrita anteriormente.

A eletroforese dos géis de poliacrilamida, na concentração de 10%, das proteínas P53 e ALDH foi constituída por uma primeira etapa de 10 minutos com uma diferença de potencial constante de 80 V e de uma segunda etapa de 80 minutos com uma diferença de potencial constante de 150 V. Para a deteção das proteínas de interesse utilizaram-se os anticorpos: anti-P53 (D07) preparado em ratinho (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-47698) e anti-ALDH 1/2 H-8 preparado em ratinho (SC-166362, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). O anticorpo secundário usado foi anti-ratinho (GE Healthcare, RPN5781). Os resultados foram analisados com recurso ao software ImageJ.

Análise estatística

A análise estatística aos resultados deste capítulo foi realizada com recurso ao software *IBM® SPSS® Statistics* versão 23. Na análise descritiva foram determinados valores de tendência central e de dispersão. Os resultados das variáveis quantitativas descritas ao longo do manuscrito foram expressos sob a forma de média \pm erro padrão.

Nos estudos de capacidade de formação de esferas, área de projeção de esferas, expressão de CD133, de CD44 e de CD24 procedeu-se à comparação entre as populações celulares de um fator com recurso ao teste ANOVA após verificação de distribuição normal e homogeneidade de variâncias. Em casos onde se verifica o contrário, recorreu-se ao teste de Kruskal-Wallis. Posteriormente, foram realizadas comparações múltiplas entre os grupos experimentais.

Nos valores obtidos com os estudos de *Western blot*, relativos à expressão de ALDH e de P53, as comparações foram realizadas com recurso ao teste de *t-Student* para a média e utilizou-se o valor de normalização I. Na avaliação da atividade metabólica, as comparações foram feitas com recurso ao teste de *t-Student* para a média.

As comparações múltiplas foram retificadas segundo o método de Bonferroni e considerou-se um valor de significância de 5% para todas as comparações.

Resposta à terapêutica

Quimioterapia

A linha celular RL95-2, a população de esferas ESI RL95-2 e a população de derivadas aderentes diferenciadas GI RL95-2, foram cultivadas em condições adequadas, descritas anteriormente, e foram submetidas ao paclitaxel, carboplatina e doxorrubicina, antineoplásicos usados na prática clínica para o tratamento do cancro do endométrio, com o objetivo de se avaliar a resposta à terapêutica convencional.

Os fármacos utilizados nestes estudos foram gentilmente cedidos pelos Serviços Farmacêuticos do CHUC.

Para a realização dos estudos de avaliação de resposta à terapêutica, foram preparadas diluições adequadas dos fármacos paclitaxel na concentração de 6 mg/mL, carboplatina na concentração de 10 mg/mL e doxorrubicina na concentração de 2 mg/mL, para a administração de cerca de 1% de volume de fármaco relativamente ao volume total de meio de cultura das culturas celulares.

As concentrações de fármaco utilizadas foram de 0,3 μ M, de 0,6 μ M e de 1,2 μ M para o paclitaxel, de 200 μ M e de 500 μ M para a carboplatina e de 0,05 μ M, de 0,3 μ M e de 7,3 μ M para a doxorrubicina e os tempos de incubação variaram entre as 24 e as 72 horas. Estas concentrações foram determinadas através de ensaios de citotoxicidade, realizados no grupo anteriormente, na linha celular de cancro do endométrio, ECC-1.

Atividade metabólica

Os estudos de citotoxicidade foram realizados em populações celulares de RL95-2, de ESI RL95-2 e de GI RL95-2, submetidas ao tratamento de quimioterapia com os fármacos paclitaxel, carboplatina e doxorrubicina.

A avaliação da atividade metabólica das populações de RL95-2, de ESI RL95-2 e de GI RL95-2 foi realizada através do ensaio de Alamar Blue[®]. A resazurina, um corante indicador de reações de oxidação-redução, utilizado neste ensaio, permite avaliar a atividade metabólica celular. A conversão da forma oxidada para a forma reduzida é acompanhada pela alteração da cor azul para rosa e pode ser quantificada por espectrofotometria (Carvalho, 2015).

Para estes estudos prepararam-se suspensões celulares das células de RL95-2 e de GI RL95-2 com 8×10^4 células/mL que se distribuíram por placas de cultura de 48 poços e que se incubaram durante 24 horas de forma a permitir a adesão das células. Nas populações de esferas ESI RL95-2, realizou-se o protocolo de formação de esferas, como descrito anteriormente. Após o término do protocolo, as esferas

foram distribuídas em placas de 96 poços. Posteriormente, administraram-se os fármacos nas concentrações acima descritas. A avaliação da citotoxicidade foi realizada após 24, 48 e 72 horas de incubação com os fármacos.

Para esta avaliação, foi adicionado o reagente Alamar Blue[®] a cada poço, de modo a obter uma concentração de 10% no poço, e incubou-se no escuro a 37°C até se verificar uma alteração significativa da cor do corante. O conteúdo dos poços foi transferido para placas de 96 poços, que foi lida num espectrofotómetro Biotek[®] Synergy HT a 570nm e a 600nm.

A avaliação da atividade metabólica nas populações celulares RL95-2 e GI RL95-2 submetidas a tratamento foi, também, realizada através do ensaio de MTT, descrito anteriormente. A concentração das suspensões celulares, as condições das culturas celulares bem como as concentrações de fármacos usadas e os tempos de incubação são semelhantes aos descritos acima para o ensaio de Alamar Blue[®].

Morte celular e resistência à terapêutica

Para a identificação das vias de morte celular envolvidas nas populações do endométrio submetidas ao tratamento com os citostáticos carboplatina, paclitaxel e doxorrubicina realizou-se uma avaliação dos níveis endógenos de caspase 3 clivada através do Kit PathScan[®] Cleaved Caspase-3 Sandwich ELISA, assim como a avaliação da expressão das proteínas ALDH e P53 por *Western Blot*.

Morte celular

Para a avaliação dos níveis de caspase 3 clivada nas populações tumorais do endométrio, RL95-2, ESI RL95-2, GI RL95-2, ECC-1, ESI ECC-1 e GI ECC-1, submetidas a tratamento com carboplatina na concentração de 500 μ M, com paclitaxel na concentração de 0,3 μ M e com doxorrubicina na concentração de 0,3 μ M, durante 24 horas, recorreu-se ao Kit PathScan[®] Cleaved Caspase-3 Sandwich ELISA.

A primeira etapa consistiu na preparação de lisados celulares, de todas as populações tumorais em estudo. Para as populações aderentes, RL95-2, GI RL95-2, ECC-1 e GI ECC-1, as suspensões celulares foram distribuídas em frascos de cultura de 75 cm² e quando os frascos atingiram cerca de 90% de confluência, foram submetidas a tratamento, durante 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi removido e foi realizada uma lavagem com PBS a 4°C. O PBS foi removido e adicionaram-se 500 μ L de *Cell Lysis Buffer* /x, suplementado com 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF, do inglês *phenylmethanesulfonyl fluoride*) e os frascos foram incubados em gelo, durante 5 minutos. Posteriormente, as células foram destacadas dos frascos com recurso a um raspador e transferiram-se as células para tubos apropriados, que foram mantidos em gelo. Nas populações em suspensão, ESI RL95-2 e ESI ECC-1, as suspensões celulares foram distribuídas

para a realização do protocolo de formação de esferas, nas condições descritas anteriormente. Após o término do protocolo, as esferas foram submetidas a tratamento com os citostáticos, durante 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi removido através de uma suave centrifugação a cerca de 1200 rpm e foi realizada uma lavagem com PBS a 4°C. As suspensões foram novamente centrifugadas e adicionaram-se 2 mL de *Cell Lysis Buffer 1x*, suplementado com 1 mM de PMSF. Posteriormente, todos os lisados celulares foram sonicados, mantidos sempre em gelo, e foram centrifugados a cerca de 14000 rpm, durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos apropriados e armazenados a -80 °C.

Para a realização do ensaio, foram seguidas todas as recomendações do fornecedor. Os lisados celulares foram diluídos até se obter a concentração proteica de 0,8 mg/mL, com recurso ao *Sample Diluent*.

A placa de 96 poços, fornecida pelo *kit*, foi deixada à temperatura ambiente durante uns minutos e posteriormente, adicionaram-se 100 µL de cada lisado celular, selou-se a placa e deixou-se a incubar *overnight*, a 4°C. No dia seguinte, descartou-se gentilmente o conteúdo da placa e realizaram-se 4 lavagens com *Wash Buffer 1x*, adicionando-se 200 µL a cada poço. De seguida, adicionaram-se 100 µL de anticorpo de deteção, selou-se a placa e foi deixada a incubar durante 1 hora a 37 °C. O processo de lavagem foi repetido. Adicionaram-se 100 µL de anticorpo secundário, selou-se a placa e deixou-se a incubar durante 30 minutos a 37 °C. Realizou-se novamente o processo de lavagens. Posteriormente, adicionaram-se 100 µL de substrato TMB a cada poço, a placa foi selada e realizou-se uma incubação de 10 minutos a 37 °C. Adicionaram-se 100 µL de solução STOP e agitou-se a placa gentilmente durante alguns segundos. A leitura da absorvância foi feita com o comprimento de onda de 450nm.

Western blot

Para os estudos de avaliação de expressão das proteínas ALDH e P53, nas populações celulares submetidas à terapêutica, recorreu-se à técnica de *Western Blot*, como descrito anteriormente.

As populações celulares RL95-2, ESI RL95-2 e GI RL95-2 foram submetidas a tratamento com os fármacos de quimioterapia carboplatina, paclitaxel e doxorrubicina, nas concentrações de 500 µM e de 0,3 µM, respetivamente, durante 24 horas. Posteriormente, foram realizados extratos de proteína total das populações submetidas a tratamento e extratos controlo, com células de todas as populações não submetidas a tratamento. Os resultados foram analisados com recurso ao software ImageJ.

Danos no DNA

A medicina personalizada compreende uma terapêutica para cada doente individualmente, onde a previsão da resposta às diferentes abordagens terapêuticas é um fator importante quando se trata do

tratamento de tumores malignos. A eletroforese de células singulares, também conhecida como ensaio cometa, consiste numa técnica de medição de danos do DNA em células eucarióticas individuais. O princípio do ensaio cometa é que o DNA não fragmentado mantém uma estrutura bem organizada no núcleo, o que não acontece quando a célula está danificada. Esta técnica, que deteta quebras em cadeias de DNA simples e duplas, é relativamente simples de efetuar e não é muito dispendiosa, o que torna o ensaio numa boa técnica de previsão de resposta a tratamentos com fármacos que afetam a estrutura do DNA (Apostolou *et al.*, 2014).

O ensaio cometa foi realizado na linha celular RL95-2, nas esferas ESI RL95-2 e nas derivadas aderentes GI RL95-2 de modo a avaliar as consequências do tratamento com o paclitaxel na concentração de 0,3 μM , com a carboplatina na concentração de 500 μM e com a doxorubicina na concentração de 0,3 μM após 24 horas de incubação com os fármacos.

Esta técnica consiste numa eletroforese em microgel de agarose que permite avaliar os danos no DNA provocados pela exposição aos fármacos. Após coloração, as células ficam com aspeto de cometa, em que a cabeça representa o núcleo e a cauda representa os fragmentos de DNA que migraram, cujo comprimento é proporcional à extensão dos danos.

O procedimento iniciou-se com o revestimento de lâminas de vidro (Star Frost, Alemanha) com agarose Wide Range na concentração de 1% (Sigma A2790). As células foram centrifugadas a 500 xG durante 5 minutos e foram preparadas suspensões celulares de 500 μL de PBS com 10×10^4 células. A estas suspensões celulares adicionaram-se 500 μL de agarose de baixo ponto de fusão (Sigma A9414) na concentração de 1%, homogeneizaram-se as suspensões celulares obtidas com a solução de agarose e colocaram-se cerca de 500 μL sobre as lâminas já revestidas. Após a solidificação da agarose de baixo ponto de fusão, submergiram-se as lâminas em solução de lise constituída por 2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Trizma Base (JMS - 20360000BPI52112), 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO (Fisher Chemical, 200-664-3), durante a noite a 4°C, para degradar os compartimentos celulares. Após este tempo de incubação, as lâminas foram colocadas em tampão de eletroforese, constituído por 300 mM de NaOH e de 1mM de EDTA, com pH superior a 13, durante uma hora, para a aquisição de ambiente alcalino. Posteriormente, foi realizada uma eletroforese a uma diferença de potencial de 25 V e uma corrente de 1000 mA durante 15 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram submetidas a uma solução de neutralização constituída por 0,4 M de Trizma Base, com pH de 7,5 e, de seguida, coradas com brometo de etídeo na concentração de 1 mg/mL. As lâminas foram deixadas a secar durante algumas horas (Carvalho, 2015).

As lâminas foram observadas num microscópio Motic AE31 equipado com sistema de epifluorescência Motic AE31 EF-INV-II. As imagens foram adquiridas com uma câmara Moticom Pro 285A num computador

com o software Motic Images Advanced 3.2 para a obtenção de pelo menos 100 exemplares de cometas para cada condição em estudo.

Todas as imagens adquiridas foram processadas com o software CometScore™ 1.5 (TriTek Corp.), que analisa diversos parâmetros em cada cometa individualmente, como o comprimento, a área, a percentagem de DNA e o momento da cauda. Neste estudo, o parâmetro alvo foi o momento da cauda que representa o produto do comprimento da cauda com a percentagem de DNA na cauda.

Análise estatística

A análise estatística aos resultados deste capítulo foi realizada com recurso ao software *IBM® SPSS® Statistics* versão 23. Na análise descritiva foram determinados valores de tendência central, dispersão e localização. Os resultados das variáveis quantitativas descritas ao longo do manuscrito foram expressos sob a forma de média \pm erro padrão.

Nos estudos de avaliação da atividade metabólica procedeu-se à comparação entre as populações celulares de um fator com recurso ao teste ANOVA após verificação de distribuição normal e homogeneidade de variâncias. Em casos onde se verifica o contrário, recorreu-se ao teste de Kruskal-Wallis. Posteriormente, foram realizadas comparações múltiplas entre os grupos experimentais.

Nos valores obtidos com os estudos de *Western blot*, relativos à expressão de ALDH e de P53, as comparações foram realizadas com recurso ao teste de *t-Student* para a média e utilizou-se o valor de normalização 1.

A comparação entre condições no ensaio cometa foi realizada com recurso ao teste de Kruskal-Wallis. Foram realizadas comparações múltiplas entre os grupos experimentais.

As comparações múltiplas foram retificadas segundo o método de Bonferroni e considerou-se um valor de significância de 5% para todas as comparações.

Parte II — Estudo translacional

Caracterização das CSC do endométrio

Neste estudo pretendeu-se otimizar os métodos de isolamento de uma população de CSC de tumores do endométrio, através do protocolo de esferas. Esta população tem sido alvo de estudo dado o papel importante na iniciação tumoral, na progressão, na disseminação e na resistência à terapêutica. Neste sentido, o objetivo foi a caracterização das populações com propriedades de CSC obtidas de amostras humanas de cancro do endométrio e a avaliação da inibição da ALDH.

O Banco de Tumores do CHUC, com aprovação pela Comissão de Ética para a Saúde dos CHUC e pela Comissão Nacional de Proteção de Dados, é a fonte das amostras endometriais de doentes seguidas no Serviço de Ginecologia da instituição.

Isolamento de CSC

O processamento das amostras tumorais de endométrio tem como finalidade o isolamento de uma população de CSC do endométrio, através do protocolo de formação de esferas e a caracterização destas células tumorais. Neste sentido, realizaram-se várias tentativas de otimização de procedimentos para o isolamento de uma população de CSC de amostras de tumores endometriais, com base em procedimentos descritos na literatura.

Durante o curso deste projeto foram rececionadas 18 amostras de doentes com cancro do endométrio, entre novembro de 2016 e março de 2018. As amostras foram denominadas por TE (tumor endometrial), seguidas pela numeração correspondente à ordem de receção.

O procedimento usado para o isolamento celular das amostras TE-15 e TE-16, foi adaptado de (Masuda *et al.*, 2016). As amostras foram colhidas e transportadas em meio de cultura, passando a denominar-se meio de transporte, composto por DMEM e da mistura de nutrientes de Ham F12 numa proporção de 1:1, suplementado com 10% de FBS e antibiótico na concentração de 2%. No laboratório, as amostras foram fragmentadas em pedaços mais pequenos com um bisturi. Os fragmentos das amostras, foram submetidos a uma digestão enzimática, com uma solução constituída por meio de cultura composto por DMEM e da mistura de nutrientes de Ham F12 numa proporção de 1:1, suplementado com 10% de FBS e antibiótico na concentração de 1%, com 1 mg/mL de colagenase do tipo IV (Gibco, 17104-019) e 0,1 mg/mL de DNase I (Roche, 11284932001), até 180 minutos a 37°C em agitação. De 15 em 15 minutos, a solução enzimática foi repostada e a solução recolhida foi filtrada através de um *cell strainer* de 40 µm (BD Falcon, 352340) para um falcon com meio de transporte, mantido à temperatura ambiente. Simultaneamente, a

cada recolha da solução, foi verificada a viabilidade celular através do método de exclusão do azul de tripano. Após o período de incubação, a solução recolhida total, foi centrifugada a cerca de 200G durante 10 minutos. Do *pellet* desta centrifugação resultou a fração estromal que posteriormente foi guardada em meio de cultura à temperatura ambiente. De seguida, os fragmentos da amostra que restaram no final da primeira digestão enzimática, foram colocados numa solução constituída por 3 mL de Acutase (StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent, Thermofisher, A11105-01) e 3 mL de tripsina-EDTA na concentração de 0,25% durante 10 minutos em agitação, à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionaram-se cerca de 30 mL de meio de cultura à solução, que foi filtrada através de um *cell strainer* de 40 µm e centrifugada a cerca de 200G durante 5 minutos. Do *pellet* desta centrifugação resultou a fração epitelial que posteriormente foi guardada em meio de cultura à temperatura ambiente. Combinaram-se as frações estromal e epitelial e, após a contagem de células viáveis através do método do azul tripano, cultivou-se parte da suspensão celular em frascos revestidos com colagénio A (Merck Millipore, L 7220) em meio de cultura, composto por DMEM e da mistura de nutrientes de Ham F12 numa proporção de 1:1, suplementado com 10% de FBS e antibiótico na concentração de 1%, para a obtenção de culturas primárias de explantes. A parte sobrança da suspensão celular foi distribuída em placas de cultura de 6 poços em suspensão revestidas previamente com poli-hema, num volume de 3 mL por poço a uma concentração celular máxima de 8×10^4 células/mL. O meio de cultura foi suplementado, a cada 48 horas, com os fatores de crescimento, EGF e bFGF, ambos na concentração de 10 ng/mL.

Inibição da ALDH

Para o estudo da inibição da enzima ALDH, foi realizado um protocolo de formação de esferas da TE 15 sob influência da ação do inibidor DEAB na concentração de 100 µM. Na avaliação das esferas obtidas foram realizados estudos de capacidade de autorrenovação e de área de projeção ocupada pelas esferas, conforme descrito anteriormente na secção CSC do endométrio: avaliação da inibição da aldeído desidrogenase.

Resposta personalizada à quimioterapia

As CSC têm sido referidas como a população responsável pela resistência ao tratamento e consequentemente pela recidiva do tumor. A resposta ao tratamento tem grande implicação no prognóstico e é objetivo otimizar uma plataforma para estudar a resposta individualizada.

Neste estudo, o objetivo foi a avaliação da resposta das amostras tumorais do endométrio aos citostáticos usados no tratamento de doentes com cancro do endométrio, nomeadamente a carboplatina, o

paclitaxel e a doxorrubicina. Estes resultados serão correlacionados com os dados clínicos de cada doente, particularmente o tipo histológico, o estadiamento cirúrgico e o grau do tumor.

A estratégia de avaliação da resposta à terapêutica adotada foi baseada no trabalho de Gerlach e colaboradores (Gerlach *et al.*, 2014), cuja avaliação se efetuou através da incubação de secções das amostras tumorais do endométrio com os citostáticos.

As amostras foram colhidas e transportadas em meio de cultura, composto por DMEM e da mistura de nutrientes de Ham F12 numa proporção de 1:1, suplementado com 10% de FBS e 2% de antibiótico. Posteriormente, efetuou-se uma lavagem com PBS com 2% de antibiótico. Inicialmente, tentou-se a abordagem utilizada por Gerlach e colegas, onde se usou um vibrátomo para sectionar as amostras. No entanto, devido à consistência das amostras endometriais houve a necessidade de se modificar o procedimento, utilizando um método de inclusão em agarose. Preparou-se agarose *Low Melting Point* a uma concentração de 3% e incluíram-se as amostras na agarose e em meio de cultura numa proporção de 1:1 a 37°C, deixando a solidificar durante alguns minutos, à temperatura ambiente. Após a solidificação, a amostra foi sectionada em 4 fragmentos, e posteriormente, três fragmentos foram incubados com os citostáticos, doxorrubicina na concentração de 7,5 µM, carboplatina na concentração de 500 µM e paclitaxel na concentração de 1,5 µM, servindo o quarto fragmento como controlo (secção sem tratamento). A incubação com os fármacos foi realizada em placas de cultura de 24 poços, durante 24 horas. Após o tempo de incubação, os diferentes fragmentos da amostra foram colocados em formol tamponado e fixadas em formalina a 4% durante um período de 24 a 48 horas, impregnadas em blocos de parafina devidamente rotulados e posteriormente submetidas a cortes com 4 µm de espessura e corados pela Hematoxilina & Eosina (H&E). O estudo imunohistoquímico foi realizado no bloco de parafina respetivo, tendo sido efetuado numa plataforma Ventana Bench Mark ULTRA IHC/ISH, com recurso a um sistema de deteção indireto e multimétrico, livre de biotina e conjugado com peroxidase, em lâminas com cortes de 4-5 µm de espessura com recurso aos seguintes anticorpos: Aldeído desidrogenase (ALDH, Biotechnology, Cambridge, ab50581 UK, CA), Beta catenina 120 (NCH-38, Dako, CA-USA), P53 (DO-7, Ventana, AZ-USA), CD133 (3F10, NBP2-37741, Novus Bio), Caspase 3 (AHP2285, Bio Rad) e Ki67 (30-9, Ventana, AZ-USA).

A observação microscópica da avaliação histológica foi realizada num microscópio Nikon eclipse 50i equipado com câmara digital Nikon Digital Sight DS-Fil. O processamento das amostras, o seu exame macroscópico e a análise histológica das lâminas foram realizados no Serviço de Anatomia Patológica do CHUC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte I — Estudo fundamental

Caracterização das células tumorais do endométrio

Na caracterização das células tumorais do endométrio, na RL95-2 foi avaliada a capacidade de formação de esferas, a autorrenovação, a área de projeção e a eficiência clonogénica das esferas. Nas populações aderentes, que incluem a linha parental e derivadas aderentes diferenciadas, foi determinado o tempo de duplicação. A expressão de marcadores de células estaminais, ALDH e P53 foi avaliada em todas as populações.

Na Figura 8, estão representados os resultados obtidos. Na secção A, podemos observar uma população de esferas obtida da linha celular RL95-2, através do protocolo de esferas. As esferas obtidas apresentaram uma estrutura esférica com algumas irregularidades no contorno, com elevada densidade celular e com tamanhos variáveis. As populações de esferas, quando colocadas em condições de cultura aderente, originaram populações em monocamada com um fenótipo semelhante à linha parental. As células RL95-2, apresentaram uma capacidade de formação de esferas de $1,12 \pm 0,16\%$ (secção B) e as células dissociadas das esferas apresentaram uma capacidade de autorrenovação de $32,44 \pm 4,77\%$ (secção C). As ESI RL95-2 apresentaram uma área de projeção de $4,65 \times 10^5 \pm 1,58 \times 10^4$ pixéis (secção D). As células com propriedades de CSC, quando colocadas em condições aderentes, não apresentaram eficiência clonogénica. O tempo de duplicação determinado para as células da linha celular foi de $53,21 \pm 5,20$ horas e para as derivadas aderentes foi de $107,62 \pm 18,67$ horas (secção E). A avaliação dos marcadores de células estaminais, incluiu os marcadores CD133, CD24 e CD44. Neste estudo, foram identificadas quatro populações distintas, nomeadamente $CD44^+/CD24^-$, $CD44^{débil}/CD24^-$, $CD44^{débil}/CD24^\pm$ e $CD44^-/CD24^+$ em cada condição em estudo. Na secção F, está descrita a distribuição percentual das populações $CD44^-/CD24^+$ nas células tumorais do endométrio. A população descrita como marcador de CSC, $CD44^+/CD24^-$, na linha RL95-2 corresponde a $12,22 \pm 4,81\%$, nas derivadas aderentes esta população corresponde a $10,00 \pm 2,28\%$ e nas esferas apresenta um aumento, correspondendo a $37,13 \pm 3,83\%$.

A marcação global de CD133 nas esferas, representada na secção G, apresentou uma média de intensidade de fluorescência de $168,50 \pm 7,26$ na população $CD44^+/CD24^-$, superior à apresentada pela linha parental e pelas derivadas aderentes, $98,50 \pm 18,19$ e $139,33 \pm 26,90$, respetivamente.

Os histogramas da expressão de CD133 estão representados na secção H. A análise da expressão de $CD44^-/CD24^+$ está representada na secção I. A expressão da ALDH das esferas da linha RL95-2 e das suas derivadas aderentes, está representada na secção J. O valor da expressão desta enzima foi de $1,31 \pm 0,45$ nas esferas e de $0,54 \pm 0,08$ nas derivadas aderentes. Nas esferas ESI RL95-2, a expressão da P53 revelou

estar diminuída em relação às células RL95-2, apresentando um valor de $0,45 \pm 0,06$. Também as derivadas aderentes apresentaram uma diminuição da expressão desta proteína comparativamente com a linha celular, apresentando um valor de $0,63 \pm 0,12$ (secção K).

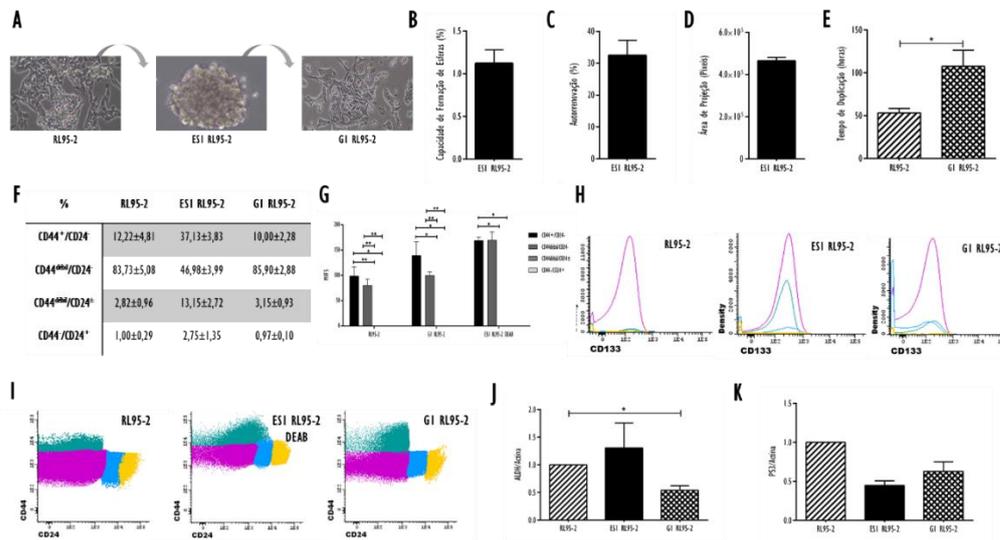


Figura 8 - Caracterização das células tumorais do endométrio. (A) - Imagem das linhas celulares RL95-2 e ECC-1, de uma população de esferas, ESI RL95-2 e ESI ECC-1, e de uma população derivada aderente diferenciada, GI RL95-2 e GI ECC-1. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 100x, em RL95-2 e GI RL95-2, e com uma ampliação de 200x, em ESI RL95-2. (B) - Capacidade de formação de esferas da linha RL95-2. Os resultados apresentados representam a média e o erro padrão de pelo menos sete ensaios independentes. (C) - Capacidade de autorrenovação de esferas de RL95-2. Os valores apresentados representam a média e o erro padrão de pelo menos sete ensaios independentes. (D) - Área média ocupada pelas esferas de RL95-2. Os resultados apresentados exprimem a média do número de píxeis e o erro padrão de pelo menos 120 imagens por cada condição obtidas em pelo menos quatro ensaios independentes. (E) - Tempo de duplicação apresentado pela linha celular RL95-2 e pelas derivadas aderentes GI RL95-2. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de três ensaios. (F) - Percentagem de células de cada população tumoral do endométrio pelas populações CD44⁺/CD24⁻, CD44^{dim}/CD24⁻, CD44^{dim}/CD24[±] e CD44⁺/CD24⁺. Os valores exprimem a média e o erro padrão de pelo menos duas experiências independentes em duplicado. (G) - Expressão de CD133 na linha RL95-2, ESI RL95-2 e GI RL95-2. Os valores apresentados exprimem a média de intensidade de fluorescência e o erro padrão de pelo menos dois ensaios independentes em duplicado. (H) - Histogramas representativos da marcação de CD133 nas células RL95-2, ESI RL95-2 e GI RL95-2. As linhas verde, rosa, azul e amarela correspondem às populações CD44⁺/CD24⁻, CD44^{dim}/CD24⁻, CD44^{dim}/CD24[±] e CD44⁺/CD24⁺, respetivamente. (I) - Plots representativos da marcação de CD44/CD24 nas populações tumorais do endométrio de um dos ensaios. O código de cores, corresponde ao descrito para a secção H. (J) - Expressão da ALDH na linha celular RL95-2, nas esferas ESI RL95-2 e nas derivadas aderentes GI RL95-2. Os valores apresentados correspondem à razão entre as intensidades de fluorescência da ALDH e da β -actina. Os gráficos representam a alteração relativamente à linha celular RL95-2 (razão ALDH/actina do controlo igual a 1). Os resultados apresentados correspondem à média e ao erro padrão de pelo menos dois ensaios independentes. (K) - Expressão da P53 na linha celular RL95-2, nas esferas ESI RL95-2 e nas derivadas aderentes GI RL95-2. Os valores apresentados correspondem à razão entre as intensidades de fluorescência da P53 e da β -actina. Os gráficos representam a alteração relativamente à linha celular RL95-2 (razão ALDH/actina do controlo igual a 1). Os resultados apresentados correspondem à média e ao erro padrão de pelo menos dois ensaios independentes. A significância estatística está representada com ** para $p < 0,010$ e * para $p < 0,050$.

CSC do endométrio: avaliação da inibição da aldeído desidrogenase

Inibição da aldeído desidrogenase

Avaliação da citotoxicidade

A atividade metabólica obtida após a incubação das linhas celulares de cancro do endométrio com o inibidor ATRA durante 48 horas, pode observar-se na Figura 9. A avaliação da atividade metabólica relativamente ao controlo, das linhas celulares quando submetidas a ATRA na concentração de 1 μM foi de $105,78 \pm 2,12\%$ para as células ECC-1 e de $90,95 \pm 7,47\%$ para as células RL95-2, enquanto com a concentração de 2,5 μM foi de $116,99 \pm 2,44\%$ ($p=0,018$) para as células ECC-1 e de $101,72 \pm 4,93\%$ para as células RL95-2, com a concentração de 5 μM foi de $116,62 \pm 2,92\%$ ($p=0,036$) para as células ECC-1 e de $101,72 \pm 4,02\%$ para as células RL95-2, com a concentração de 10 μM foi de $122,24 \pm 3,68\%$ ($p=0,036$) para as células ECC-1 e de $107,91 \pm 3,03\%$ para as células RL95-2, com a concentração de 20 μM foi de $103,51 \pm 2,87\%$ para as células ECC-1 e de $108,63 \pm 4,38\%$ para as células RL95-2 e com a concentração de 50 μM foi de $39,47 \pm 4,84\%$ ($p<0,001$) para as células ECC-1 e de $117,77 \pm 5,39\%$ para as células RL95-2. A linha ECC-1, quando submetida às concentrações de ATRA de 2,5 μM ($p=0,020$), de 5 μM ($p=0,013$) e de 10 μM ($p=0,013$) apresentou um aumento da atividade metabólica em relação à linha celular RL95-2. De um modo geral, as duas linhas celulares de cancro endometrial não apresentam diminuição da atividade metabólica quando submetidas ao inibidor ATRA, à exceção da linha ECC-1 quando submetida à máxima concentração testada, de 50 μM ($p<0,001$) em relação à linha RL95-2 ($p<0,001$).

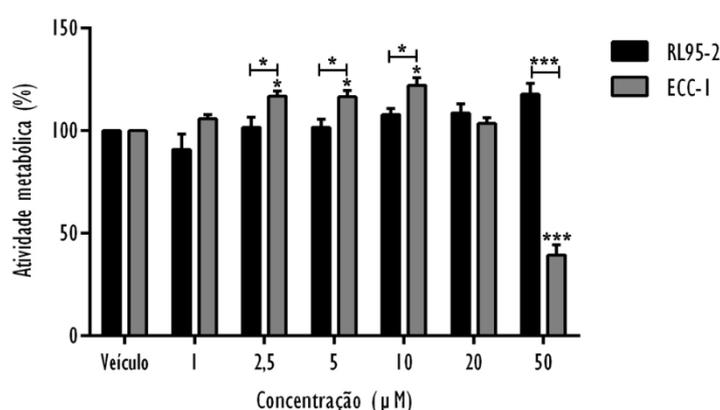
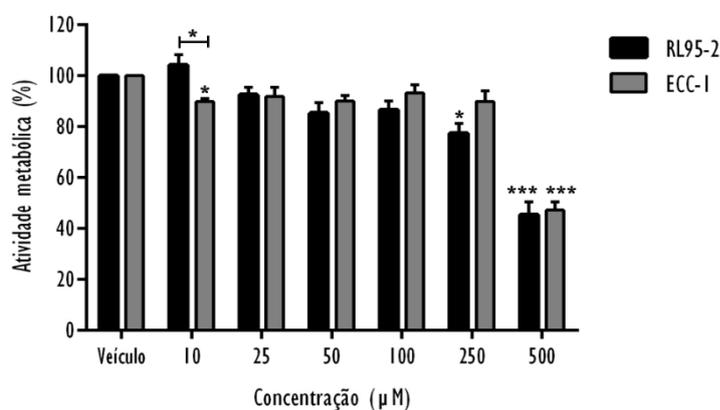


Figura 9 - Avaliação da atividade metabólica das linhas celulares humanas de cancro do endométrio, RL95-2 e ECC-1, após 48 horas de incubação com o inibidor da ALDH, ATRA. Os resultados apresentados correspondem à média e ao erro padrão de dois ensaios independentes realizados em triplicado. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$ e *** para $p < 0,001$.

Relativamente ao inibidor DEAB, na Figura 10, pode observar-se a atividade metabólica obtida após a incubação das linhas celulares, durante 48 horas. A avaliação da atividade metabólica, relativamente ao controlo, das células quando submetidas ao DEAB na concentração de 10 μM foi de $89,80 \pm 1,34\%$ ($p=0,018$) para as células ECC-1 e de $104,28 \pm 4,11\%$ para as células RL95-2, enquanto com a concentração de 25 μM foi de $91,81 \pm 3,67\%$ para as células ECC-1 e de $92,51 \pm 3,07\%$ para as células RL95-2, com a concentração de 50 μM foi de $90,04 \pm 2,35\%$ para as células ECC-1 e de $85,30 \pm 4,25\%$ para as células RL95-2, com a concentração de 100 μM foi de $93,22 \pm 3,26\%$ para as células ECC-1 e de $86,67 \pm 3,46\%$ para as células RL95-2, com a concentração de 250 μM foi de $89,96 \pm 4,16\%$ para as células ECC-1 e de $77,47 \pm 3,86\%$ ($p=0,036$) para as células RL95-2 e com a concentração de 500 μM foi de $47,21 \pm 3,29\%$ ($p<0,001$) para as células ECC-1 e de $45,43 \pm 5,03\%$ ($p<0,001$) para as células RL95-2. A linha ECC-1, quando submetida à concentração de DEAB de 10 μM ($p=0,015$) apresentou um decréscimo da atividade metabólica em relação à linha celular RL95-2. Ambas as linhas celulares, apresentaram um decréscimo da atividade metabólica, quando submetidas à concentração de 500 μM de DEAB ($p<0,001$).

Figura 10 - Avaliação da atividade metabólica das linhas celulares humanas de cancro do endométrio, RL95-2 e ECC-1, após 48

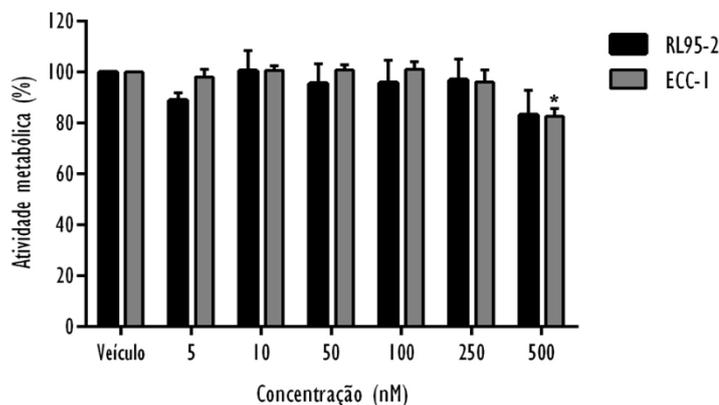


horas de incubação com o inibidor da ALDH, DEAB. Os valores apresentados correspondem à média e ao erro padrão de dois ensaios independentes realizados em triplicado. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$ e *** para $p < 0,001$.

A atividade metabólica obtida das células submetidas a diferentes concentrações de JQ1 está representada na Figura 11. A avaliação da atividade metabólica, relativamente ao controlo, das células quando submetidas a JQ1 na concentração de 5 nM foi de $98,12 \pm 3,02\%$ para as células ECC-1 e de $88,93 \pm 3,05\%$ para as células RL95-2, enquanto com a concentração de 10 nM foi de $100,73 \pm 1,75\%$ para as células ECC-1 e de $100,58 \pm 8,01\%$ para as células RL95-2, com a concentração de 50 nM foi de $100,87 \pm 1,97\%$ para as células ECC-1 e de $95,54 \pm 7,78\%$ para as células RL95-2, com a concentração de 100 nM foi de $101,19 \pm 2,92\%$ para as células ECC-1 e de $95,87 \pm 8,79\%$ para as células RL95-2, com a

concentração de 250 nM foi de $96,13 \pm 4,75\%$ para as células ECC-1 e de $96,99 \pm 8,21\%$ para as células RL95-2 e para a concentração de 500 nM foi de $82,65 \pm 2,97\%$ ($p=0,036$) para as células ECC-1 e de $83,29 \pm 9,70\%$ para as células RL95-2.

Figura 11 - Avaliação da atividade metabólica das linhas celulares humanas de cancro do endométrio, RL95-2 e ECC-1, após 48 horas de incubação com o inibidor da ALDH, JQ1. Os resultados apresentados representam à média e ao erro padrão de dois



ensaios independentes realizados em triplicado. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$.

Avaliação da expressão da ALDH

A expressão de ALDH avaliada em ambas as linhas celulares de cancro do endométrio, quando submetidas ao inibidor ATRA, está representada na Figura 12. Na linha celular ECC-1, a expressão da ALDH observada, relativamente à expressão da actina, foi de $0,99 \pm 0,05$ quando submetida à concentração de $1 \mu\text{M}$, foi de $1,04 \pm 0,12$ quando submetida à concentração de $5 \mu\text{M}$ e foi de $1,18 \pm 0,08$ quando submetida à concentração de $10 \mu\text{M}$. A expressão desta enzima, na linha celular RL95-2, foi de $0,76 \pm 0,06$ quando submetida à concentração de $5 \mu\text{M}$ e foi de $0,89 \pm 0,06$ quando submetida à concentração de $10 \mu\text{M}$. Não se verificaram diferenças estatísticas em ambas as linhas celulares.

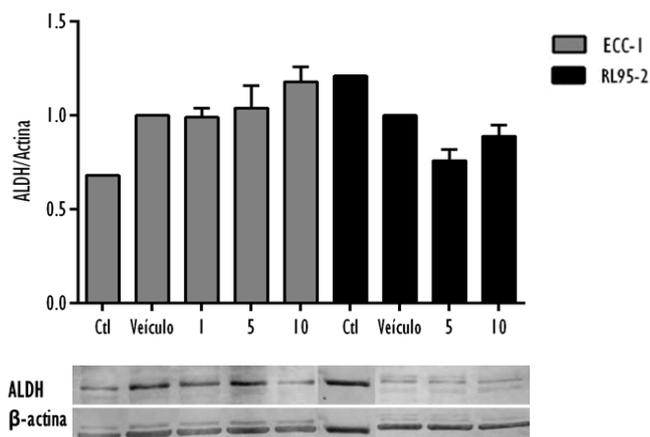


Figura 12 - Expressão da ALDH nas linhas celulares RL95-2 e ECC1, após incubação com o inibidor ATRA. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da ALDH e da Actina e os gráficos representam a alteração relativamente a cada linha celular submetida ao solvente do inibidor (razão ALDH/actina do solvente igual a 1). Os valores apresentados são referentes a pelo menos dois ensaios independentes.

Na Figura 13, pode observar-se a expressão de ALDH obtida nas células RL95-2 e ECC-1 quando submetidas ao inibidor DEAB. Na linha celular ECC-1, a expressão da ALDH foi de $0,73 \pm 0,06$ quando submetida à concentração de $25 \mu\text{M}$, foi de $0,61 \pm 0,09$ quando submetida à concentração de $50 \mu\text{M}$, foi de $0,52 \pm 0,10$ ($p=0,01$) quando submetida à concentração de $100 \mu\text{M}$ e foi de $0,63 \pm 0,10$ quando submetida à concentração de $250 \mu\text{M}$. Na linha celular RL95-2, a expressão desta enzima foi de $0,64 \pm 0,32$ quando submetida à concentração de $50 \mu\text{M}$ e foi de $0,73 \pm 0,39$ quando submetida à concentração de $100 \mu\text{M}$.

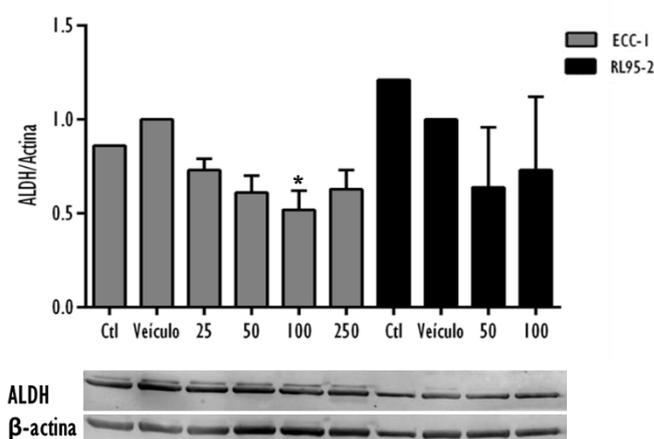


Figura 13 - Expressão da ALDH nas linhas celulares RL95-2 e ECC1, após incubação com o inibidor DEAB. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da ALDH e da Actina e os gráficos representam a alteração relativamente a cada linha celular submetida ao solvente do inibidor (razão ALDH/actina do solvente igual a 1). Os resultados apresentados são referentes a pelo menos dois ensaios independentes. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$.

A expressão da enzima ALDH nas células RL95-2 e ECC-1, após tratamento com o inibidor JQ1, pode observar-se na Figura 14. Na linha celular ECC-1, a expressão da ALDH foi de $1,12 \pm 0,06$ quando submetida à concentração de 50 nM, foi de $1,14 \pm 0,09$ quando submetida à concentração de 250 nM e foi de $0,65 \pm 0,20$ quando submetida à concentração de 500 nM. Na linha celular RL95-2, a expressão desta enzima foi de $1,07 \pm 0,10$ quando submetida à concentração de 100 nM e foi de $1,85 \pm 0,23$ quando submetida à concentração de 250 nM.

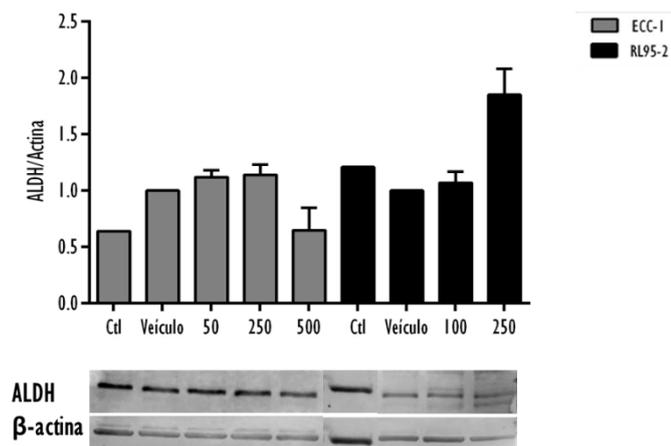


Figura 14 - Expressão da ALDH nas linhas celulares RL95-2 e ECC1, após incubação com o inibidor JQ1. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da ALDH e da Actina e os gráficos representam a alteração relativamente a cada linha celular submetida ao solvente do inibidor (razão ALDH/actina do solvente igual a 1). Os valores apresentados representam pelo menos dois ensaios independentes.

Capacidade de Formação de Esferas

A linha celular RL95-2 apresentou uma capacidade de formação de esferas de $1,12 \pm 0,16\%$, representada na Figura 15. Quando estas células foram submetidas à ação do inibidor da ALDH, DEAB, apenas $0,74 \pm 0,13\%$ das células apresentaram capacidade para originar esferas. Relativamente às células da linha celular ECC-1, a capacidade de formação de esferas foi de $0,93 \pm 0,13\%$, enquanto após terem sido submetidas ao inibidor, a capacidade diminuiu para $0,42 \pm 0,06\%$ ($p=0,003$).

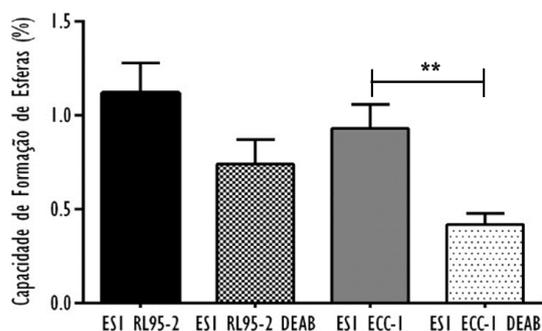


Figura 15 - Capacidade de formação de esferas, obtidas através das linhas celulares de cancro do endométrio, RL95-2 e ECC-1, submetidas ou não à ação do inibidor da ALDH, DEAB. Os resultados apresentados representam a média e o erro padrão de pelo menos sete ensaios independentes. A significância estatística está representada com ** para $p < 0,010$.

Capacidade de Autorrenovação

Na Figura 16, observa-se a capacidade de autorrenovação das esferas obtidas das linhas celulares RL95-2 e ECC-1. As esferas da linha celular RL95-2 apresentaram uma capacidade de autorrenovação de $32,44 \pm 4,77\%$ e as esferas obtidas da linha ECC-1 apresentaram uma autorrenovação de $26,97 \pm 5,20\%$. As esferas ESI RL95-2 e ESI ECC-1, quando submetidas ao DEAB, apresentaram uma capacidade de autorrenovação de $21,38 \pm 2,70\%$ e de $16,39 \pm 2,83\%$, respetivamente.

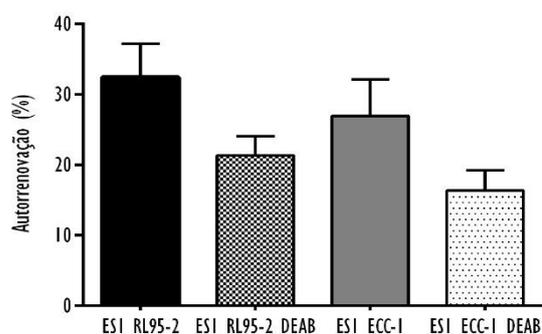


Figura 16 - Capacidade de autorrenovação de esferas, ESI RL95-2 e ESI ECC-1, também sob a influência de DEAB. Os valores apresentados representam a média e o erro padrão de pelo menos sete ensaios independentes.

Área de projeção ocupada pelas esferas

Na Figura 17 apresentam-se imagens das esferas, representativas das fotografias utilizadas na quantificação da área de projeção das mesmas.

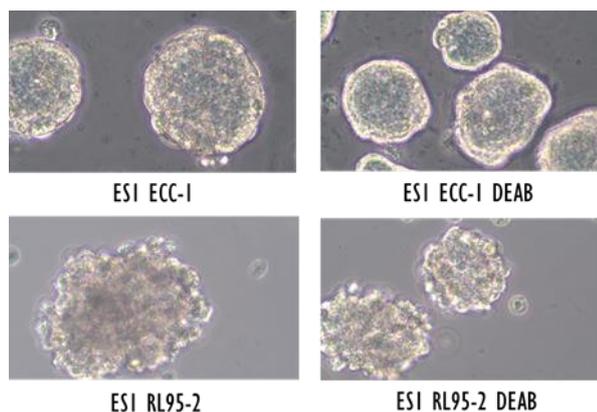


Figura 17 - Imagens das esferas, ESI RL95-2 e ESI ECC-1, representativas das fotografias obtidas para análise da área ocupada pelas esferas. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 200x.

A área de projeção média ocupada pelas esferas, representada na representada na Figura 18, foi superior nas ESI RL95-2 em relação às ESI ECC-1 ($p < 0,001$), correspondendo a $4,65 \times 10^5 \pm 1,58 \times 10^4$ pixéis e $3,05 \times 10^5 \pm 1,08 \times 10^4$ pixéis, respetivamente. Sob influência de DEAB, as esferas de ambas as linhas celulares apresentaram uma área de projeção média menor ($p < 0,001$), de $2,41 \times 10^5 \pm 1,09 \times 10^4$ pixéis e de $1,35 \times 10^4 \pm 6,87 \times 10^3$ pixéis, para as ESI RL95-2 e as ESI ECC-1, respetivamente. Da mesma forma, as esferas de ambas as linhas celulares quando submetidas ao DEAB, as ESI RL95-2 DEAB ($p < 0,001$) e as ESI ECC-1 DEAB ($p < 0,001$), apresentaram uma diminuição da área de projeção, comparativamente com as populações ESI da respetiva linha celular sem tratamento.

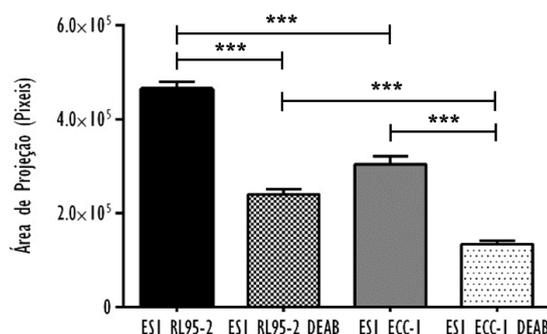


Figura 18 - Área média ocupada pelas esferas, ESI RL95-2 e ESI ECC-1, também sob influência do inibidor DEAB. Os resultados apresentados exprimem a média do número de pixéis e o erro padrão de pelo menos 120 imagens por cada condição obtidas em pelo menos quatro ensaios independentes. A significância estatística está representada com *** para $p < 0,001$.

Eficiência Clonogénica

A eficiência clonogénica apresentada pelas esferas da linha ECC-1, foi de $50,78 \pm 2,17\%$ e pelas esferas ESI ECC-1, submetidas à ação do inibidor DEAB, foi de $41,54 \pm 3,10\%$, como representado na Figura 19.

As esferas submetidas ao inibidor revelaram menos eficiência na formação de colónias comparativamente às esferas sem tratamento ($p=0,031$). Relativamente às esferas da linha RL95-2, não foi possível a obtenção de colónias após 15 dias de incubação.

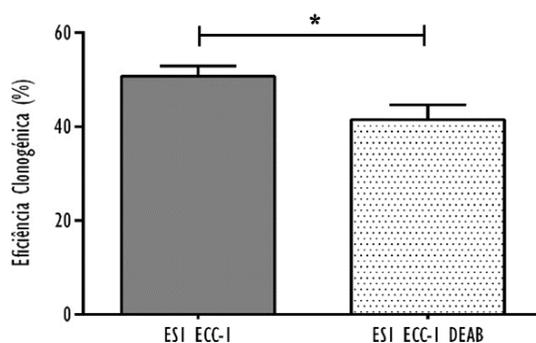


Figura 19 - Eficiência clonogénica apresentadas pelas esferas da linha ECC-I, ESI ECC-I, e das esferas submetidas ao inibidor DEAB. Os resultados representam a média e o erro padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado. A significância estatística está representada com * para $p < 0,050$.

Marcadores de células estaminais

CD133, CD44/CD24

A avaliação de marcadores associados à estaminalidade das populações de CSC do endométrio, como o CD133, o CD24 e o CD44, foi realizada para a caracterização destas populações. Neste estudo, foram identificadas quatro populações distintas, nomeadamente $CD44^+/CD24^-$, $CD44^{débil}/CD24^-$, $CD44^{débil}/CD24^{\pm}$ e $CD44^-/CD24^+$ em cada condição em estudo.

Na Tabela 4, está descrita a distribuição percentual das populações $CD44^+/CD24^-$, $CD44^{débil}/CD24^-$, $CD44^{débil}/CD24^{\pm}$ e $CD44^-/CD24^+$ nas CSC do endométrio antes e após tratamento com DEAB. Com esta análise pode comprovar-se que a distribuição das populações de CSC nas populações $CD44^+/CD24^-$, $CD44^{débil}/CD24^-$, $CD44^{débil}/CD24^{\pm}$ e $CD44^-/CD24^+$ é semelhante nas populações de esferas de ambas as linhas celulares, submetidas ou não a tratamento com o inibidor da ALDH, DEAB. As esferas da linha celular RL95-2 apresentaram como população maioritária as células com fenótipo $CD44^{débil}/CD24^-$, com uma percentagem de $46,98 \pm 3,99\%$. As esferas da linha celular RL95-2 tratadas com DEAB apresentaram como população maioritária as células $CD44^{débil}/CD24^-$, com uma percentagem de $44,40 \pm 5,90\%$. Relativamente às esferas de ECC-I, $33,45 \pm 5,29\%$ das células correspondem à população $CD44^{débil}/CD24^-$, a população maioritária. Quando submetidas ao DEAB, $40,93 \pm 10,76\%$ das esferas de ECC-I correspondem à população maioritária, $CD44^+/CD24^-$.

Tabela 4 – Percentagem de células de cada população de CSC do endométrio pelas populações CD44⁺/CD24⁻; CD44^{débil}/CD24⁻; CD44^{débil}/CD24[±] e CD44⁻/CD24⁺. Os valores exprimem a médio e o erro padrão de pelo menos duas experiências independentes realizadas em duplicado.

%	ESI RL95-2	ESI RL DEAB	ESI ECC-I	ESI EC DEAB
CD44 ⁺ /CD24 ⁻	37,13±3,83	33,33±4,17	32,75±5,89	40,93±10,76
CD44 ^{débil} /CD24 ⁻	46,98±3,99	44,40±5,90	33,45±5,29	29,23±5,43
CD44 ^{débil} /CD24 [±]	13,15±2,72	17,78±2,09	23,33±1,90	23,15±5,40
CD44 ⁻ /CD24 ⁺	2,75±1,35	4,50±1,74	10,32±1,88	6,72±1,29

Na marcação global de CD133 na população de esferas obtida da linha RL95-2, representada na Figura 20 obteve-se uma média de intensidade de fluorescência de 168,50±7,26 na população CD44⁺/CD24⁻ e de 169,25±16,77 na população CD44^{débil}/CD24⁻. As populações CD44^{débil}/CD24[±] e CD44⁻/CD24⁺ não expressam CD133. Relativamente à população ESI RL95-2 sob influência de DEAB, obteve-se uma média de intensidade de fluorescência do CD133 de 799,50±58,41 na população CD44⁺/CD24⁻, de 590,50±51,59 na população CD44^{débil}/CD24⁻ e de 183,00±58,28 na população CD44^{débil}/CD24[±]. A população CD44⁻/CD24⁺ não apresenta marcação de CD133. Nas esferas da linha ECC-I, obteve-se uma média de intensidade de fluorescência do CD133 de 3140,17±392,08 na população CD44⁺/CD24⁻, de 728,00±138,49 na população CD44^{débil}/CD24⁻, de 1094,17±154,12 na população CD44^{débil}/CD24[±] e de 1106,83±263,18 na população CD44⁻/CD24⁺. Quando as esferas da linha ECC-I foram submetidas ao DEAB, obteve-se uma média de intensidade de fluorescência de 4298,67±400,49 na população CD44⁺/CD24⁻, de 1476,50±317,13 na população CD44^{débil}/CD24⁻, de 1952,67±228,86 na população CD44^{débil}/CD24[±] e de 1679,67±281,30 na população CD44⁻/CD24⁺.

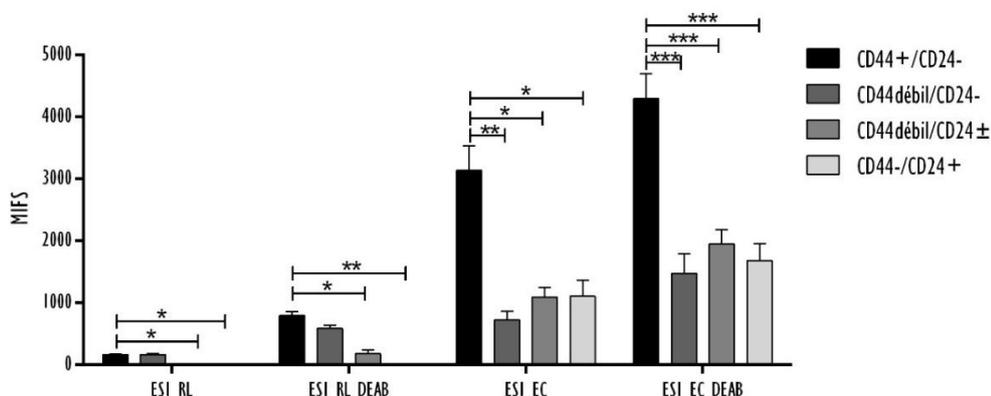


Figura 20 - Expressão de CD133 nas esferas ESI RL95-2 e ESI ECC-I e ESI submetidas ao inibidor DEAB. Os valores apresentados exprimem a média de intensidade de fluorescência e o erro padrão de pelo menos dois ensaios independentes realizados em duplicado. A significância estatística está representada com * para p < 0,050, com ** para p < 0,010 e com *** para p < 0,001.

Os histogramas da expressão de CD133 estão representados na Figura 21 para cada população tumoral do endométrio. Nesta análise verifica-se uma elevação do CD133 na população CD44⁺/CD24⁻ das esferas de RL95-2 e ECC-1 em relação às outras populações isoladas. Existe uma tendência para o aumento da população maioritária das esferas submetidas ao DEAB em comparação com as esferas não tratadas.

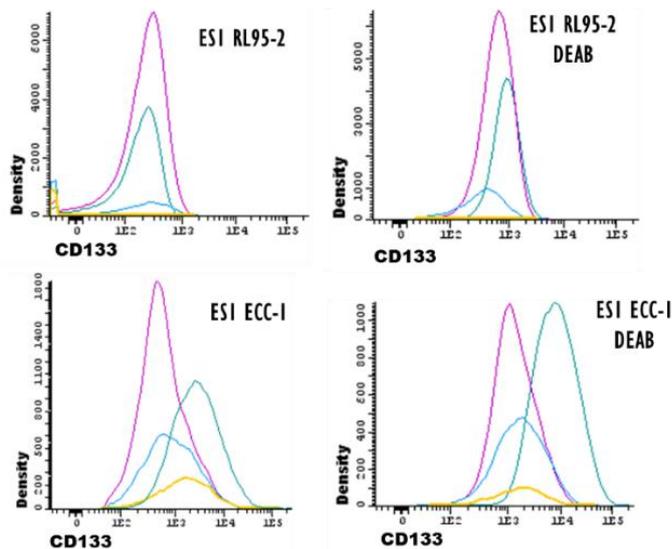


Figura 21 - Histogramas representativos da marcação de CD133 nas ESI RL95-2 e ESI ECC-1 e ESI submetidas ao inibidor DEAB num dos ensaios. Nos histogramas, as linhas verde, rosa, azul e amarela correspondem às populações CD44⁺/CD24⁻, CD44^{debi}/CD24⁻, CD44^{debi}/CD24[±] e CD44⁺/CD24⁺, respetivamente.

Os *plots* da expressão de CD44/CD24 estão representados na Figura 22. Com esta análise pode observar-se que todas as populações estudadas expressam os marcadores CD44 e CD24.

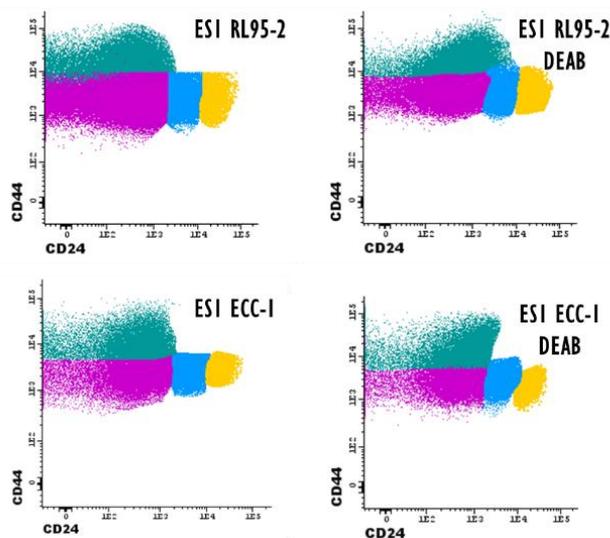


Figura 22 - Plots representativos da marcação de CD44/CD24 nas populações de CSC do endométrio e sob a expressão de DEAB num dos ensaios. As linhas verde, rosa, azul e amarela correspondem às populações CD44⁺/CD24⁻, CD44^{debi}/CD24⁻, CD44^{debi}/CD24[±] e CD44⁺/CD24⁺, respetivamente.

A população descrita como marcador de CSC, $CD44^+/CD24^-$ nas esferas da linha RL95-2 corresponde a $37,13 \pm 3,83\%$ e quando submetidas ao DEAB, corresponde a $33,33 \pm 4,17\%$. Nas esferas de ECC-1, esta população representa a $32,75 \pm 5,89\%$ e na presença do inibidor $40,93 \pm 10,76\%$.

ALDH

A expressão da ALDH das esferas das linhas celulares de cancro do endométrio, ESI RL95-2 e ESI ECC-1 submetidas ao inibidor desta enzima, DEAB, encontra-se representada na Figura 23.

As esferas ESI RL95-2 quando submetidas ao inibidor, apresentam uma tendência decrescente da expressão da ALDH, comparativamente com o controlo, apresentando um valor de expressão de $0,50 \pm 0,17$, que não atingiu significado estatístico. Relativamente às esferas ESI ECC-1, na presença de DEAB, apresentam igualmente um decréscimo da expressão da enzima, em comparação com o controlo, apresentando um valor de expressão de $0,78 \pm 0,11$, também sem significância estatística.

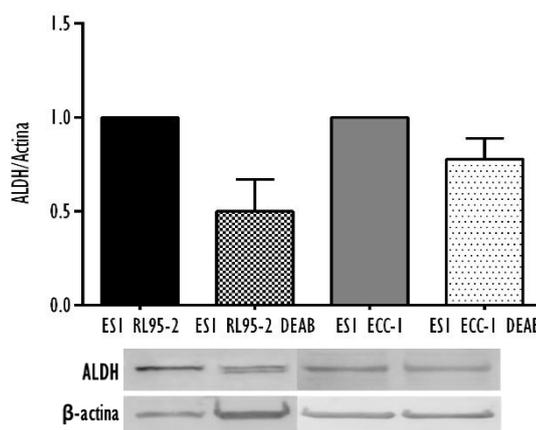


Figura 23 - Expressão da ALDH das esferas ESI RL95-2 e ESI ECC-1, submetidas ao inibidor DEAB. Os resultados apresentados exprimem a razão entre as intensidades de fluorescência da ALDH e da β -actina. Os gráficos representam a alteração relativamente às esferas ESI RL95-2 e ESI ECC-1, não submetidas ao inibidor (razão ALDH/actina do controlo igual a 1). Os resultados apresentados correspondem à média e ao erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes.

Expressão de P53

Na Figura 24, pode observar-se a expressão da P53 avaliada nas esferas das linhas celulares de cancro do endométrio, ESI RL95-2 e ESI ECC-1, após terem sido submetidas ao DEAB. As populações de ESI RL95-2 submetidas ao inibidor, apresentam um valor de expressão da P53 de $1,36 \pm 0,20$, comparativamente com a expressão das ESI RL95-2. As populações ESI ECC-1, na presença de DEAB, apresentam uma expressão da proteína de $1,35 \pm 0,13$ em comparação com as esferas ESI ECC-1.

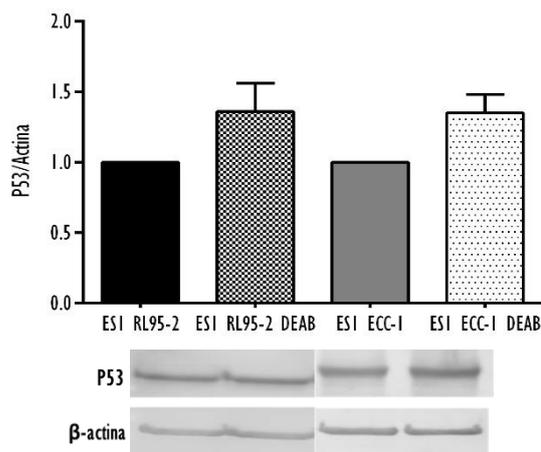


Figura 24 - Expressão da P53 das esferas ESI RL95-2 e ESI ECC-1, submetidas ao DEAB. Os resultados apresentados exprimem a razão entre as intensidades de fluorescência da P53 e da β -actina. Os gráficos representam a alteração relativamente às esferas ESI RL95-2 e ESI ECC-1, não submetidas ao inibidor (razão ALDH/actina do controlo igual a 1). Os valores apresentados correspondem à média e ao erro padrão de pelo menos três ensaios independentes.

Discussão

O principal objetivo deste trabalho compreende o estudo da inibição da ALDH na população de CSC do endométrio. Para este efeito, avaliou-se a citotoxicidade de três compostos descritos na literatura como inibidores da ALDH, ATRA, DEAB e JQ1, nas linhas celulares de cancro do endométrio, RL95-2 e ECC-1. O intuito deste ensaio foi garantir que as concentrações a usar em estudos posteriores não influenciavam a viabilidade celular. As duas linhas celulares, quando expostas à ação do inibidor ATRA, não apresentaram uma diminuição significativa da atividade metabólica em nenhuma concentração testada, à exceção da linha celular ECC-1 quando submetida ao inibidor na concentração mais elevada, 50 μ M. Quando submetidas à ação do DEAB, a linha celular RL95-2, apresentou sensibilidade significativa à ação do inibidor nas concentrações de 250 e 500 μ M, enquanto que a linha ECC-1, apenas apresentou quando submetida à concentração mais elevada. Já para o estudo realizado com o inibidor JQ1, apenas a linha ECC-1 quando submetida à concentração mais elevada testada, que corresponde a 500 nM, apresentou diminuição significativa da atividade metabólica.

A avaliação da inibição da enzima ALDH foi realizada e relatada por outros autores. Num estudo de Croker e Allan, foi estudada a combinação dos inibidores ATRA e DEAB, com quimioterapia e radioterapia em células de cancro da mama. Os autores submeteram as populações celulares ALDH^{hi}CD44⁺ e ALDH^{low}CD44⁻ à concentração de 5 μ M de ATRA e de 100 μ M de DEAB e avaliaram a citotoxicidade destes compostos. Em nenhum dos casos estudados, os autores reportaram alterações significativas da proliferação ou viabilidade celulares (Croker e Allan, 2012). Noutro estudo, os autores sensibilizaram células de cancro do ovário ao tratamento com fármacos quimioterapêuticos, com 5 μ M de ATRA e 50 μ M de DEAB, durante 48 horas.

Os autores não observaram nenhum efeito dos inibidores na viabilidade celular (Januchowski *et al.*, 2016a). Num estudo de Zhang e colaboradores, foram determinados valores de IC50 de JQ1 em várias linhas de cancro do ovário. Os valores de IC50 obtidos foram na ordem de 1 μ M (Zhang *et al.*, 2016). Esta concentração, ainda que superior às testadas no nosso estudo, permite inferir que o efeito de JQ1 está na dependência do tipo de linha celular em estudo.

O efeito dos inibidores da ALDH na sua expressão foi avaliada nas linhas celulares do cancro do endométrio. As linhas celulares RL95-2 e ECC-1, quando submetidas aos inibidores ATRA e JQ1, não apresentaram diferenças significativas na expressão da ALDH em nenhuma das condições estudadas, relativamente ao controlo. Relativamente ao inibidor DEAB, a linha celular ECC-1, apresentou uma diminuição significativa da expressão da ALDH, quando submetida à concentração de 100 μ M, resultado que o torna no inibidor da ALDH mais promissor neste estudo. Na linha RL95-2, não se observam diferenças significativas.

No trabalho de Januchowski e colaboradores, a avaliação da expressão da ALDH em linhas celulares de cancro do ovário, resistentes a fármacos utilizados em regimes de quimioterapia, foi realizada após tratamento com ATRA e DEAB, nas concentrações de 5 e 50 μ M, respetivamente. Os autores realizaram uma análise por *western blot* para determinar o efeito dos inibidores na enzima ALDH1A1. Após dois, três e quatro dias de tratamento com ATRA, observou-se uma diminuição da expressão da enzima na linha WI, resistente ao paclitaxel. Na linha WI, resistente ao topotecano, observou-se uma diminuição da expressão da ALDH após três e quatro dias de tratamento com ATRA. Com o inibidor DEAB, observou-se uma expressão da ALDH estável ao longo dos diversos dias de tratamento, para ambas as linhas celulares (Januchowski *et al.*, 2016a). No estudo de Yokoyama e colaboradores, a expressão da ALDH foi avaliada na linha de cancro do ovário, OVCAR3, após tratamento com o inibidor JQ1 em concentrações crescentes (50-100 nmol/L). A expressão da ALDH nesta linha celular diminuiu com o aumento da concentração de JQ1 (Yokoyama *et al.*, 2016). Estes resultados permitem inferir que a ação destes compostos está na dependência do tipo de cancro estudado e da linha celular utilizada, mas existem evidências de que poderão influenciar a expressão de populações resistentes à terapêutica.

Estes estudos permitiram selecionar o inibidor da ALDH mais promissor nas linhas celulares de carcinoma endometrial, nomeadamente o DEAB na concentração de 100 μ M, para a realização de estudos posteriores deste projeto.

As CSC são definidas como um pequeno subconjunto de células cancerígenas com capacidade de autorrenovação e diferenciação em células tumorais heterogéneas, e têm sido associadas à iniciação, propagação e recorrência tumoral (Koury, Zhong e Hao, 2017). O protocolo de formação de esferas, em condições não aderentes, é cada vez mais utilizado para o isolamento de putativas populações de CSC e

permite a avaliação da atividade das células estaminais no tecido normal e cancerígeno (Allegra *et al.*, 2014). A técnica de cultura celular independente de ancoragem, num meio de cultura sem soro e enriquecido com fatores de crescimento, foi inicialmente utilizada para propagação de células do epitélio da mama num estado de indiferenciação (Calvet, André e Mir, 2014). As células epiteliais mamárias humanas formam colónias esféricas, denominadas tumoresferas na generalidade dos tumores e mamosferas, no caso da mama, quando cultivadas nestas condições. Diversos estudos relatam que as culturas de tumoresferas são enriquecem em CSC em várias linhas celulares cancerígenas, tais como linhas celulares de cancro da mama, fígado, cólon e ovário. Esta técnica facilitou o isolamento e permitiu a caracterização de células estaminais humanas, bem como a compreensão das vias que regulam a autorrenovação e diferenciação, através de ensaios *in vitro* adequados (Dontu *et al.*, 2003; Calvet, André e Mir, 2014). Neste trabalho, testámos o enriquecimento em CSC, de linhas celulares de cancro do endométrio do tipo endometrióide, ECC-1 e RL95-2.

Neste trabalho experimental foi utilizado o método das tumoresferas, em que as populações de esferas do endométrio foram obtidas através de um protocolo de formação de esferas em condições não aderentes, em meio de cultura com metilcelulose e sem soro bovino fetal, que auxilia a manutenção das condições em suspensão, e suplementado com fatores de crescimento, nomeadamente EGF e bFGF. A suplementação com EGF e bFGF é descrita como fundamental na expansão e na manutenção do fenótipo de indiferenciação das esferas em suspensão. O meio de cultura é ainda suplementado com insulina e transferrina que induzem proliferação das células estaminais (Carvalho, 2015). As esferas obtidas, quando colocadas em condições aderentes, originaram derivadas aderentes diferenciadas, o que permitiu confirmar a capacidade de diferenciação destas populações de CSC. Estas culturas foram mantidas sob condições de diferenciação por pelo menos duas passagens antes de serem usadas em experiências (Qureshi-Baig *et al.*, 2016).

No nosso trabalho, a capacidade de formação de esferas foi avaliada nas populações ESI RL95-2 e ESI ECC-1 e também nestas populações submetidas ao inibidor da ALDH. A linha celular ECC-1, apresentou uma capacidade de formação de esferas de 0,93% e um decréscimo significativo quando submetidas ao DEAB, com valor de 0,42%. Num trabalho anterior do nosso grupo, a linha celular ECC-1 apresentou uma capacidade de formação de esferas semelhante (Carvalho, 2015). As linhas celulares de cancro da mama, MCF7 e HCC1806, obtidas de um protocolo de formação de esferas idêntico ao por nós utilizado, apresentou uma capacidade de formação de esferas de 1,97% e 1,25%, respetivamente (Laranjo *et al.*, 2018). Outros autores avaliaram a capacidade de formação de esferas em linhas celulares como as da mama, B16-F10, HT-29 e MDA-MB-231. A linha celular B16-F10 apresentou uma capacidade de formação de esferas de cerca de 20%, enquanto que a linha HT-29, apresentou valores mais elevados, de cerca de 80%. A linha de cancro da mama MDA-MB-231 não apresentou capacidade de formação de esferas (Calvet, André e Mir,

2014). Num estudo de Liu e colaboradores, a capacidade de formação de esferas foi avaliada na linha CaSki, que apresentou um valor de 0,15% (Liu *et al.*, 2016). Num estudo em cancro da próstata, a linha PC3 apresentou uma capacidade de formação de esferas que variou entre 0,2 a 5% (Zhang *et al.*, 2012). Estes resultados revelam valores de capacidade de formação muito variáveis, o que permite inferir que esta capacidade é dependente de cada linha celular. Quando submetida ao DEAB, a linha celular de cancro do endométrio ECC-1, apresentou menor capacidade de formação de esferas, o que permite colocar a hipótese de que este inibidor atua ao nível da proliferação das células estaminais, dado que as linhas celulares formam menos esferas com um diâmetro superior a 40 μ m, durante os cinco dias do protocolo de formação de esferas.

No nosso trabalho, avaliámos a autorrenovação, que traduz a capacidade de uma célula proveniente de uma esfera formar uma nova esfera. As esferas da linha RL95-2 e da linha ECC-1, apresentaram uma capacidade de autorrenovação de 32,44% e de 26,97%, respetivamente. Quando submetidas ao DEAB, esta capacidade decresce para 21,38% na linha RL95-2 e 16,39% na linha ECC-1. Um estudo em linhas celulares de cancro da mama, reportou valores de autorrenovação de 58,75% e de 10,23%, nas linhas MCF7 e HCC1806, respetivamente (Laranjo *et al.*, 2018). Num outro estudo com células HeLa, após dissociação de esferas em células isoladas e de um protocolo de formação de 7 dias, obteve-se uma capacidade de autorrenovação de 40,79% (Wang *et al.*, 2014). Os resultados permitiram inferir que a capacidade de autorrenovação das populações de CSC variava de acordo com a heterogeneidade tumoral. Neste trabalho, a capacidade de células provenientes de esferas formarem novas esferas foi superior à capacidade apresentada pelas culturas aderentes. Outros autores também descreveram este facto. No trabalho de Zhang e colaboradores, pode observar-se uma capacidade de autorrenovação significativamente superior das células das esferas obtidas a partir da linhas de cancro da próstata, LNCaP, 22RV1, DUI45 e PC3, em relação à capacidade apresentadas pelas células aderentes (Zhang *et al.*, 2012).

Relativamente à diminuição da capacidade de autorrenovação obtida quando as esferas estão sob influência do inibidor da ALDH, pode estar relacionada com a menor capacidade de formação de esferas devido à ação do inibidor na proliferação destas populações. Na análise realizada à área de projeção ocupada pelas populações de CSC, também se verificou uma diminuição significativa da área das esferas submetidas ao DEAB, comparativamente às esferas sem tratamento, em ambas as linhas celulares de carcinoma endometrial. Estes dados complementam-se com os resultados obtidos com a avaliação da capacidade de formação de esferas e autorrenovação. Com a diminuição da área de projeção observada em ambas as linhas celulares, pode colocar-se a hipótese de que este inibidor atua ao nível do ciclo celular, interferindo com o número de divisões celulares.

A eficiência clonogénica das populações de esferas, ESI RL95-2 e ESI ECC-I, sem e com a influência de DEAB, foi determinada no nosso estudo. Relativamente às esferas da linha ECC-I, estas apresentaram uma eficiência superior à da população ESI ECC-I DEAB. Este resultado corrobora resultados anteriores, no sentido em que a influência de DEAB pode ocorrer na proliferação das células estaminais mas não afeta a viabilidade das mesmas (Crocker e Allan, 2012; Januchowski *et al.*, 2016a).

Nas esferas da linha RL95-2, não foi possível a obtenção de colónias em nenhuma condição em estudo. Este facto e o aumento significativo do tempo de duplicação das derivadas aderentes desta linha celular, pode justificar-se com uma necessidade de adaptação ou de seleção para a cultura em suspensão, e quando colocadas em condições aderentes, as ESI RL95-2 apresentarem uma capacidade menor de ligação ao substrato (Calvet, André e Mir, 2014).

A expressão ou ausência de marcadores de superfície tem sido usada para isolar subpopulações de células cancerígenas para a caracterização das propriedades de CSC. Alguns marcadores da superfície celular, incluindo o CD133, o CD24 e o CD44, foram descritos em vários tipos de cancro, como mama, cérebro, colorretal e endométrio, para identificação de CSC (Hubbard e Gargett, 2010; Elbasateeny *et al.*, 2016).

No cancro do endométrio, o CD133 foi considerado um potencial marcador de populações de CSC (Elbasateeny *et al.*, 2016). Neste trabalho, de acordo com a média de intensidade de fluorescência total, a expressão de CD133 na linha RL95-2, GI RL95-2 e ESI RL95-2 não se observou. Quando submetidas ao DEAB, a expressão de CD133 nas ESI de ambas as linhas celulares, apresentou um aumento. A população CD44⁺/CD24⁻, despertou interesse na comunidade científica a partir do momento em que células tumorais da mama com este fenótipo induziram tumores *in vivo* com uma inoculação de apenas 100 células. Este fenótipo tem sido associado a características de CSC em tumores sólidos (Carvalho, 2015). No nosso estudo, a expressão mais elevada de CD133 observou-se na população CD44⁺/CD24⁻ das células com propriedades de CSC do endométrio, nomeadamente em comparação com as populações aderentes.

Outros estudos reportaram um aumento da expressão de CD133 em populações de CSC. Num estudo anterior do nosso grupo, as esferas da linha celular ECC-I apresentaram uma expressão de CD133 significativamente superior em relação à linha celular parental (Carvalho, 2015). Em linhas celulares de cancro do endométrio, células CD133⁺ apresentaram uma maior capacidade de formar colónias *in vitro* e apresentaram uma maior tumorigenicidade *in vivo*. Esta população, apresentou aparentemente, uma maior resistência à citotoxicidade induzida pelo paclitaxel e pela cisplatina (Kyo e Kato, 2015). Nakamura e colaboradores, avaliaram a frequência de células CD133⁺ em seis linhas de cancro do endométrio, Ishikawa, HEC-1A, AN3-CA, RL95-2, MFE280 e MFE296. Os resultados da citometria de fluxo revelaram que a proporção de CD133⁺ variou entre as diferentes linhas celulares. A linha RL95-2 apresentou aproximadamente 1% da

população com o fenótipo CD133⁺ (Nakamura *et al.*, 2010), resultado que é coincidente com a ausência de marcação do CD133 obtida neste trabalho. Outros trabalhos também descreveram resultados semelhantes, como o estudo de Kong e colaboradores, a linha celular RL95-2 não apresentou células com o fenótipo de CD133⁺/CD44⁺ (Kong *et al.*, 2017). Num estudo com a linha celular FU-MMT-1, uma linha celular de carcinosarcoma uterino, a expressão de CD133 foi avaliada e 65,9% das células apresentaram fenótipo CD133⁺. As populações CD133 positivas e negativas desta linha celular foram sujeitas a um ensaio de formação de colónias e a população com expressão positiva apresentou uma capacidade de formação superior. Uma diminuição da expressão foi observada em culturas aderentes derivadas da população CD133⁺, mantidas em condições de diferenciação (Choijamts *et al.*, 2011). Noutro estudo com linhas celulares de carcinoma do endométrio, um ensaio clonogénico foi utilizado para avaliar o potencial proliferativo de células CD133⁺ e CD133⁻. As células CD133⁺ das linhas celulares KLE e Ishikawa apresentaram um potencial proliferativo superior (Guy *et al.*, 2016). Rutella e colegas, mostraram que células CD133⁺ de tumores endometriais apresentaram uma maior capacidade proliferativa *in vitro* do que células CD133⁻. A população positiva exibiu capacidade clonogénica, formando colónias a partir de uma única célula, enquanto que células CD133⁻ não apresentaram esta capacidade. Os autores descrevem que o CD133 pode ser útil como fator de prognóstico no carcinoma endometrial (Rutella *et al.*, 2009). Diversos estudos apresentam células com expressão de CD133 positiva como populações com características de CSC, contudo, outros estudos evidenciam que o CD133 não é um marcador universal para CSC do endométrio (Cervelló *et al.*, 2011). No nosso estudo, o inibidor DEAB parece influenciar a expressão de CD133 nas populações de CSC do endométrio.

A expressão de CD44 nas populações de CSC do endométrio, está presente nas esferas de ambas as linhas celulares, e não apresentou diferenças quando as esferas foram tratadas com DEAB. Nesta avaliação, as populações maioritárias são as que apresentam os fenótipos CD44⁺/CD24⁻ e CD44^{débil}/CD24⁻, que comprovam que este marcador é expresso em todas as populações de CSC do endométrio estudadas. São reconhecidas múltiplas funções biológicas ao marcador CD44, inicialmente implicadas no processo de invasão e metástase. Atualmente, o CD44 é reconhecido como um marcador para CSC em diferentes tecidos. Estudos em endométrio, relatam a expressão de CD44 em esferas geradas a partir de linhas celulares de cancro endometrial (Mirantes *et al.*, 2013; Elbasateeny *et al.*, 2016). Esferas originárias da linha Ishikawa apresentaram uma expressão significativa da população CD44⁺/CD133⁺ (Kong *et al.*, 2017). Estudos revelam que a presença de CD44 e CD133 em tumores do endométrio podem ter um papel na carcinogénese num estágio inicial, e que a sua sobreexpressão pode facilitar um diagnóstico precoce destes carcinomas. A expressão de CD44 tende a diminuir à medida que a doença progride e se torna invasiva (Elbasateeny *et al.*, 2016).

Nishino e colegas, avaliaram a expressão de CD44 variantes (CD44v) e/ou ALDH em várias linhas de adenocarcinoma do pulmão. Populações CD44v⁺/ALDH⁺ e CD44v⁺/ALDH⁻ apresentaram características de CSC, onde as células CD44v⁺/ALDH⁻ se revelaram mais proliferativas e mais resistentes à quimioterapia, enquanto que as células CD44v⁺/ALDH⁺ foram mais eficientes na formação de tumoresferas *in vitro* (Nishino *et al.*, 2017). Um estudo com a linha celular B16-F10, revelou que em monocamadas aderentes, aproximadamente a totalidade das células da linha celular expressou CD44, enquanto a expressão de CD133 e CD24 foi encontrada em menos de 1% das células. Na linha HT-29, um aumento de 15% de células CD44⁺/CD133⁺ foi detetado em esferas tumorais (49,6% das células) comparativamente com células aderentes (34,3% das células), sugerindo um enriquecimento em CSC. Em relação às linhas celulares de cancro da mama, MCF-7 e MDA-MB-231, foi descrito um perfil de CD44⁺CD24⁻ para CSC. As células MCF7 apresentaram cerca de 50% de células com fenótipo CD44⁺/CD24⁻ na população aderente, taxa que diminuiu para 33,1% quando as células foram cultivadas como tumoresferas, embora sem significado estatístico. No caso das células MDA-MB-231, que embora não tenham apresentado eficiência na formação de esferas, mais de 99% da população de células aderentes apresentava fenótipo CD44⁺/CD24⁻ (Calvet, André e Mir, 2014). A variabilidade na expressão de CD24 e CD44 é uma realidade descrita em vários estudos, para várias populações celulares e tipos de cancro e portanto não será um marcador específico (Carvalho, 2015; Hubbard e Gargett, 2010).

No nosso estudo, nas populações de CSC do endométrio tratadas com DEAB, apresentaram um aumento da expressão de CD133 na população CD44⁺/CD24⁻, população associada a propriedades de CSC. Estes resultados foram obtidos por outros autores, nomeadamente Ginestier e colegas, que relataram que alguns genes sobreexpressos na população ALDH⁺ também foram altamente expressos em células tratadas com DEAB. Assim, pode inferir-se que o tratamento com DEAB resulta num fenótipo semelhante ao apresentado por células com propriedades de CSC. No entanto, os autores não observaram alterações na expressão de genes de resistência após o tratamento com DEAB, e estas células apresentaram mais sensibilidade à quimioterapia. A ação do DEAB na sensibilização de células cancerígenas, com altos níveis de expressão de ALDH, à quimioterapia é desconhecido (Januchowski *et al.*, 2016b).

O aumento da atividade da enzima ALDH foi encontrado em populações de CSC em diversos tumores, como o cancro do endométrio, onde a expressão da enzima ALDH1 está associada à tumorigénese (Carvalho, 2015; Van Der Zee *et al.*, 2015). No nosso estudo, não se verificaram diferenças, mas existe uma tendência para o aumento da expressão na população de CSC. Num outro estudo do nosso grupo em CSC do endométrio, observou-se um aumento na expressão desta enzima nas esferas comparativamente com a linha celular ECC-1 (Carvalho, 2015). Num estudo de Ding e colaboradores, foram isoladas células CD133⁺ de uma amostra tumoral de uma doente com cancro do endométrio e foram avaliar a expressão de genes

relacionados com a estaminalidade. A expressão de ALDH1 observada foi significativamente superior do que na população celular CD133⁺ (Ding *et al.*, 2017). Rahadiani e colegas avaliaram a atividade da ALDH em diversas linhas de carcinoma do endométrio do tipo endometriode. A atividade da ALDH observada nas linhas HEC-1, HEC-1A, HEC-108, HEC-116, HEC-6, HEC-88nu e SNG-M estava aumentada enquanto nas linhas HEC-251 e na SNG-II não se observou atividade da enzima. Estes dados revelam que, apesar de se tratar do mesmo tipo de tumor, existem variações na expressão de marcadores de estaminalidade, específicos de cada linha celular (Rahadiani *et al.*, 2011). A expressão elevada da enzima ALDH em tumores do endométrio foi relacionada com um prognóstico desfavorável (Carvalho, 2015). Em estudos com outros tipos de tumores, as esferas das linhas celulares de cancro da mama, MCF7 e HCC1806, apresentaram um aumento significativo da expressão da ALDH comparativamente à expressão das linhas celulares parentais. A expressão da ALDH nas derivadas aderentes, não se observou alterada significativamente, em relação às linhas parentais (Laranjo *et al.*, 2018). Wang e colaboradores avaliaram a expressão da ALDH em células HeLa e em esferas obtidas dessa linha celular. Também neste estudo a expressão da enzima foi superior comparativamente com a cultura em monocamada (Wang *et al.*, 2016).

Na expressão da ALDH, observada nas populações de esferas das linhas celulares RL95-2 e ECC-1 tratadas com DEAB, não se verificaram diferenças significativas comparativamente às esferas sem tratamento. Os estudos que utilizam o DEAB para inibir a ação da ALDH, descrevem a ação deste composto como específica e que exerce um bloqueio diretamente na atividade da enzima (Croker e Allan, 2012). Em populações de CSC da mama, que expressam uma elevada atividade de ALDH e expressão de CD44, o tratamento com DEAB resultou numa maior sensibilidade à quimio e radioterapia (Croker e Allan, 2012; Moreb, Ucar-Bilyeu e Khan, 2017). Neste trabalho, as populações de CSC da mama pré-tratadas com DEAB, durante 48 horas, apresentaram uma diminuição da capacidade de formar colónias após tratamento com quimioterapia e radioterapia. Este estudo indica que um bloqueio da atividade da ALDH específico pelo DEAB é a chave para a sensibilização às terapêuticas convencionais, de populações celulares que *per se* apresentam resistência. Para uma melhor compreensão da forma como o DEAB influencia a sensibilização à terapêutica, os autores analisaram a expressão de proteínas envolvidas em processos de EMT/diferenciação. As células pré-tratadas com DEAB não mostraram alteração significativa na expressão de proteínas de resistência estudadas. Este resultado sugere que estas proteínas desempenham um papel secundário na resistência à terapêutica mediada pela ALDH, em CSC do cancro da mama, ou que os estudos não foram realizados num intervalo de tempo que permitisse observar mudanças transitórias de expressão nessas proteínas, em resposta ao DEAB (Croker e Allan, 2012). Um estudo de Januchowski e colegas revelou que, células de carcinoma de ovário com expressão elevada de ALDH1, resistentes ao paclitaxel e topotecano e

que sobreexpressam P-gp e BCRP, após pré-tratamento com DEAB, reduziram a resistência à quimioterapia e apresentaram diminuição da expressão da ALDH1 e dos marcadores de resistência (Januchowski *et al.*, 2016a). Estes dados, permitem-nos inferir que a ação deste inibidor é dependente do tipo de cancro e da linha celular em estudo. Consequentemente o tempo de atuação de DEAB pode variar de forma dependente do tipo de culturas celulares. No nosso estudo, o DEAB não alterou a expressão da ALDH em populações de CSC, contudo pode alterar a atividade nestas populações.

As populações de CSC do endométrio, ESI RL95-2 e ESI ECC-1, quando foram submetidas ao DEAB, não apresentaram diferenças na expressão de P53, relativamente a populações de CSC não tratadas. Diversos autores descrevem a avaliação da expressão de P53 em populações tumorais e a forma de como esta proteína está envolvida em mecanismos de resistência apresentados pelas CSC. Mutações no gene supressor tumoral *TP53* são encontradas em aproximadamente 10 a 20% de todos os carcinomas endometrioides, e ocorrem maioritariamente em tumores de alto grau. Aproximadamente 50% dos tumores de grau 3 e tumores de grau 2 raros, contêm mutações de *TP53*, mas não foram identificados em tumores de grau 1 ou em hiperplasia do endométrio (Di Cristofano e Ellenson, 2007).

A proteína P53 regula várias vias (paragem do ciclo celular, apoptose, reparação de DNA, senescência e autofagia) que podem contribuir para a supressão tumoral. Alguns estudos acrescentam a supressão de CSC como uma forma adicional de inibição de tumores pela P53 (Jerry, Tao e Yan, 2008). Num estudo em cancro colorretal, o marcador de CSC, c-KIT sofreu repressão pela P53 através da família do microRNA 34a. A regulação negativa deste marcador, resultou num decréscimo da capacidade de formação de esferas, na resistência à quimioterapia e a um fenótipo de estaminalidade no carcinoma colorretal (Siemens *et al.*, 2013; Shetzer *et al.*, 2014).

Vários estudos demonstraram que tanto a sobreexpressão como a mutação do *TP53* estão associadas a um mau prognóstico (Di Cristofano e Ellenson, 2007). O conceito emergente de que as mutações na P53 desempenham um papel importante na formação de CSC é amplamente apoiada pela correlação entre tumores com mutações na P53 e o seu fenótipo indiferenciado. No carcinoma da tiroide, as mutações da P53 estavam restritas a tumores pouco diferenciados. Particularmente, um tumor mostrou diferentes graus de diferenciação dentro das regiões, e a sobreexpressão de P53 foi restrita a uma área menos diferenciada do tumor. Estudos em tumores pouco diferenciados, sugeriram uma ligação entre mutações na P53, formação de CSC e mau prognóstico (Shetzer *et al.*, 2014).

A perda da função da P53 em tumores de mama está fortemente correlacionada com o fenótipo do tipo basal. Este facto, sugere que estes tumores tenham origem em células estaminais da mama ou que a

perda de P53 permite que as células cancerígenas adquiram propriedades de CSC. Estes resultados favorecem a possibilidade de que a deficiência de P53 permita a expansão de CSC (Jerry, Tao e Yan, 2008).

Foi demonstrado que a P53 reprime a expressão de CD44, que é frequentemente relatada como um marcador CSC e está envolvida na capacidade de metastização das CSC. A repressão de CD44 pela P53 dificultou o potencial tumorigénico das CSC em tumores de pulmão e próstata (Shetzer *et al.*, 2014). Num estudo em cancro da mama, os autores demonstraram que a P53 se ligou ao promotor de CD44 e reprimiu a sua expressão. A expressão constitutiva do marcador CD44, bloqueou a apoptose dependente de p53 e tornou as células resistentes à doxorrubicina. Estes resultados relacionam a perda da função da P53 ao aumento da expressão de CD44, que promove a expansão de CSC (Jerry, Tao e Yan, 2008).

Resposta à terapêutica

Atividade metabólica

A atividade metabólica das células da linha celular de carcinoma do endométrio RL95-2, das esferas ESI RL95-2 e das derivadas aderentes diferenciadas GI RL95-2, obtida através do ensaio de Alamar Blue[®], após incubação com o citostático carboplatina nas concentrações de 200 e de 500 μ M, encontra-se representada na Figura 25. Após 24 horas de incubação com 200 μ M de carboplatina, a atividade metabólica das RL95-2 foi de $74,66 \pm 4,01\%$, das ESI RL95-2 foi de $91,87 \pm 1,87\%$ e das GI RL95-2 foi de $100,11 \pm 7,89\%$. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica da linha celular parental foi de $22,19 \pm 1,97\%$, das ESI RL95-2 foi de $94,54 \pm 1,69\%$, enquanto que das GI RL95-2 foi de $42,83 \pm 1,01\%$. Com o tempo de incubação de 72 horas, a atividade metabólica das ESI RL95-2 foi superior à das restantes populações, de $83,36 \pm 3,62\%$, enquanto que na linha RL95-2 e nas GI RL95-2 foi de $5,29 \pm 1,76\%$ e 0% , respetivamente.

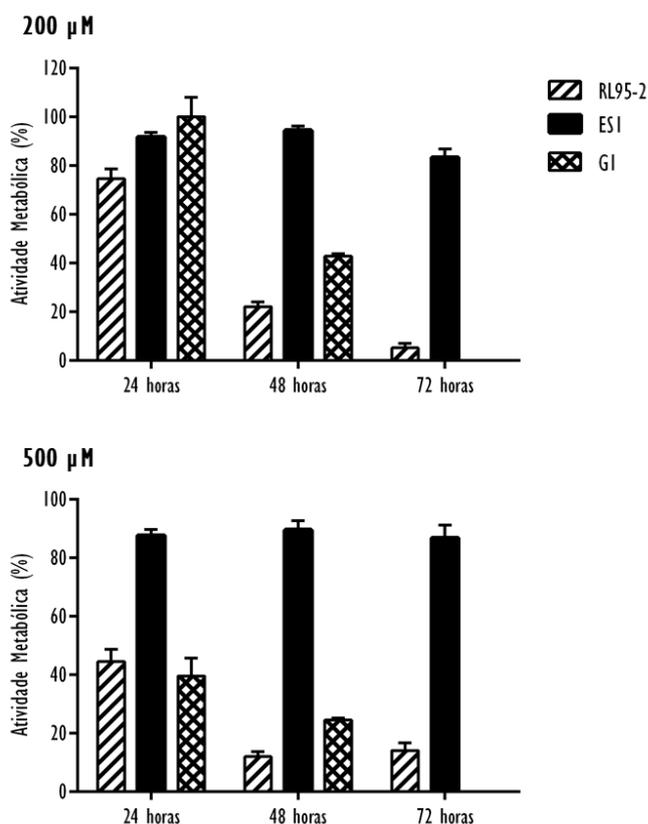


Figura 25 - Atividade metabólica da linha celular RL95-2, das ESI RL95-2 e das GI RL95-2 submetidas a tratamento com carboplatina na concentração de 200 μ M (gráfico superior) e de 500 μ M (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas, obtida através da técnica de Alamar Blue[®]. Os resultados apresentados representam a média e o erro padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado.

Com a concentração de 500 μM de carboplatina, e após 24 horas de incubação, a atividade metabólica da linha celular RL95-2 foi de $44,53 \pm 4,14\%$, das esferas foi de $87,72 \pm 1,99\%$ e das derivadas aderentes foi de $39,65 \pm 6,11\%$. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica das RL95-2 foi de $12,00 \pm 1,68\%$ e das derivadas aderentes foi de $24,65 \pm 0,53\%$, enquanto que a das esferas revelou ser mais elevada, de $89,63 \pm 3,10\%$. Relativamente ao tempo de incubação de 72 horas, a atividade metabólica das RL95-2 foi de $14,12 \pm 2,70\%$ e das GI RL95-2 foi de 0% . Nas ESI RL95-2, a atividade metabólica mostrou-se mais elevada, $86,91 \pm 4,30\%$.

A atividade metabólica das células da linha celular RL95-2, das ESI RL95-2 e das GI RL95-2, obtida após incubação com o paclitaxel nas concentrações de 0,3 μM , de 0,6 μM e de 1,2 μM , pode observar-se na Figura 26.

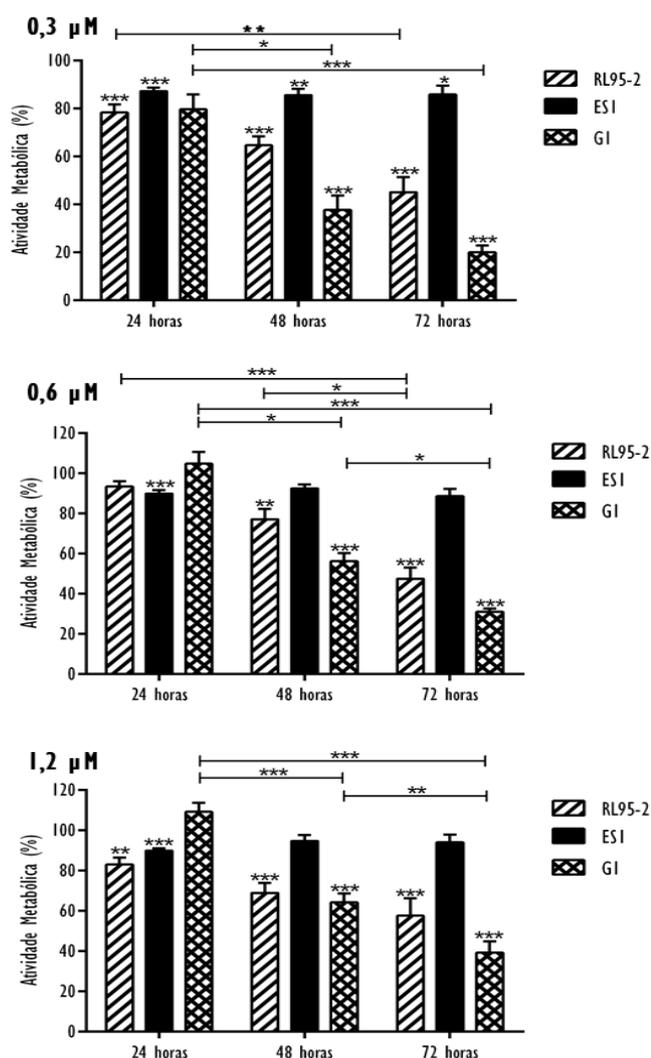


Figura 26 - Atividade metabólica da linha celular RL95-2, das ESI RL95-2 e das GI RL95-2 submetidas a tratamento com paclitaxel na concentração de 0,3 μM (gráfico superior), de 0,6 μM (gráfico do meio) e de 1,2 μM (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas, obtida através da técnica de Alamar Blue[®]. Os resultados apresentados representam a média e o erro padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado. A significância estatística está representada com * para p < 0,050, ** para p < 0,010 e *** para p < 0,001.

Após 24 horas de incubação com 0,3 μM de paclitaxel, a atividade metabólica das RL95-2 diminuiu para $78,42 \pm 3,28\%$ ($p < 0,001$), das ESI RL95-2 para $87,31 \pm 1,48\%$ ($p < 0,001$) e das GI RL95-2 para $79,72 \pm 6,12\%$, em relação ao controlo. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica da linha celular parental decresceu para $64,71 \pm 3,64\%$ ($p < 0,001$), das ESI RL95-2 para $85,63 \pm 2,68\%$ ($p = 0,009$), enquanto que das GI RL95-2 foi para $37,81 \pm 5,87\%$ ($p < 0,001$), comparativamente com o controlo. Já para o tempo de incubação de 72 horas, a atividade metabólica das ESI RL95-2 sofreu um decréscimo para $85,97 \pm 3,60\%$ ($p = 0,045$), enquanto que na linha RL95-2 foi para $45,10 \pm 6,36\%$ ($p < 0,001$) e nas GI RL95-2 foi para $20,12 \pm 2,81\%$ ($p < 0,001$), valores considerados em relação ao controlo.

Com a concentração de 0,6 μM de paclitaxel, e após 24 horas de incubação, a atividade metabólica da linha celular RL95-2 decresceu para $93,53 \pm 2,65\%$, das esferas para $89,99 \pm 1,65\%$ ($p < 0,001$) e das derivadas aderentes aumentou para $104,81 \pm 5,92\%$, em relação ao controlo. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica obtida das RL95-2 sofreu uma diminuição para $77,18 \pm 5,20\%$ ($p = 0,009$) e das derivadas aderentes para $56,28 \pm 3,95\%$ ($p < 0,001$), enquanto que a das esferas revelou ser mais elevada, de $92,55 \pm 2,03\%$, comparativamente ao controlo. Relativamente ao tempo de incubação de 72 horas, a atividade metabólica das RL95-2 e das GI RL95-2 diminuiu para $47,53 \pm 5,53\%$ ($p < 0,001$) e para $31,07 \pm 1,72\%$ ($p < 0,001$), respetivamente e em relação ao controlo. Nas ESI RL95-2, a atividade metabólica mostrou-se mais elevada, de $88,63 \pm 3,58\%$.

Para a concentração de 1,2 μM , após 24 horas de incubação com o paclitaxel, a atividade metabólica das RL95-2 decresceu para $83,14 \pm 3,41\%$ ($p = 0,009$), das ESI RL95-2 para $89,91 \pm 1,18\%$ ($p < 0,001$) e das GI RL95-2 aumentou para $109,22 \pm 4,39\%$, em relação ao controlo. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica obtida das RL95-2 diminuiu para $68,98 \pm 4,95\%$ ($p < 0,001$), das esferas para $94,76 \pm 2,98\%$ e das derivadas aderentes para $64,27 \pm 4,51\%$ ($p < 0,001$), em comparação com o controlo. A atividade metabólica das RL95-2, obtida após 72 horas de incubação, decresceu para $57,63 \pm 8,62\%$ ($p < 0,001$), para $94,08 \pm 3,87\%$ nas ESI RL95-2 e para $39,29 \pm 5,63\%$ ($p < 0,001$) nas GI RL95-2, em relação ao controlo.

A atividade metabólica das células da linha celular RL95-2, das ESI RL95-2 e das GI RL95-2, obtida após incubação com o fármaco doxorrubicina nas concentrações de 0,05 μM , de 0,3 μM e de 7,3 μM , está disponível na Figura 27.

Após 24 horas de incubação com 0,05 μM de doxorrubicina, a atividade metabólica das RL95-2 foi de $92,20 \pm 5,33\%$, das ESI RL95-2 foi de $91,45 \pm 2,10\%$ e das GI RL95-2 foi de $93,24 \pm 5,71\%$. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica da linha celular foi de $84,53 \pm 5,81\%$, das ESI RL95-2 foi de $96,64 \pm 2,26\%$, enquanto que das GI RL95-2 foi de $75,71 \pm 4,73\%$. Já para o tempo de incubação de 72

horas, a atividade metabólica das ESI RL95-2 foi de $90,37 \pm 3,57\%$, enquanto que na linha RL95-2 e GI RL95-2 foi de $71,24 \pm 4,36\%$ e $66,27 \pm 6,77\%$, respetivamente.

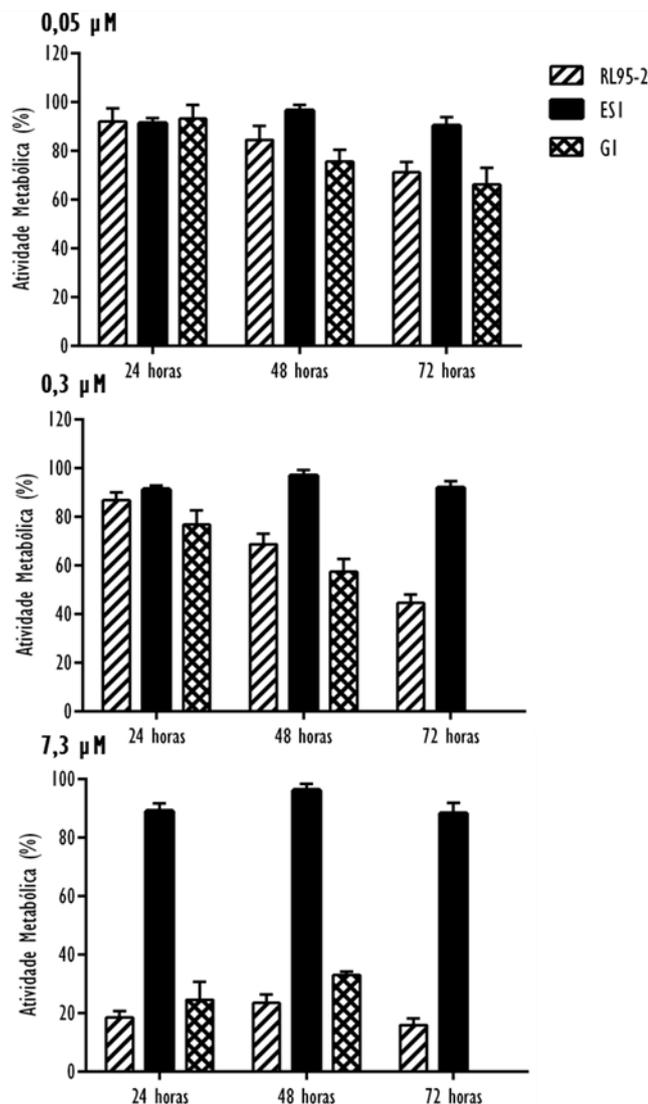


Figura 27 - Atividade metabólica da linha celular RL95-2, das ESI RL95-2 e das GI RL95-2 submetidas a tratamento com doxorubicina na concentração de 0,05 μM (gráfico superior), de 0,3 μM (gráfico do meio) e de 7,3 μM (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas, obtida através da técnica de Alamar Blue®. Os resultados apresentados representam a média e o erro padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado.

Com a concentração de 0,3 μM de doxorubicina, e após 24 horas de incubação, a atividade metabólica da linha celular RL95-2 foi de $86,97 \pm 3,05\%$, das esferas foi de $91,33 \pm 1,54\%$ e das derivadas aderentes foi de $76,89 \pm 5,75\%$. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica obtida das RL95-2 foi de $68,78 \pm 4,32\%$ e das derivadas aderentes foi de $57,40 \pm 5,39\%$, enquanto que a das esferas revelou ser mais elevada, de $97,02 \pm 2,31\%$. Relativamente ao tempo de incubação de 72 horas, a atividade metabólica

das RL95-2 e das GI RL95-2 foi de $44,66 \pm 3,39\%$ e de 0% , respetivamente. Nas ESI RL95-2, a atividade metabólica foi superior, de $91,96 \pm 2,74\%$.

Para a concentração de $7,3 \mu\text{M}$, após 24 horas de incubação com a doxorrubicina, a atividade metabólica das RL95-2 foi de $18,53 \pm 2,22\%$, das ESI RL95-2 foi de $89,16 \pm 2,51\%$ e das GI RL95-2 foi de $24,59 \pm 6,15\%$. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica obtida das RL95-2 foi de $23,51 \pm 2,87\%$, das esferas foi de $96,26 \pm 2,17\%$ e das derivadas aderentes foi de $33,13 \pm 1,12\%$. A atividade metabólica das RL95-2, obtida após 72 horas de incubação, foi de $15,92 \pm 2,40\%$, foi de $88,35 \pm 3,60\%$ para as ESI RL95-2 e foi de 0% para as GI RL95-2.

A atividade metabólica das populações celulares RL95-2 e GI RL95-2 após incubação com a carboplatina nas concentrações de 200 e de $500 \mu\text{M}$, encontra-se representada na Figura 28.

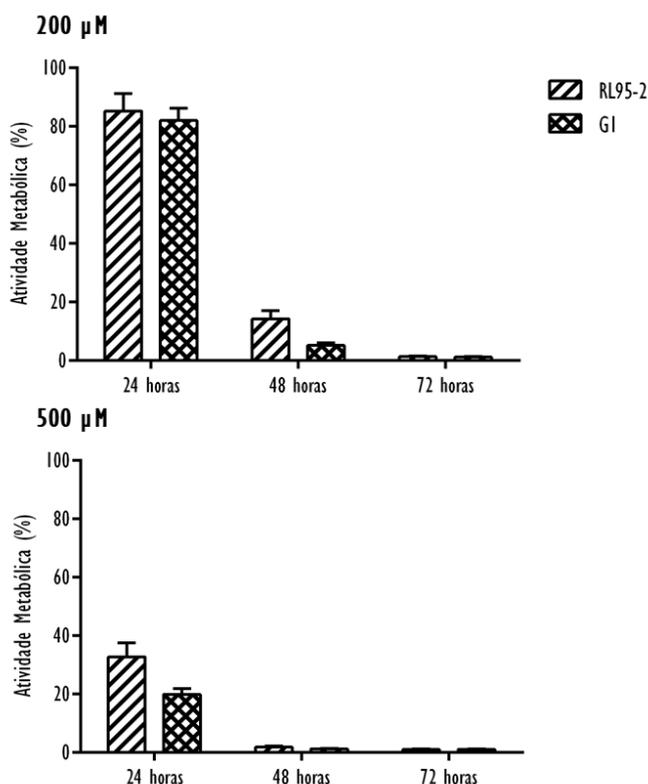


Figura 28 - Atividade metabólica da linha celular RL95-2 e das GI RL95-2 após tratamento com carboplatina na concentração de $200 \mu\text{M}$ (gráfico superior) e de $500 \mu\text{M}$ (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas, obtida através do ensaio de MTT. Os valores apresentados representam a média e o erro padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado.

Nos ensaios de MTT realizados após 24 horas de incubação com $200 \mu\text{M}$ de carboplatina, a atividade metabólica das RL95-2 foi de $85,25 \pm 6,08\%$ e das GI RL95-2 foi de $82,00 \pm 4,29\%$. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica da linha celular parental foi de $14,30 \pm 2,80\%$, enquanto que das GI RL95-2 foi de $5,17 \pm 0,98\%$. Com incubação de 72 horas, a atividade metabólica da linha RL95-2 e GI RL95-2 foi de $1,37 \pm 0,23\%$ e $1,19 \pm 0,20\%$, respetivamente. Quando submetidas a $500 \mu\text{M}$ de carboplatina

e após 24 horas de incubação, a atividade metabólica das células RL95-2 foi de $32,79 \pm 4,78\%$ e das derivadas aderentes foi de $19,94 \pm 2,05\%$. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica da linha celular foi de $1,88 \pm 0,29\%$, enquanto que das GI RL95-2 foi de $1,25 \pm 0,23\%$. Para o tempo de incubação de 72 horas, a atividade metabólica da linha RL95-2 foi de $1,04 \pm 0,26\%$ e de $1,14 \pm 0,11\%$ nas GI RL95-2.

A atividade metabólica das populações celulares RL95-2 e GI RL95-2 após incubação com paclitaxel nas concentrações de $0,3 \mu\text{M}$, de $0,6 \mu\text{M}$ e de $1,2 \mu\text{M}$, encontra-se representada na Figura 29.

Após 24 horas de incubação com $0,3 \mu\text{M}$ de paclitaxel, a atividade metabólica das RL95-2 decresceu para $83,89 \pm 3,00\%$ ($p=0,006$) e das GI RL95-2 para $88,22 \pm 2,36\%$ ($p=0,006$), em relação ao controlo. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica da linha celular diminuiu para $66,28 \pm 5,31\%$ ($p=0,006$), enquanto que nas GI RL95-2 foi para $48,91 \pm 3,25\%$ ($p<0,001$), comparativamente ao controlo. Para o tempo de incubação de 72 horas, a atividade metabólica das células RL95-2 decresceu para $51,63 \pm 3,19\%$ ($p<0,001$) e das GI RL95-2 para $29,58 \pm 1,61\%$ ($p<0,001$), em relação ao controlo.

Com a concentração de $0,6 \mu\text{M}$ de paclitaxel, e após 24 horas de incubação, a atividade metabólica da linha celular RL95-2 sofreu um decréscimo para $89,49 \pm 3,47\%$ e das derivadas aderentes para $85,94 \pm 2,20\%$ ($p<0,001$), em comparação com o controlo. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica obtida das RL95-2 diminuiu para $69,99 \pm 6,91\%$ ($p=0,030$) e das derivadas aderentes para $50,61 \pm 3,38\%$ ($p<0,001$), em relação ao controlo. Relativamente ao tempo de incubação de 72 horas, a atividade metabólica das RL95-2 diminuiu para $50,88 \pm 3,29\%$ ($p<0,001$) e das GI RL95-2 para $28,05 \pm 1,47\%$ ($p<0,001$), em relação ao controlo.

Para a concentração de $1,2 \mu\text{M}$, após 24 horas de incubação com o paclitaxel, a atividade metabólica das RL95-2 foi de $96,05 \pm 2,18\%$ e das GI RL95-2 foi de $79,12 \pm 3,29\%$ ($p<0,001$), comparativamente ao controlo. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica obtida das RL95-2 foi de $67,18 \pm 8,57\%$ ($p=0,030$) e das derivadas aderentes foi de $42,36 \pm 2,69\%$ ($p<0,001$), em relação ao controlo. A atividade metabólica das RL95-2, obtida após 72 horas de incubação, foi de $50,49 \pm 4,48\%$ ($p<0,001$) e foi de $22,38 \pm 1,62\%$ ($p<0,001$) para as GI RL95-2, em comparação com o controlo.

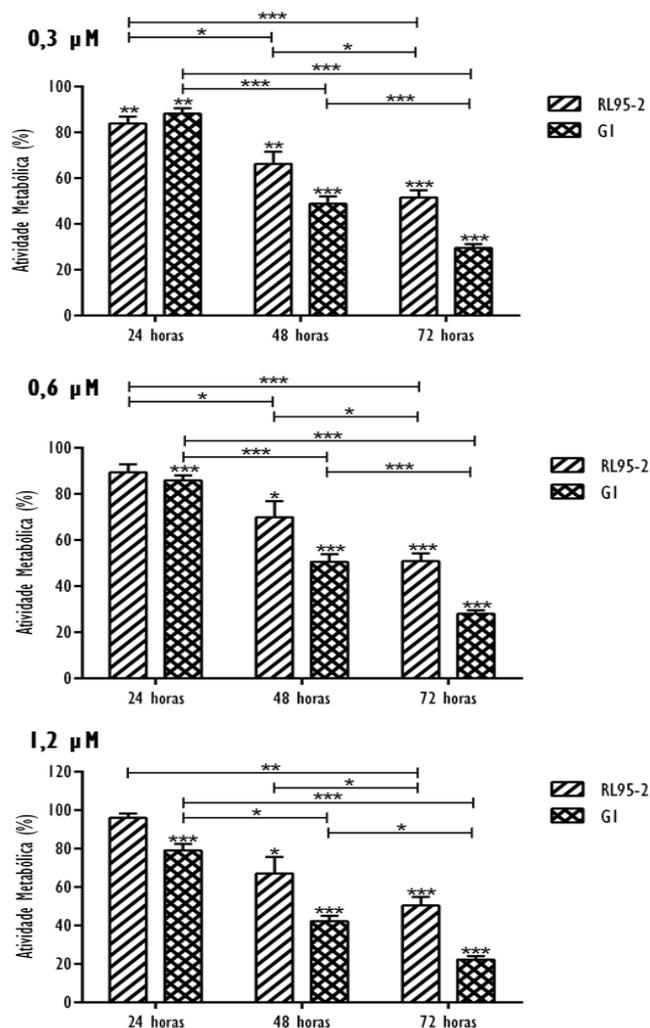


Figura 29 - Atividade metabólica da linha celular RL95-2 e das GI RL95-2 submetidas a tratamento com paclitaxel na concentração de 0,3 μM (gráfico superior), de 0,6 μM (gráfico do meio) e de 1,2 μM (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas, obtida através do ensaio de MTT. Os valores apresentados representam a média e o erro padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado. A significância estatística está representada com * para $p < 0,050$, ** para $p < 0,010$ e *** para $p < 0,001$.

Na Figura 30 está representada a atividade metabólica das células da linha celular RL95-2 e das derivadas aderentes, obtida após incubação com doxorrubicina nas concentrações de 0,05 μM, de 0,3 μM e de 7,3 μM.

Após 24 horas de incubação com 0,05 μM de doxorrubicina, a atividade metabólica das RL95-2 foi de $94,24 \pm 3,12\%$ e das GI RL95-2 foi de $99,42 \pm 3,55\%$. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica da linha celular foi de $77,73 \pm 3,13\%$, enquanto que das GI RL95-2 foi de $94,79 \pm 3,85\%$. Com o tempo de incubação de 72 horas, a atividade metabólica das ESI RL95-2 foi de $84,28 \pm 1,77\%$ e das GI RL95-2 foi de $71,69 \pm 2,86\%$.

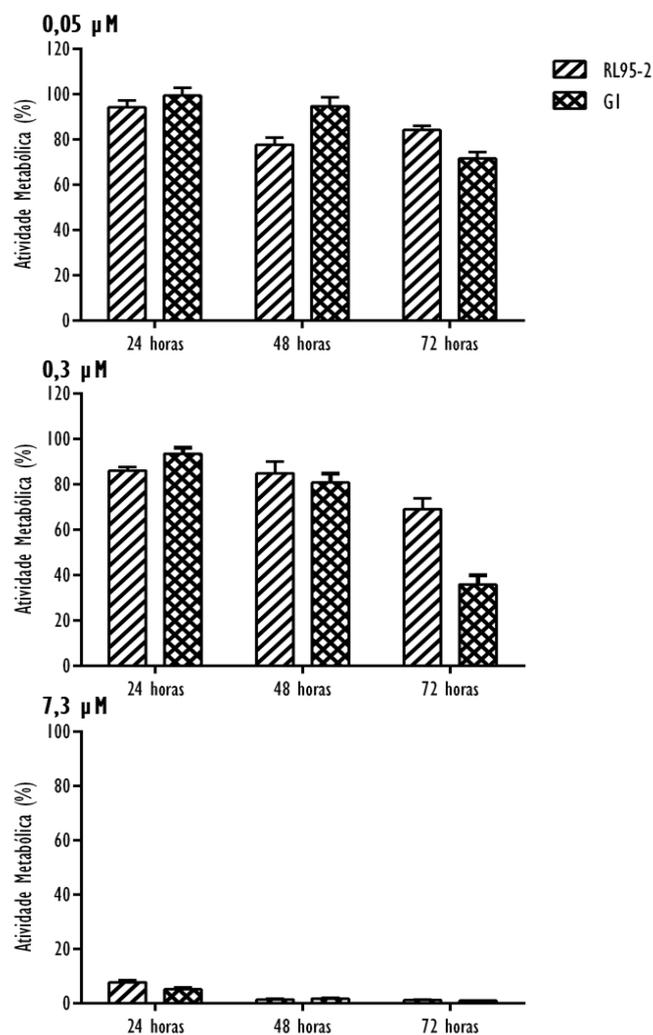


Figura 30 - Atividade metabólica da linha celular RL95-2 e das GI RL95-2 submetidas a tratamento com doxorubicina na concentração de 0,05 μM (gráfico superior), de 0,3 μM (gráfico do meio) e de 7,3 μM (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas, obtida através do ensaio de MTT. Os valores apresentados representam a média e o erro padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado.

Na concentração de 0,3 μM de doxorubicina, e após 24 horas de incubação, a atividade metabólica da linha celular RL95-2 foi de $86,16 \pm 1,55\%$ e das derivadas aderentes foi de $93,59 \pm 2,53\%$. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica obtida das RL95-2 foi de $84,94 \pm 5,23\%$ e das derivadas aderentes foi de $80,81 \pm 4,09\%$. Relativamente ao tempo de incubação de 72 horas, a atividade metabólica das RL95-2 e das GI RL95-2 foi de $69,12 \pm 4,81\%$ e de $35,93 \pm 4,04\%$, respetivamente.

Para a concentração de 7,3 μM, após 24 horas de incubação com a doxorubicina, a atividade metabólica das RL95-2 foi de $7,67 \pm 0,91\%$ e das GI RL95-2 foi de $5,18 \pm 0,67\%$. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica obtida das RL95-2 foi de $1,48 \pm 0,27\%$ e das derivadas aderentes foi de $1,76 \pm 0,35\%$. A atividade metabólica das RL95-2, obtida após 72 horas de incubação, foi de $1,27 \pm 0,22\%$ e foi de $1,06 \pm 0,07\%$ para as GI RL95-2.

Morte celular e resistência à terapêutica

Morte celular

Os resultados da avaliação dos níveis da caspase 3 nas populações RL95-2 e ECC-1, ESI RL95-2 e ESI ECC-1 e GI RL95-2 e GI ECC-1, submetidas ao tratamento com carboplatina na concentração de 500 μM , com paclitaxel na concentração de 0,3 μM e com doxorubicina na concentração de 0,3 μM , durante 24 horas, estão representados na Figura 31, na Figura 32 e na Figura 33, respetivamente.

Considerando o tratamento com carboplatina, as linhas celulares RL95-2 e ECC-1, apresentaram níveis de caspase 3 de $6,08 \pm 0,26$ e de $4,17 \pm 0,89$, em relação ao controlo. As populações de esferas, de RL95-2 e de ECC-1, apresentaram níveis de $1,023 \pm 0,143$ e $1,490 \pm 0,193$, respetivamente e em relação ao controlo. As derivadas aderentes, da linha celular RL95-2, apresentaram um aumento de caspase de $4,250 \pm 0,346$ ($p=0,018$) em relação ao controlo. A população GI ECC-1, apresentou um nível de $3,717 \pm 0,776$, comparativamente ao controlo. Os níveis de caspase 3 das esferas RL95-2 foram menores que a linha parental ($p=0,009$).

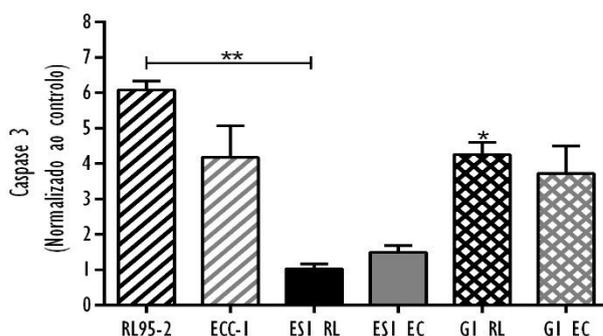


Figura 31 - Níveis de caspase 3 expressos pelas linhas celulares RL95-2 e ECC-1, ESI RL95-2, ESI ECC-1 e derivadas aderentes de ambas as linhas celulares após tratamento com carboplatina. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação ao controlo (células não tratadas), ao qual se considerou o valor de expressão 1. Os valores apresentados são referentes a pelo menos três experiências independentes. A significância estatística está representada com * para $p < 0,050$ e ** para $p < 0,010$.

As linhas celulares RL95-2 e ECC-1, quando submetidas ao paclitaxel, apresentaram níveis de caspase 3 de $2,063 \pm 0,435$ e de $1,990 \pm 0,474$, respetivamente e em relação ao controlo. As populações de esferas, de RL95-2 e de ECC-1, apresentaram níveis de $1,023 \pm 0,143$ e $1,490 \pm 0,193$, respetivamente e em relação ao controlo. As derivadas aderentes, da linha celular RL95-2, apresentaram um nível de caspase 3 de $4,250 \pm 0,346$ e a população GI ECC-1, apresentou um nível de $3,717 \pm 0,776$, comparativamente ao controlo.

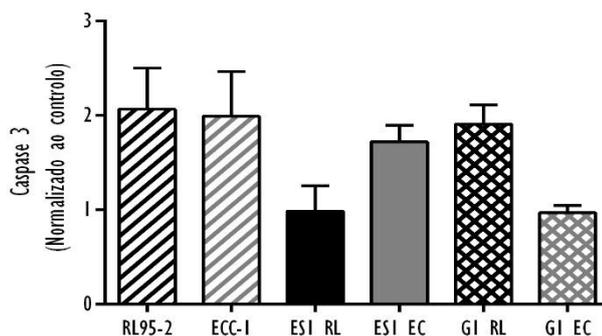


Figura 32 - Níveis de caspase 3 expressos pelas linhas celulares RL95-2 e ECC-I, ESI RL95-2, ESI ECC-I e derivadas aderentes de ambas as linhas celulares após tratamento com paclitaxel. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação ao controlo (células não tratadas), ao qual se considerou o valor de expressão 1. Os valores apresentados são referentes a pelo menos três experiências independentes.

As linhas celulares RL95-2 e ECC-I, quando submetidas a tratamento com doxorrubicina, apresentaram níveis de caspase 3 de $1,027 \pm 0,108$ e de $0,938 \pm 0,107$, em relação ao controlo. As populações de esferas, de RL95-2 e de ECC-I, apresentaram níveis de $0,967 \pm 0,179$ e $1,345 \pm 0,100$, respetivamente e em relação ao controlo. As derivadas aderentes, da linha celular RL95-2, apresentaram um nível de caspase 3 de $0,978 \pm 0,114$ e a população GI ECC-I, apresentou um nível de $0,411 \pm 0,160$, comparativamente ao controlo.

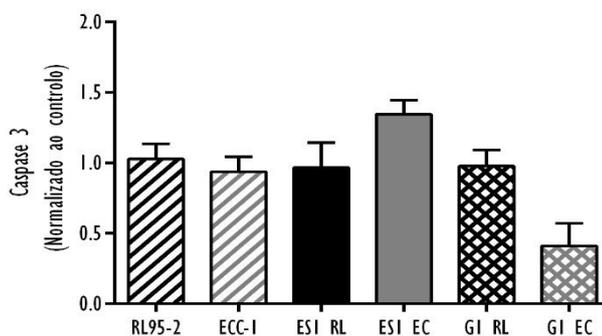


Figura 33 - Níveis de caspase 3 expressos pelas linhas celulares RL95-2 e ECC-I, ESI RL95-2, ESI ECC-I e derivadas aderentes de ambas as linhas celulares após tratamento com doxorrubicina. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação ao controlo (células não tratadas), ao qual se considerou o valor de expressão 1. Os valores apresentados são referentes a pelo menos três experiências independentes.

Expressão de ALDH e de P53

A expressão da ALDH foi avaliada na linha celular RL95-2, nas esferas ESI RL95-2 e nas GI RL95-2, populações celulares submetidas à carboplatina na concentração de $500 \mu\text{M}$, ao paclitaxel na concentração de $0,3 \mu\text{M}$ e à doxorrubicina na concentração de $0,3 \mu\text{M}$, por um período de incubação de 24 horas. Os resultados obtidos estão representados na Figura 34.

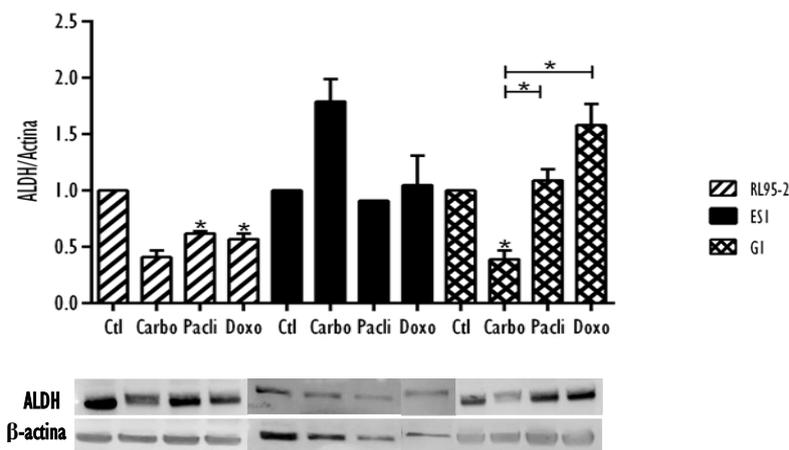


Figura 34 - Expressão de ALDH nas células RL95-2, ESI RL95-2 e GI RL95-2, após 24 horas de incubação com carboplatina, paclitaxel e doxorubicina. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da ALDH e da actina. Os gráficos representam a alteração relativamente às populações controlo (razão ALDH/actina do controlo igual a 1). Os valores apresentados exprimem a média e o erro-padrão de pelo menos um ensaio. A significância estatística está representada com * para $p < 0,050$.

Com o tratamento com carboplatina, a expressão da ALDH na linha RL95-2 foi de $0,41 \pm 0,06$, nas esferas de $1,79 \pm 0,20$ e nas derivadas aderentes a expressão decresceu para $0,39 \pm 0,08$ ($p=0,012$), em relação ao controlo. A linha RL95-2, quando submetida ao paclitaxel, apresentou uma diminuição da expressão da enzima para $0,62 \pm 0,02$ ($p=0,012$), nas esferas a expressão foi de $0,91 \pm 0,00$ e nas derivadas aderentes foi de $1,09 \pm 0,10$, comparativamente ao controlo. No tratamento com doxorubicina, a expressão da ALDH na linha parental sofreu uma diminuição para $0,57 \pm 0,05$ ($p=0,018$), nas esferas a expressão foi de $1,05 \pm 0,26$ e nas derivadas aderentes foi de $1,58 \pm 0,19$, em relação ao controlo. A diminuição da expressão da ALDH nas derivadas aderentes, tratadas com carboplatina, foi superior à observada no tratamento com paclitaxel ($p=0,016$) e doxorubicina ($p=0,016$).

Na

Figura 35, está representada a expressão de P53 avaliada nas populações RL95-2, nas esferas ESI RL95-2 e nas GI RL95-2, submetidas à carboplatina, paclitaxel e doxorubicina, nas concentrações de 500 μM , de 0,3 μM e de 0,3 μM , respetivamente, por um período de incubação de 24 horas.

Com o tratamento com carboplatina, a expressão da P53 na linha RL95-2 decresceu para $0,42 \pm 0,04$ ($p=0,024$), nas esferas a expressão obtida foi de $0,77 \pm 0,0,7$ e nas derivadas aderentes foi de $0,30 \pm 0,07$, em relação ao controlo. A linha RL95-2, quando submetida ao paclitaxel, apresentou uma expressão da enzima de $0,75 \pm 0,08$ e nas derivadas aderentes foi de $0,64 \pm 0,09$, comparativamente ao controlo. No tratamento com doxorubicina, a expressão da P53 na linha parental foi de $0,81 \pm 0,16$, nas esferas a expressão foi de $1,15 \pm 0,00$ e nas derivadas aderentes foi de $0,95 \pm 0,06$, em relação ao controlo.

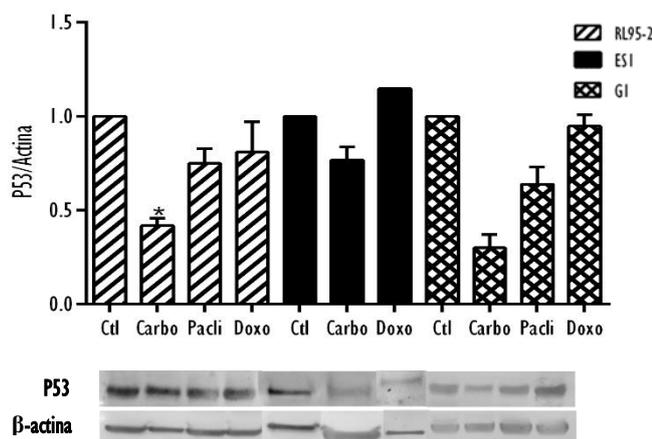


Figura 35 - Expressão de P53 nas populações RL95-2, ESI RL95-2 e GI RL95-2, após 24 horas de incubação com carboplatina, paclitaxel e doxorrubicina. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da P53 e da actina. Os gráficos representam a alteração relativamente às populações controlo (razão P53/actina do controlo igual a 1). Os resultados apresentados exprimem a média e o erro-padrão de pelo menos um ensaio. A significância estatística está representada com * para $p < 0,050$.

Genotoxicidade

Na Figura 36, estão representadas algumas imagens dos cometas obtidos com o ensaio de genotoxicidade, realizado nas populações RL95-2, ESI RL95-2 e GI RL95-2, submetidas ao tratamento de quimioterapia. Os fármacos utilizados foram a carboplatina na concentração de $500 \mu\text{M}$ e o paclitaxel e a doxorrubicina ambos na concentração de $0,3 \mu\text{M}$, para um tempo de incubação de 24 horas.

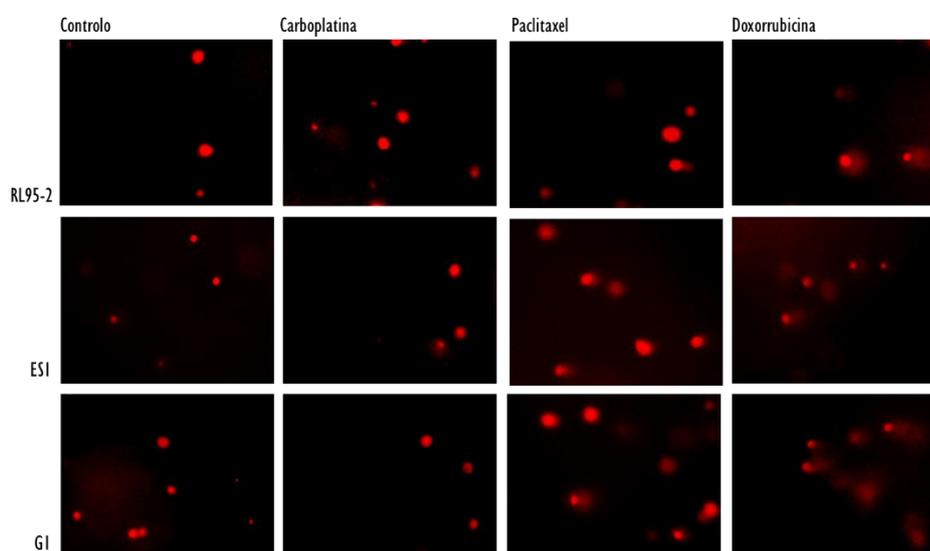


Figura 36 - Imagens representativas dos cometas obtidos nas células RL95-2, ESI RL95-2 e GI RL95-2, submetidas a tratamento com carboplatina, paclitaxel e doxorrubicina, durante 24 horas. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 100x.

Na Tabela 5, apresentam-se os percentis 90 (P90) das condições estudadas. Na linha RL95-2, o momento da cauda aumentou significativamente nas culturas celulares tratadas com os três fármacos em

estudo ($p < 0,001$). Nas populações de esferas e de derivadas aderentes, só o tratamento com doxorubicina apresentou um aumento significativo do momento da cauda, comparativamente às esferas controlo ($p < 0,001$).

Tabela 5 - P90 do momento da cauda dos cometas da linha celular RL95-2, nas ESI RL95-2 e nas GI RL95-2 após o tratamento com carboplatina, paclitaxel e doxorubicina.

Populações	Controlo	Carboplatina	Paclitaxel	Doxorubicina
RL95-2	0,603	2,696	2,775	9,112
ESI RL95-2	0,715	1,256	3,474	7,796
GI RL95-2	0,297	1,452	4,648	8,224

O momento da cauda de todas as populações tumorais do endométrio em estudo, apresentaram um aumento significativo quando submetidas à doxorubicina, comparativamente com o das populações tratadas com carboplatina e com paclitaxel ($p < 0,001$). A linha celular RL95-2, quando tratada com paclitaxel ($p = 0,013$) e com doxorubicina ($p = 0,029$), apresentou um aumento do momento da cauda em relação às esferas submetidas ao mesmo tratamento.

Discussão

Uma melhor compreensão da carcinogénese, fatores iniciadores e progressão tumoral, poderá contribuir para uma melhor estratificação prognóstica do carcinoma endometrial, que atualmente se baseia no estadiamento cirúrgico, no grau de diferenciação do tumor, na invasão do espaço linfático vascular, entre outros (Moxley e McMeekin, 2010).

Atualmente, a quimioterapia representa a melhor abordagem terapêutica para mulheres com carcinoma endometrial em estágio inicial de alto risco ou em mulheres que apresentem doença avançada ou recorrente (Liu e Li, 2015; Gentilin *et al.*, 2017). Os regimes de quimioterapia descritos para o tratamento do cancro do endométrio incluem os taxanos, as antraciclinas e os análogos da platina, nomeadamente, o paclitaxel, a doxorubicina e a carboplatina ou a cisplatina, que revelaram ser os agentes mais ativos (Moxley e McMeekin, 2010; Chitcholtan, Sykes e Evans, 2012; Byron, Loch e Pollock, 2012). As taxas de resposta destes fármacos usados em monoterapia variam entre 20 e 30%, podendo aumentar para cerca de 57%, quando administrados em combinação (Byron, Loch e Pollock, 2012). Dois estudos demonstraram uma maior taxa de resposta com a combinação de cisplatina e doxorubicina, embora com menor efeito sobre a sobrevivência livre de doença e a sobrevivência global, do que apenas com o uso da doxorubicina. À

semelhança destes estudos, outros também revelaram uma maior taxa de resposta à terapêutica combinada em relação à monoterapia (Moxley e McMeekin, 2010). Na atualidade, a combinação de paclitaxel e carboplatina é considerada o regime padrão para o tratamento do carcinoma endometrial, tendo por base um perfil de toxicidade aceitável e boas taxas de resposta (Liu e Li, 2015).

A avaliação da toxicidade de um fármaco em diversos tipos de células pode ser realizada através de ensaios de citotoxicidade *in vitro* (Hamid *et al.*, 2004). O uso da cultura de células na investigação básica de compostos com potencial terapêutico pode ser um rastreio inicial da sua eficácia numa determinada patologia. A obtenção de resultados precisos e confiáveis nestes ensaios de citotoxicidade *in vitro* em estudos pré-clínicos é de extrema importância, pois podem influenciar de forma direta o sucesso de um fármaco como opção terapêutica para uma determinada doença (Van Tonder, Joubert e Cromarty, 2015).

Neste trabalho experimental, avaliou-se a sensibilidade das populações tumorais do endométrio, a linha celular RL95-2, as esferas ES1-RL95-2 e as derivadas aderentes GI RL95-2, aos fármacos carboplatina, paclitaxel e doxorrubicina, através dos ensaios de MTT e de Alamar Blue[®]. O uso de Alamar Blue[®] baseia-se na capacidade das enzimas celulares reduzirem o corante azul não fluorescente transformando-o num composto fluorescente rosa, permitindo a deteção do crescimento celular por espectrofluorometria e espectrofotometria. O MTT é reduzido pelas desidrogenases mitocondriais que clivam o sal de tetrazólio amarelo em cristais de formazano de cor púrpura. Diminuições quimicamente induzidas na fluorescência azul do Alamar e na absorbância do MTT são frequentemente interpretadas como indicativas de dano mitocondrial (Gonzalez e Tarloff, 2001; Kim e Alexander, 2014).

A atividade metabólica da linha celular RL95-2 obtida após tratamento com a menor concentração de carboplatina estudada, correspondente a 200 μM , avaliada através do ensaio de Alamar Blue[®], revelou ser menor do que a atividade metabólica das derivadas aderentes GI RL95-2, para os tempos de incubação de 24 e 48 horas. Na concentração de 500 μM , apenas às 48 horas, a atividade metabólica celular das células RL95-2 revelou ser menor comparativamente com as GI RL95-2. Com o ensaio de MTT, a atividade metabólica da linha celular revelou ser ligeiramente mais elevada do que a das GI RL95-2, ainda que sem diferenças significativas, para ambas as concentrações de carboplatina estudadas e em todos os tempos de incubação. Estes resultados obtidos revelam que a linha celular RL95-2 e as derivadas aderentes GI RL95-2 apresentam sensibilidade ao tratamento com carboplatina, ainda que dependente da concentração e tempos de incubação estudados.

Outros autores realizaram estudos de resposta à terapêutica com fármacos derivados da platina em células tumorais do endométrio. No estudo de Chitcholtan e colaboradores, a cisplatina apresentou efeitos limitados na redução da viabilidade das linhas celulares de carcinoma do endométrio, Ishikawa e KLE, e

diminui ligeiramente a viabilidade da linha celular RL95-2 (Chitcholtan, Sykes e Evans, 2012). Noutro estudo, os autores avaliaram os efeitos da cisplatina na viabilidade celular da linha celular do endométrio, AN3 CA. A cisplatina reduziu significativamente a viabilidade celular em 37 e 64% para as concentrações de 16 e 64 μM , respetivamente. Após 48 e 72 horas de incubação, a cisplatina reduziu a viabilidade celular em 39 e 69%, respetivamente, com a concentração de 4 μM (Gentilin *et al.*, 2017). De igual forma, os autores avaliaram os efeitos da cisplatina na linha celular de cancro do endométrio, HEC-1A. A cisplatina reduziu significativamente a viabilidade celular e 43% com a concentração de 64 μM , após 48 horas de incubação. Com a concentração de 32 μM , ocorreu uma redução da viabilidade celular de 45%, após 72 horas de incubação (Gentilin *et al.*, 2017). No trabalho de Chon e colaboradores, trataram oito linhas celulares de cancro do endométrio, Ishikawa, MFE296, RL95-2, AN3 CA, KLE, MFE280, HEC-1A e MFE319, com cisplatina durante 72 horas e avaliaram a viabilidade celular através do ensaio de MTS. Neste estudo, os IC50 obtidos variaram entre $22,9 \pm 3,62$ e $383,7 \pm 36,79$ μM , tendo sido obtido o valor de IC50 de $28,9 \pm 4,31$ μM para a linha RL95-2 (Chon *et al.*, 2012), corroborando a sensibilidade obtida com os nossos estudos.

A população de esferas, ESI RL95-2, apresentou um aumento da atividade metabólica em relação às populações aderentes, independente da concentração e do tempo de incubação, o que sugere que esta população de CSC do endométrio apresenta resistência ao tratamento com carboplatina. As esferas obtidas da linha ECC-1, não apresentaram diferenças significativas de atividade metabólica em relação à linha parental, quando submetidas à carboplatina. Diversos mecanismos intracelulares foram descritos para descrever a resistência à carboplatina, mecanismos esses que incluem o aumento da destoxificação de fármacos pelos grupos tiol em metalotioneínas e glutationas, reparação e aumento da tolerância a danos no núcleo, que resultam numa redução concomitante no processo apoptótico e na acumulação de carboplatina intracelular (De Sousa, Wlodarczyk e Monteiro, 2014).

O sistema de reparação de incompatibilidade de DNA é um importante mecanismo de replicação que evita erros causados por mutações. Este sistema de reparação baseia-se no reconhecimento da deformação do DNA causada pela presença de 6-tioguanina e adutos produzidos pela carboplatina, que gera um sinal de lesão que pode contribuir para o início da apoptose. A perda deste mecanismo de reparação pode causar resistência à carboplatina devido à incapacidade de reconhecer o complexo formado pelos adutos de DNA com fármacos derivados de platina. Estudos relataram que a perda de proteínas deste sistema de reparação está associada à resistência a fármacos em tumores do ovário. A metilação no promotor MLH1 (parte reguladora de um gene do sistema de reparação) desempenha um papel importante na resistência à cisplatina em células de cancro do ovário (De Sousa, Wlodarczyk e Monteiro, 2014).

A reparação por excisão de nucleótidos (NER, do inglês *Nucleotide excision repair*) desempenha um papel fundamental na mediação da resistência a fármacos à base de platina. Lesões que resultam em alterações na estrutura helicoidal do DNA e interferem no mecanismo de replicação e transcrição são reparadas por esta via. Duas importantes moléculas envolvidas na síntese e reparação de danos do DNA, ERCCI (do inglês, *Excision repair cross-complementing gene 1*) e RRM1 (do inglês, *ribonucleotide reductase M1*), têm sido associadas à eficácia do tratamento com fármacos derivados da platina. O trabalho de Selvakumaran e colaboradores, revelou que duas linhas celulares de cancro do ovário resistentes à cisplatina mostraram um aumento da sensibilidade ao fármaco após o silenciamento da expressão da proteína ERCCI através do uso de RNA de interferência (De Sousa, Wlodarczyk e Monteiro, 2014; Selvakumaran *et al.*, 2003).

A difusão passiva simples tem sido descrita como a forma das células tumorais internalizarem os fármacos derivados da platina. Alguns estudos sugerem que diversos mecanismos de absorção e efluxo estão envolvidos neste processo e que alterações na regulação destes transportadores são responsáveis pela expulsão dos fármacos em células resistentes (Hall *et al.*, 2008). Elevados níveis de ATP7A e ATP7B estão associados a uma resposta modesta em doentes com cancro do ovário submetidos a tratamento à base de cisplatina e carboplatina. Um estudo de Li e colaboradores demonstrou que a sobreexpressão de ATP7A em células de cancro do pulmão de não pequenas células confirmou resistência à terapêutica com análogos da platina (De Sousa, Wlodarczyk e Monteiro, 2014; Li *et al.*, 2012).

Na avaliação da atividade metabólica das populações tumorais do endométrio aderentes tratadas com paclitaxel, observou-se que a sensibilidade ao fármaco aumenta com o aumento do tempo de incubação. A citotoxicidade do paclitaxel em células tumorais do endométrio foi também estudada por outros autores. Um estudo anterior, realizado no nosso grupo de investigação, revelou que a linha celular ECC-1 e as derivadas aderentes apresentaram sensibilidade ao tratamento com paclitaxel, independentemente da concentração de fármaco e do tempo de incubação estudados (Carvalho, 2015). Gentilin e colaboradores avaliaram o efeito do paclitaxel nas linhas celulares de cancro do endométrio AN3 CA e HEC-1A. Na linha AN3 CA, após 48 e 72 horas de incubação, ocorreu uma diminuição da viabilidade celular de 35% e 52% em relação ao controlo, com as concentrações 12,5 nM e 3 nM de paclitaxel, respetivamente. Na linha celular HEC-1A, após 24 horas, o paclitaxel na concentração de 25 nM, reduziu a viabilidade celular em 24% em relação ao controlo. Para a concentração de 12,5 nM e após 48 horas de incubação, o decréscimo da viabilidade celular foi de 32%, e após 72 horas, na concentração de 6 nM, a diminuição foi de 41%, relativamente ao controlo (Gentilin *et al.*, 2017). No trabalho de Byron e colaboradores, a citotoxicidade do paclitaxel nas linhas celulares de cancro do endométrio, AN3 CA, MFE280, MFE296, HEC-1A, Ishikawa e

KLE foi avaliada através do ensaio de SRB, durante 72 horas. Os autores relataram valores de IC50 que variaram entre 2 nM e 38,4 nM, que correspondem a concentrações relativamente baixas de paclitaxel, o que revela sensibilidade das células tumorais do endométrio ao fármaco (Byron, Loch e Pollock, 2012). Uma análise de *microarrays* de expressão génica em vinte linhas de cancro do endométrio realizada por Kharma e colaboradores, para avaliação de suscetibilidade destas linhas celulares ao tratamento com paclitaxel, revelou uma suscetibilidade de sensibilidade elevada das células da linha celular RL95-2 ao fármaco (Kharma *et al.*, 2013). Noutro estudo, quatro linhas celulares de carcinoma endometrial, HEC-1A, JEC, AN3CA e Ishikawa, foram utilizadas para o estudo da resistência ao paclitaxel. Os valores de IC50 foram determinados através do ensaio de MTT. Após exposição ao paclitaxel durante 24 horas, o IC50 das células HEC-1A, JEC, AN3CA e Ishikawa foi de $19,14 \pm 3,16$ µg/ml, $10,39 \pm 0,55$ µg/ml, $6,95 \pm 1,33$ µg/ml e $4,15 \pm 0,52$ µg/ml, respetivamente, o que revela mais uma vez sensibilidade ao tratamento com paclitaxel (Liu e Li, 2015).

Relativamente à população de CSC, ESI RL95-2, quando submetida a tratamento com paclitaxel, apresentou valores de atividade metabólica superiores a 80%, em todas as concentrações e tempos de incubação estudados, sugerindo que as CSC do endométrio apresentam resistência ao taxano. A resistência apresentada ao paclitaxel por populações com características de CSC foi relatada por outros autores. A avaliação da atividade metabólica nas esferas obtidas da linha de carcinoma endometrial ECC-1, ESI ECC-1, foi estudada anteriormente e obtiveram-se valores superiores a 70%, em todas as concentrações e tempos de incubação estudados (Carvalho, 2015). Um estudo de Hirst e colaboradores, avaliou a viabilidade celular de esferóides obtidos das linhas de cancro do ovário, A1847, OVCAR3, OVCAR4 e OVCAR8 e de culturas 2D destas linhas celulares após tratamento com paclitaxel. Os resultados revelaram uma maior viabilidade celular nos esferóides em relação às culturas 2D, para todas as linhas celulares e em todas as concentrações estudadas (Hirst *et al.*, 2018). Uma população de CSC do ovário, denominada A2780 CSLC, submetida a tratamento com paclitaxel, apresentou um valor de viabilidade celular superior a 75% comparativamente com a população não submetida a tratamento (Togashi *et al.*, 2018).

Muitos estudos investigaram os mecanismos moleculares envolvidos na resistência ao paclitaxel em células neoplásicas. O aumento da expressão da integrina β -1 ou aumento da adesão de células cancerígenas a matrizes extracelulares, alterações morfológicas nas células cancerígenas em proliferação, expressões aumentadas de BCL-2 ou BCL-XL, a instabilidade cromossómica, o aumento da expressão de MDR-1 ou da enzima ALDH são mecanismos de resistência descritos, associados ao paclitaxel (Tanaka, Toujima e Tanaka, 2012). Alguns estudos, indicam que a ALDH1A1 está envolvida na biologia das CSC, na diferenciação celular e que desempenha um papel na resistência à quimioterapia (Januchowski, Wojtowicz e Zabel, 2013; Januchowski *et al.*, 2016a). Num estudo de proteómica, realizado na linha celular de cancro do pulmão

A549, resistente ao paclitaxel, denominada de A549-Taxol, revelou que a ALDH1 era uma das proteínas sobreexpressas (Januchowski *et al.*, 2016a). A expressão de ALDH1 também foi relatada em cancros do ovário e mama. A expressão de ALDH1A1 apresentada por linhas de cancro do ovário, foi correlacionada com a resistência ao paclitaxel. Croker e colegas, isolaram células que apresentaram sobreexpressão de ALDH, das linhas celulares de cancro da mama MDA-MB-231 e MDA-MB-468, que resistiram significativamente ao tratamento com paclitaxel, comparativamente com células que apresentaram baixa expressão de ALDH (Croker e Allan, 2012; Januchowski *et al.*, 2016a).

A atividade metabólica da população de CSC do endométrio, quando submetida à doxorrubicina, aumenta significativamente na dependência do aumento da concentração e do tempo de incubação do fármaco, nomeadamente nas concentrações de 0,3 e 7,3 μM , às 48 e 72 horas e em todos os tempos de incubação, respetivamente. Relativamente às derivadas aderentes diferenciadas, apresentam uma diminuição significativa da atividade metabólica quando submetidas a 0,3 e 7,3 μM de doxorrubicina, às 72 horas de incubação. A resposta à terapêutica, das populações tumorais do endométrio à doxorrubicina foi relatada por outros autores. Gentilin e colaboradores avaliaram os efeitos da doxorrubicina na viabilidade celular das linhas celulares de cancro do endométrio, AN3 CA e HEC-1A, às 24, 48 e 72 horas de incubação. Na linha AN3 CA, após 24 horas, a doxorrubicina reduziu significativamente a viabilidade celular, com a concentração de 1,25 μM , em cerca de 38% em relação ao controlo. Após 48 e 72 horas de incubação, a viabilidade celular foi reduzida significativamente, na concentração de 0,5 μM , em 47% e 59% em relação ao controlo, respetivamente. Nas células HEC-1A, após 24 horas, a doxorrubicina reduziu significativamente a viabilidade celular em 11%, quando as células foram tratadas com 2,5 μM , em relação ao controlo. Após 48 horas, ocorreu igualmente uma redução significativa da viabilidade celular, na concentração de 0,5 μM , em 21% e de 10% na concentração de 0,1 μM após 72 horas, em relação ao controlo (Gentilin *et al.*, 2017). Noutro estudo nas linhas celulares Ishikawa, RL95-2 e KLE, a doxorrubicina reduziu a viabilidade celular de forma dependente da concentração do fármaco (Chitcholtan, Sykes e Evans, 2012). Estes dados mostram que a doxorrubicina é um fármaco capaz de reduzir a viabilidade celular de células tumorais do endométrio, de forma dependente da concentração e do tempo de incubação utilizados. Num estudo realizado anteriormente pelo grupo, as esferas da linha de carcinoma endometrial ECC-1, apresentaram um aumento significativo da atividade metabólica quando submetidas à doxorrubicina, comparativamente com a linha parental. As derivadas aderentes, apresentaram maior atividade metabólica do que as ECC-1, apenas na concentração mais elevada e nos tempos de incubação mais longos (Carvalho, 2015). Num estudo com esferóides, obtidos das linhas celulares Ishikawa, RL95-2 e KLE, as culturas em monocamada apresentaram menor viabilidade celular do que os esferóides. A expressão da superóxido dismutase, uma defesa

antioxidante, revelou ser superior nos esféróides e foi mantida durante o tratamento com doxorrubicina (Chitcholtan, Sykes e Evans, 2012).

Alguns mecanismos de resistência à doxorrubicina, associados a células tumorais com propriedades de CSC, estão descritos na literatura. Existem evidências de que o aumento da expressão e da atividade da família de transportadores ABC, especialmente de ABCG2, se correlacionam com células cancerígenas com fenótipo estaminal. Num estudo de Haraguchi e colaboradores, em dezasseis linhas celulares de cancro do sistema gástrico, as populações SP apresentaram um efluxo de doxorrubicina, mediado por ABCG2, nas quinze linhas mais resistentes a este fármaco (Haraguchi *et al.*, 2006). An e colaboradores, mostraram que siRNA ABCG2 aumentou a proporção de células cancerígenas da tiroide, positivas ao TUNEL, após exposição à doxorrubicina (An e Ongkeko, 2009). A resistência ao tratamento anticancerígeno e a repopulação acelerada de CSC, durante ou após o tratamento pode ser atribuída à intervenção de vias, como a AKT. Gagnon e colegas, estudaram a relação entre XIAP e AKT, dois fatores antiapoptóticos, e o seu papel na quimiorresistência de células de cancro do endométrio. As células da linha KLE, positivas para P-AKT1/2/3 apresentaram quimiorresistência à doxorrubicina, uma vez que os níveis de XIAP e AKT se mantiveram estáveis na resposta ao tratamento (Gagnon *et al.*, 2008). Foram descritas outras vias que possam estar envolvidas na resistência à doxorrubicina, como vias de recetores de morte, vias de sinalização do marcador CD40, da IL-6 e de proteínas de fase aguda (Carvalho, 2015).

A avaliação dos níveis de caspase 3, das populações tumorais do endométrio, quando submetidas à carboplatina, revelou um aumento significativo nos níveis apresentados pelas derivadas aderentes, em relação às GI controlo. Com este fármaco, a linha celular RL95-2, apresentou um aumento significativo nos níveis de caspase 3, quando comparados com os níveis apresentados pelas esferas. No tratamento com paclitaxel e doxorrubicina, não se observaram diferenças.

A maioria dos fármacos usados na terapêutica anticancerígena induz morte por apoptose nas células-alvo, quer pela via extrínseca ou pela via intrínseca (Vermeulen, Van Bockstaele e Berneman, 2005). Os mecanismos de apoptose são altamente complexos e envolvem uma cascata de eventos moleculares, dependentes de energia. As vias de sinalização extrínsecas que iniciam a apoptose, envolvem interações mediadas por recetores transmembranares. Estes envolvem recetores de morte que são membros da superfamília do gene do receptor do TNF (do inglês, *tumor necrosis factor*). Os membros da família de recetores de TNF partilham domínios extracelulares ricos em cisteína semelhantes e possuem um domínio citoplasmático de cerca de 80 aminoácidos denominado domínio de morte. Este desempenha um papel crítico na transmissão do sinal de morte da superfície celular para as vias de sinalização intracelulares. Os ligandos melhor caracterizados e os correspondentes recetores de morte incluem FasL/FasR, TNF- α /TNFR1,

Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo2L/DR5. As vias de sinalização intrínsecas, envolvem um conjunto diversificado de estímulos, não mediados por recetores, que produzem sinais intracelulares que atuam diretamente em alvos, dentro da célula (Elmore, 2007). A caspase 3 é considerada a mais importante das caspases executoras e é ativada por qualquer uma das caspases iniciadoras (caspase 8, 9 ou 10). A caspase 3 ativa especificamente a endonuclease CAD (do inglês, *caspase-activated DNase*), que em células em proliferação, é complexado ao seu inibidor, ICAD. Em células apoptóticas, a caspase 3 ativada cliva a ICAD para libertar DAC, que degrada o DNA cromossómico dentro dos núcleos e causa condensação da cromatina. Esta cascata proteolítica, na qual uma caspase pode ativar outras caspases, amplifica a via de sinalização apoptótica e leva à rápida morte celular (Elmore, 2007; Savitskaya e Onishchenko, 2015).

Vários autores descreveram um aumento de morte por apoptose de culturas celulares aderentes e menos evidente em populações com propriedades de CSC. Um estudo em cancro do endométrio, uma população CD133⁻ isolada, apresentou um aumento significativo de células apoptóticas quando tratadas com cisplatina e paclitaxel, comparativamente com uma população CD133⁺ (Rutella *et al.*, 2009). Agregados celulares da linha KLE apresentaram menos células apoptóticas do que a linha parental. A apoptose também foi aumentada em células de Ishikawa, mas não houve diferenças entre esferóides e monocamadas de células. Este facto, levou os autores a especular que a compactação dos esferóides nas células de Ishikawa desempenha um papel menor na proteção das células contra a apoptose após o tratamento com doxorrubicina (Chitcholtan, Sykes e Evans, 2012).

Outros mecanismos de morte celular, podem estar relacionados com a inexistência de diferenças entre os níveis de caspase 3 das populações submetidas a tratamento e populações controlo. A necrose era descrita como um processo não controlado e passivo, no entanto, recentemente vários dados experimentais demonstraram que, em condições extremas, a necrose pode ser um processo bem regulado, ativado por estímulos fisiológicos e patológicos bastante específicos. Na cascata necrótica, o interveniente principal é a proteína cinase RIPI, que pode ser ativada por diversos estímulos, como TNF, TRAIL, stresse oxidativo ou danos no DNA (via PARP). A proteína RIPI diretamente (ou indiretamente via outra cinase JNK) efetua uma transdução de sinal para a mitocôndria, que resulta em danos específicos, como transição de permeabilidade mitocondrial. O colapso mitocondrial ativa várias proteases, como a calpaína ou a catepsina e fosfolipases que, eventualmente, levam à destruição da membrana plasmática, característica da morte celular por necrose. A necrose, em contraste com a apoptose, geralmente desencadeia uma forte resposta inflamatória, que pode participar na regressão do tumor durante a terapêutica. Por outro lado, a necrose que ocorre espontaneamente de forma excessiva durante o desenvolvimento tumoral, pode agravar a agressividade tumoral devido ao papel estimulatório da inflamação induzida pela necrose (Elmore, 2007; Proskuryakov e

Gabai, 2010). A ativação excessiva de PARP, por exemplo, como resultado de uma forte indução de quebras no DNA, foi considerada uma causa para o desencadeamento de um processo de necrose celular, devido à depleção de ATP. A deficiência de BAX e P53 associada a esta via, não impede a morte celular. Esta via pode estar implicada no processo de morte, associada ao tratamento realizado neste estudo, independente da P53 e da caspase 3 (Proskuryakov e Gabai, 2010).

Os fármacos usados nos regimes de quimioterapia, podem causar danos no DNA de algumas células, o que pode levar à morte apoptótica por meio de uma via dependente de P53. A P53 pode ativar proteínas de reparação de DNA, regula o ciclo celular no ponto de regulação G1/S e pode iniciar a apoptose se o dano no DNA for irreparável (Elmore, 2007).

A perda de funções da P53 do tipo selvagem pode levar a um aumento da quimiorresistência. A mutação do gene supressor tumoral *TP53* é comum no carcinoma endometrial (Chitcholtan, Sykes e Evans, 2012).

Neste trabalho, a expressão de P53 apresentou uma diminuição significativa na linha celular RL95-2, quando tratada com carboplatina. Não se observam diferenças nas esferas nem nas derivadas aderentes. Uma diminuição na expressão de P53, com o tratamento com carboplatina nas derivadas aderentes, pode ser correlacionada com o aumento dos níveis de caspase 3 obtidos, indicando assim morte por apoptose desta população. Relativamente às esferas, que apresentam resistência à terapêutica, os níveis de caspase 3 e de P53 não apresentaram diferenças relativamente às populações não tratadas. Neste caso, podemos inferir que estas populações apresentam resistência aos mecanismos de morte por apoptose, associados à ação destes fármacos.

Diferenças de expressão da P53 em culturas diferenciadas e em populações de CSC foram descritas noutros estudos. Num estudo, todas as linhas celulares de cancro do endométrio usadas apresentaram alterações do gene *TP53*; deleção em RL95-2 e mutações nas linhas KLE e Ishikawa. A sensibilidade à doxorubicina foi marcadamente diferente entre as estruturas tridimensionais e as monocamadas de células das linhas celulares RL95-2 e KLE. Estas observações podem sugerir que a expressão e a funcionalidade da proteína P53 podem ser distintas em culturas tridimensionais em comparação com culturas em monocamada (Chitcholtan, Sykes e Evans, 2012).

A inativação da P53 foi detetada em 30 a 80% dos carcinomas do ovário e 10 a 20% dos carcinomas do endométrio. O SNP no codão 72 do gene *TP53* também foi correlacionado com uma menor sobrevivência global e resposta à quimioterapia adjuvante nos tumores do ovário e do endométrio. Foi demonstrado que, enquanto a cisplatina aumenta o conteúdo de P53 em células cancerígenas do ovário quimiossensíveis com

P53 do tipo selvagem, não consegue fazer o mesmo em células quimiorresistentes, por uma P53 mutada (Chaudhry e Asselin, 2009).

A via da AKT é determinante na resistência apresentada pelas células cancerígenas do ovário ao tratamento com cisplatina, e pode estar relacionada com a regulação da P53. Um estudo revelou que a cisplatina induziu uma acumulação de P53 mitocondrial, a libertação mitocondrial de Smac, de citocromo c, de HTR/Omi e apoptose em células de cancro do ovário quimiossensíveis, mas não em células resistentes. A via da AKT atenuou a acumulação de P53 mitocondrial e a libertação de Smac/citocromo c/Omi e conferiu resistência. A inibição da AKT facilitou a libertação de Smac e sensibilizou as células quimiorresistentes à cisplatina, de uma maneira dependente de P53. Estes resultados sugerem que a AKT confere resistência, em parte, modulando a ação direcionada da P53 na via de morte mitocondrial dependente de caspases (Yang *et al.*, 2006).

A expressão da ALDH na linha RL95-2 apresentou uma diminuição significativa quando tratada com paclitaxel e doxorrubicina e nas derivadas aderentes, quando tratadas com carboplatina. Nas esferas, não se observaram diferenças.

A existência CSC, é considerada uma das principais razões para a resistência à quimioterapia, e é-lhes atribuída responsabilidade pelos modestos resultados clínicos. Foi demonstrado que as CSC permanecem num estado de quiescência e que apresentam resistência aos fármacos anticancerígenos que têm como alvo células com um ciclo celular ativo. A quimiorresistência apresentada pelas células com propriedades de CSC do endométrio foi associada a marcadores de CSC, como a ALDH (Ran, Zhou e Zhang, 2017). A ativação das vias de pro-sobrevivência da autofagia é um mecanismo de resistência a várias terapêuticas, incluindo a quimioterapia, com taxanos e derivados da platina em vários tumores humanos. A autofagia parece estar relacionada à expressão da ALDH1 no cancro da mama e é fundamental para a tumorigénese em ambiente hipóxico. A autofagia está envolvida no crescimento do tumor endometrial e na resistência à cisplatina, e a inibição da autofagia aumenta a sensibilidade das células do carcinoma endometrial ao paclitaxel. Um estudo de Ran e colegas, revelou que o miR-218 inibiu a autofagia mediada por HMGB1 em células de carcinoma endometrial durante a quimioterapia. Estes resultados sugerem que a autofagia está intimamente relacionada à quimiossensibilidade no cancro endometrial (Ran, Zhou e Zhang, 2017). No nosso estudo, não se observou variação da expressão da ALDH apesar da resistência apresentada pelas esferas no estudo de citotoxicidade. A avaliação da expressão da enzima foi realizada após 24 horas de incubação com os citostáticos, que poderá corresponder a uma fase inicial de *stemness*.

Neste estudo, os danos no DNA provocados pelos fármacos usados na quimioterapia no tratamento do cancro do endométrio, foram avaliados através do ensaio cometa. Esta técnica permite a deteção de danos

em cadeias simples e em cadeias duplas de DNA (Apostolou *et al.*, 2014). As populações tumorais do endométrio, quando tratadas com carboplatina, apresentaram menor formação de cometas, comparativamente com as populações tratadas com paclitaxel e doxorubicina. A linha celular RL95-2, foi a população que apresentou um momento de cauda mais elevado.

Está documentado que a maioria dos fármacos anticancerígenos causa a morte das células tumorais, pela indução de danos irreparáveis no DNA e que, em última instância, desencadeiam a apoptose (Chaudhry e Asselin, 2009). A ligação entre a carboplatina e o DNA, pode produzir lesões através da ligação cruzada intra e intercadeias. Este mecanismo é descrito como o mais citotóxico, pois inibe o processo de replicação do DNA, provoca alterações que geram erros de replicação, acumulação de células na fase G2/M do ciclo celular e induz apoptose (De Sousa, Wlodarczyk e Monteiro, 2014). Estudos sugerem que a apoptose pode ser o mecanismo de morte induzida pela cisplatina e que os efeitos no DNA estão associados à expressão de genes de morte específicos e à regulação negativa de homólogos de sobrevivência (Chaudhry e Asselin, 2009). Outros autores avaliaram os danos no DNA causados pela carboplatina em populações tumorais. Num estudo anterior realizado pelo nosso grupo, a linha ECC-1, esferas e derivadas aderentes foram submetidas a tratamento com carboplatina durante 24 horas. O estudo revelou que se formaram poucos cometas em todas as populações e que a mais afetada foi a população das derivadas aderentes (Carvalho, 2015). Num estudo em células tumorais do ovário, foi avaliada a genotoxicidade da carboplatina após 24 horas de tratamento. A carboplatina induziu 60% de danos no DNA, em relação à totalidade das células que corresponde a 100% (Unger *et al.*, 2009). Foi demonstrado que o resultado clínico de doentes com carcinoma do ovário está correlacionado com a expressão de ATPases transportadoras de cobre e de Pg-P, ambas responsáveis pela captação de platina (Unger *et al.*, 2009). Estes resultados reforçam a heterogeneidade tumoral e como a eficácia de um fármaco varia em cada linha celular (Apostolou *et al.*, 2014).

Quando submetidas ao paclitaxel, as populações tumorais do endométrio formaram cometas e as derivadas aderentes foram a população que apresentou um maior número de células acima do valor de P90. O mecanismo de atuação do paclitaxel ocorre através da ligação à β -tubulina e na inibição da despolimerização dos microtúbulos (Koshiyama *et al.*, 2006; Tanaka, Toujima e Tanaka, 2012; Liu e Li, 2015). A falha na separação dos microtúbulos durante a fase G2/M bloqueia a mitose celular, que resulta em apoptose (Xu *et al.*, 2011). A indução de genes moduladores apoptóticos pelo paclitaxel parece ser independente da estabilização dos microtúbulos. Esta indução pode ocorrer devido à modulação da transcrição de proteínas de resposta aos danos no DNA, citocinas ou proteínas envolvidas no controlo da proliferação celular, apoptose e inflamação. O efeito apoptótico do paclitaxel depende da concentração e duração da

exposição. Dois mecanismos diferentes de apoptose foram propostos, dependentes da concentração de paclitaxel. Numa concentração superior a 9 nM, o paclitaxel induz a ativação de RAF-1, que é responsável pelo controlo apoptótico. Em concentrações menores ou iguais a 9 nM, há ausência de envolvimento da cinase RAF-1, mas a indução da apoptose ainda ocorre sob a influência da P53 e P21. Uma das vias de indução de apoptose é via da MAPK, que resulta em desfosforilação da proteína proapoptótica BAD e BAX, fosforilação da BCL-2 e indução de apoptose. Alterações que ocorrem nestas vias são responsáveis pelo desenvolvimento de resistência ao paclitaxel (Kampan *et al.*, 2015). Um estudo realizado no nosso grupo com a linha ECC-1, também avaliou os danos no DNA provocados pelo paclitaxel nas populações tumorais do endométrio. As esferas de ECC-1, apresentaram o menor valor de momento de cauda em comparação com a linha parental ECC-1 e as derivadas aderentes (Carvalho, 2015).

As três populações tumorais do endométrio utilizadas neste estudo, apresentaram um aumento significativo do momento da cauda, quando tratadas com doxorrubicina, comparativamente com as populações tratadas com carboplatina e paclitaxel, bem como com as populações não tratadas. Estão descritos dois mecanismos propostos pelos quais a doxorrubicina atua nas células cancerígenas. O primeiro mecanismo consiste na intercalação no DNA e na interrupção da sua reparação mediada pela topoisomerase II, enquanto que o segundo mecanismo descrito compreende a geração de radicais livres e consequentes danos nas membranas celulares, no DNA e nas proteínas (Thorn *et al.*, 2011). No entanto, o mecanismo pelo qual a doxorrubicina induz quebras nas duplas cadeias de DNA, mediadas pela topoisomerase II, não explica completamente o amplo espectro de citotoxicidade que a doxorrubicina exhibe. Vários outros mecanismos de ação têm sido sugeridos como vias de morte celular induzida pelo fármaco, incluindo inibição da síntese de DNA e RNA e formação de adutos no DNA mediados por formaldeído. Nenhum destes modos alternativos de morte celular foi previamente demonstrado ser independente dos efeitos celulares mediados pela topoisomerase II (Swift *et al.*, 2006). A sensibilidade das células tumorais à doxorrubicina foi relatada por outros autores. Num estudo com cancro da mama e colorretal, as linhas MCF7, MDA-MB-231 e T47D bem como as linhas de cancro colorretal, HT-116, HT55 e HCT-65 foram afetadas pela doxorrubicina (Apostolou *et al.*, 2014). Noutro estudo com as linhas celulares MCF7 e A549, a doxorrubicina induziu danos no DNA dependentes da concentração utilizada (El-Awady *et al.*, 2016).

A resistência das CSC à quimioterapia foi observada nos estudos de citotoxicidade das populações de esferas do endométrio, que apresentaram maior atividade metabólica à terapêutica com a carboplatina, ao paclitaxel e à doxorrubicina em comparação com as populações aderentes. No entanto, não se observaram alterações na expressão de ALDH e P53 nas populações de esferas tratadas, em relação às populações

controlo. O tratamento com carboplatina e doxorrubicina foi significativamente mais genotóxico nas populações aderentes em relação às populações de CSC.

Parte II — Estudo translacional

Descrição das características clínicas e patológicas das doentes

No estudo translacional foram selecionadas amostras tumorais do endométrio, nomeadamente as TE-9, -10, -12, -13, -14, -16 e -17. As características clínicas e patológicas destas doentes encontram-se resumidas na Tabela 6.

Tabela 6 — Características clínicas e patológicas das doentes.

Características histopatológicas	TE 9	TE 10	TE 12	TE 13	TE 14	TE 15	TE 16	TE 17
Idade do diagnóstico	83	80	86	59	64	79	68	62
Tipo histológico	AE	AE	AE	AE	AE	AE	CS	AE
Grau	I	2	I	I	I	3	-	I
Estadiamento cirúrgico	Ib	Ia	Ib	IIla	Ib	Ia	Ia	Ia

Legenda: AE — adenocarcinoma endometriode; CS — carcinoma seroso.

Os resultados da avaliação da expressão de marcadores associados a propriedades de CSC nestas amostras tumorais do endométrio estão descritos na Tabela 7.

A expressão da ALDH na amostra TE-9 foi focal, na TE-16 apresentou uma expressão difusa e na TE-17 apresentou uma marcação intermédia. Relativamente à marcação da β -catenina, esta foi positiva em todas as amostras do endométrio. A expressão de CD133, um marcador membranar, revelou ser positiva em todas as amostras, à exceção da amostra TE-17 que apresentou marcação intermédia.

Tabela 7 — Expressão de marcadores associados a fenótipo de CSC nas amostras tumorais do endométrio.

	TE-9	TE-10	TE-12	TE-13	TE-14	TE-16	TE-17
ALDH	Focal	-	-	-	-	Difusa	Intermédia
β -catenina	Positiva						
CD133	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Intermédia

- não avaliado por amostra insuficiente.

Caracterização das CSC do endométrio

Do isolamento celular, realizado nas amostras endometriais TE-15 e TE-16, obtiveram-se culturas primárias de explantes, representadas na Figura 37.

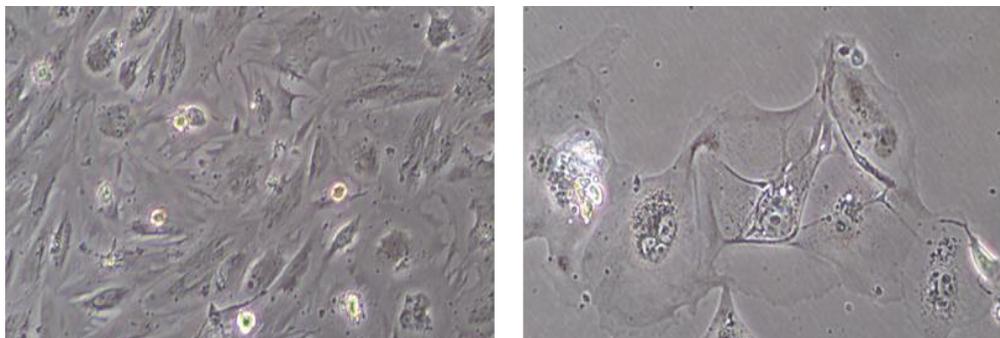


Figura 37 - Imagens das culturas primárias de explantes obtidas das amostras TE-15 (imagem à esquerda) e TE-16 (imagem à direita). As imagens foram obtidas com uma ampliação de 100x.

Do protocolo de formação de esferas realizado com as células provenientes do isolamento das amostras TE-15 e TE-16, obtiveram-se as populações de esferas ESI TE-15 e ESI TE-16, representadas na Figura 38.

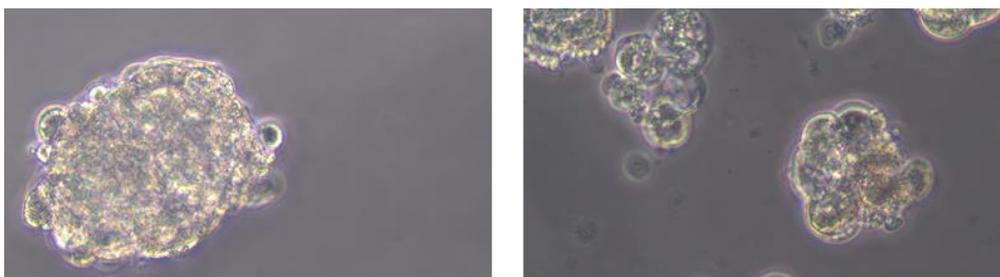


Figura 38 - Populações de esferas, obtidas das amostras TE-15 (imagem à esquerda) e TE-16 (imagem à direita), após 5 dias de protocolo de formação de esferas. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 400x e 200x, respetivamente.

As esferas obtidas das amostras humanas tumorais do endométrio, apresentaram uma estrutura esférica com contorno levemente irregular, mais evidenciadas nas esferas ESI TE-16, com variação no tamanho e densidade.

Inibição da ALDH

Nas esferas obtidas da TE-15, com e sem influência de DEAB, avaliou-se a capacidade de autorrenovação e a área de projeção. Os resultados obtidos estão representados na Figura 39 e na Figura 40, respetivamente.

As esferas da TE-15, apresentaram uma capacidade de autorrenovação de 40,00% e, quando submetidas ao DEAB, apresentaram uma capacidade de autorrenovação de 20,00%.

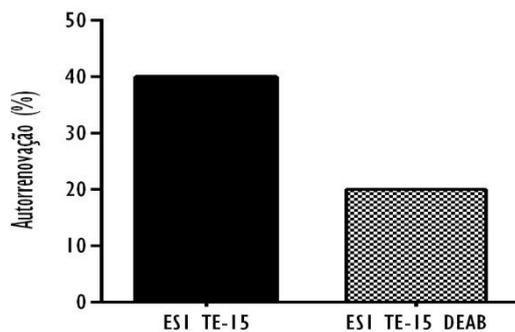


Figura 39 - Capacidade de autorrenovação de esferas, ESI TE-15, também sob a influência de DEAB.

A projeção das esferas de TE-15 apresentaram uma área média de $1,38 \times 10^5 \pm 1,40 \times 10^4$ pixéis ($p < 0,001$) inferior à área das ESI TE sem tratamento, que apresentaram um valor de $2,72 \times 10^5 \pm 2,52 \times 10^4$ pixéis.

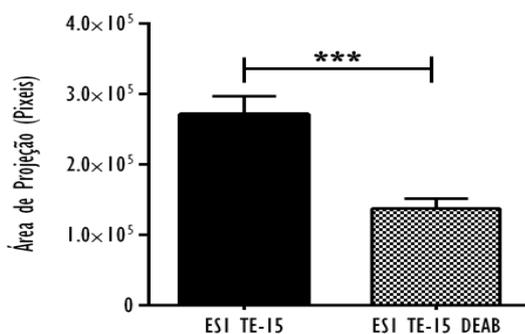


Figura 40 - Área média ocupada pelas esferas, ESI TE-15, também sob influência do inibidor DEAB. Os resultados apresentados exprimem a média do número de pixéis e o erro padrão de pelo menos 27 imagens por cada condição obtidas num ensaio. A significância estatística está representada com *** para $p < 0,001$.

Imagens das esferas de TE-15, representativas das fotografias utilizadas na quantificação da área de projeção, estão representadas na Figura 41.

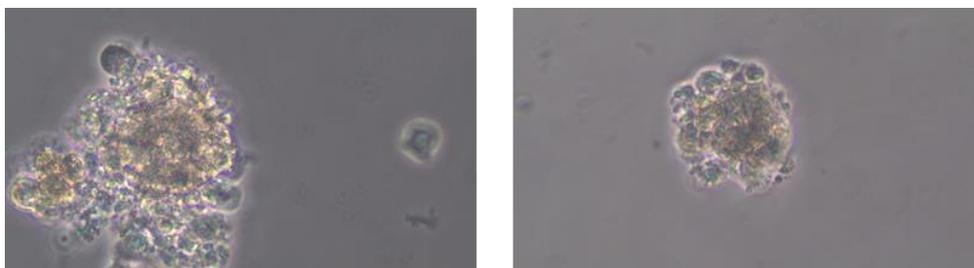


Figura 41 - Imagens das esferas, ESI TE 15, representativas das fotografias obtidas para quantificação da área ocupada pelas esferas. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 200x.

Resposta personalizada à quimioterapia

No estudo da resposta personalizada à terapêutica foram incluídas as amostras tumorais do endométrio TE-13, TE-16 e TE-17. Na Tabela 8, estão descritos os resultados obtidos com a avaliação dos marcadores de CSC, ALDH, β -catenina e CD133, analisados nas secções tumorais do endométrio submetidas aos citostáticos usados na prática clínica no tratamento do cancro do endométrio.

Tabela 8 — Expressão de marcadores de CSC nas amostras tumorais do endométrio submetidas à terapêutica com carboplatina, paclitaxel e doxorrubicina durante 24 horas.

	TE-13	TE-16	TE-17
ALDH			
Controlo	Focal	Difusa	Intermédia
Carboplatina	Focal	Focal	-
Paclitaxel	Focal	Difusa	Fraca
Doxorrubicina	Focal	Difusa	-
β-catenina			
Controlo	Positiva	Positiva	Positiva
Carboplatina	Positiva	Positiva	Positiva
Paclitaxel	Positiva	Positiva	Positiva
Doxorrubicina	Positiva	Positiva	Positiva
CD133			
Controlo	Positiva	Positiva	Mediana
Carboplatina	Positiva	Positiva	Sobreexpressão
Paclitaxel	Positiva	Positiva	Sobreexpressão
Doxorrubicina	Positiva	Positiva	Sobreexpressão

- não avaliado por amostra insuficiente

A marcação da ALDH na amostra TE-13 apresentou uma expressão focal em todas as condições em estudo. Na amostra TE-16, todas as secções apresentaram uma expressão difusa à exceção da secção tratada com doxorrubicina que apresentou uma expressão focal. A expressão na secção controlo da TE-17 apresentou um perfil intermédio e a secção submetida à doxorrubicina apresentou fraca expressão.

Nas amostras TE-13 e TE-16, a expressão de CD133 foi positiva em todas as condições estudadas. Na TE-17, a secção controlo apresentou uma expressão mediana, enquanto que as secções tratadas apresentaram sobreexpressão do CD133.

A avaliação da expressão da β -catenina não apresentou diferenças.

Na Figura 42 está representada a expressão dos marcadores de CSC nas amostras tumorais do endométrio.

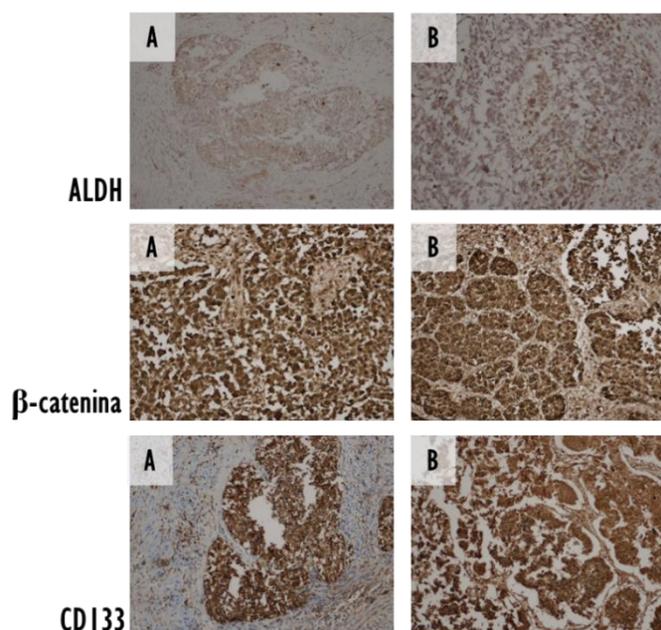


Figura 42 - Representação da expressão dos marcadores de CSC nas secções tumorais do endométrio. Na marcação da expressão da ALDH, o painel A é referente à expressão focal apresentada na secção controlo da amostra TE-13, o painel B é referente à expressão difusa apresentada pela secção controlo da TE-16. Na marcação da expressão da β -catenina, o painel A é referente à expressão positiva apresentada na secção controlo da amostra TE-16, o painel B é referente à expressão positiva apresentada pela secção tratada com carboplatina da TE-17. Na marcação da expressão do CD133, o painel A é referente à expressão positiva apresentada na secção controlo da amostra TE-13, o painel B é referente à expressão positiva apresentada pela secção controlo da TE-16. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 200x.

Na Tabela 9, estão apresentados os resultados obtidos com a avaliação dos marcadores associados a morte celular, P53, caspase 3 e o indicador de proliferação Ki67 avaliadas nas secções tumorais de doentes com cancro do endométrio.

A marcação de P53 nas secções da TE-13 tratadas com carboplatina e com doxorubicina apresentou uma expressão inferior a 5%. Quando submetida a tratamento com paclitaxel, a TE-13 não apresentou expressão de P53, assim como a amostra não submetida ao citostático. A amostra TE-16 não apresentou expressão desta proteína. Relativamente à amostra TE-17, a secção não tratada apresentou uma expressão de P53 inferior a 50%, a secção tratada com carboplatina não apresentou expressão e quando submetida ao paclitaxel, apresentou uma expressão inferior a 5%.

Nas amostras tumorais do endométrio TE-16 e TE-17, a expressão da caspase 3 foi positiva, à exceção da amostra TE-16 quando submetida à carboplatina e à secção da amostra TE-17 sob paclitaxel.

O índice de proliferação, avaliado nas amostras tumorais através do marcador Ki67, na amostra TE-13 apresentou valores de 30% nas secções controlo e tratada com doxorubicina, 40% com o tratamento com carboplatina e 60% quando submetida ao paclitaxel. A amostra TE-16, apresentou índices proliferativos de 60% na secção controlo e submetida à carboplatina, de 50% com o tratamento com doxorubicina e de 70% quando tratada com paclitaxel.

Tabela 9 - Expressão de proteínas associadas a morte celular e do indicador de proliferação Ki67 nas amostras tumorais do endométrio submetidas à terapêutica com carboplatina, paclitaxel e doxorubicina durante 24 horas.

	TE-13	TE-16	TE-17
P53			
Controlo	Negativa	Negativa	< 50%
Carboplatina	< 5%	Negativa	Negativa
Paclitaxel	Negativa	Negativa	< 5%
Doxorubicina	< 5%	Negativa	-
Caspase 3			
Controlo	-	Positiva	Positiva
Carboplatina	-	Intermédia	Positiva
Paclitaxel	-	Positiva	Intermédia
Doxorubicina	-	Positiva	Positiva
Ki67			
Controlo	30%	60%	-
Carboplatina	40%	60%	-
Paclitaxel	60%	70%	-
Doxorubicina	30%	50%	-

- não avaliada por amostra insuficiente

Na Figura 43 está representada a expressão dos marcadores de CSC nas amostras tumorais do endométrio.

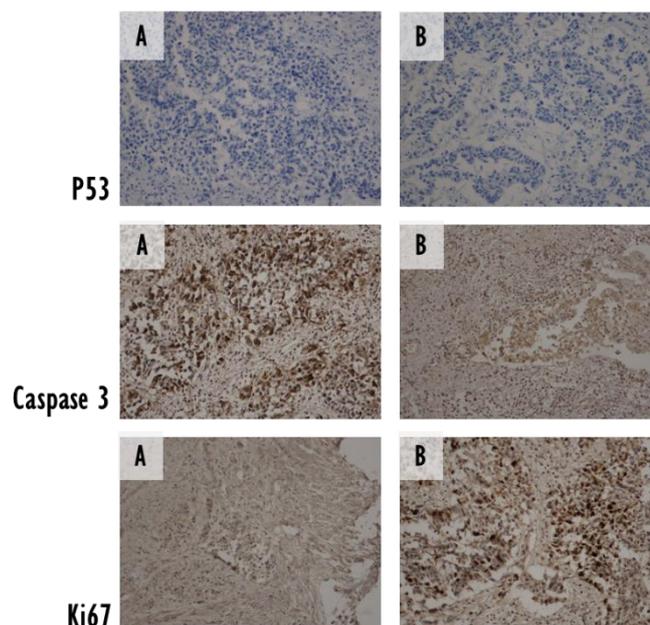


Figura 43 - Representação da expressão de proteínas associadas a morte celular e do indicador de proliferação nas secções tumorais do endométrio. Na marcação da expressão da P53, o painel A é referente à expressão negativa apresentada na secção controlo da amostra TE-16, o painel B é referente à expressão negativa apresentada pela secção tratada com carboplatina da TE-16. Na marcação da expressão da caspase 3, o painel A é referente à expressão intermédia apresentada na secção tratada com carboplatina da amostra TE-16, o painel B é referente à expressão intermédia apresentada pela secção tratada com paclitaxel da TE-17. Na marcação da expressão do Ki67, o painel A é referente à expressão de 30% de proliferação celular apresentada na secção controlo da amostra TE-13, o painel B é referente à expressão de 60% de proliferação celular apresentada pela secção controlo da TE-16. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 200x.

Discussão

Neste estudo foram incluídas amostras de sete doentes que apresentaram histologia de adenocarcinoma endometriode e uma doente apresentou carcinoma seroso. Dos sete carcinomas do endométrio do tipo I, cinco doentes apresentaram tumores de grau I, bem diferenciados, uma doente apresentou tumor moderadamente diferenciado e outra doente apresentou um tumor indiferenciado, G3. A invasão profunda do miométrio foi descrita em 4 doentes submetidas ao estadiamento cirúrgico.

As CSC podem ser definidas como uma população de células tumorigénicas indiferenciadas responsáveis pela iniciação, manutenção e disseminação do tumor. Estas populações apresentam um potencial ilimitado de proliferação, de capacidade de autorrenovação e de capacidade para gerar uma população de células mais diferenciadas que irão constituir a maior população tumoral. As populações de CSC foram isoladas em vários tipos de tumores sólidos e expandidas *in vitro*, como esferas tumorais denominadas de tumorosferas (Rutella *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2017). Neste trabalho foi possível a obtenção de populações de esferas a partir de amostras tumorais do endométrio, com capacidade de autorrenovação. Após otimização do procedimento, as populações de CSC obtidas através do protocolo de formação de esferas, das amostras TE-

15 e TE-16, permitiram obter células provenientes de um adenocarcinoma endometriode e de um carcinoma seroso, respetivamente. Estes resultados podem indicar a existência de populações celulares com propriedades de CSC nos diferentes tipos histológicos do cancro do endométrio. A obtenção de populações de CSC foi relatada num estudo de Hubbard e colegas que, demonstraram que uma pequena população de células com capacidade clonogénica, isoladas de tecidos de doentes com cancro do endométrio, apresentavam capacidade de autorrenovação, de diferenciação e de tumorigénese (Sun *et al.*, 2017; Hubbard *et al.*, 2009). Rutella e colaboradores também avaliaram a capacidade de autorrenovação em células individuais obtidas de esferas de doentes com cancro do endométrio. Após cinco semanas de culturas, as esferas tumorais primárias foram observadas em 5 dos 15 tumores estudados (Rutella *et al.*, 2009). O estudo desta população poderá permitir um aprofundamento do conhecimento acerca desta população implicada na evolução natural da neoplasia e ser alicerce para correlação com fatores de prognóstico e de resposta ao tratamento.

A avaliação da capacidade de autorrenovação e área de projeção das esferas do endométrio, sob a influência de DEAB, apresentou uma diminuição na capacidade de autorrenovação e nas dimensões da área das esferas, em comparação com as populações não tratadas. Resultados semelhantes foram obtidos nos nossos estudos com esferas provenientes de linhas celulares do cancro do endométrio, descritos na Parte I. Num estudo de Flahaut e colaboradores, foi avaliada a capacidade de autorrenovação e a eficiência clonogénica de neuroesferas provenientes de uma amostra de um doente com neuroblastoma, sob influência de DEAB. A inibição específica da atividade da ALDH pelo DEAB, resultou numa redução significativa da eficiência clonogénica e do potencial de autorrenovação das neuroesferas (Flahaut *et al.*, 2016). Estes dados permitiram colocar a hipótese de que o inibidor da ALDH apresenta a capacidade de modular a proliferação das células com propriedades de CSC.

A avaliação da expressão da ALDH nas amostras tumorais do endométrio, revelou que tumores endometrioides de baixo grau, apresentam um perfil de expressão focal ou intermédia desta enzima. A expressão apresentada pelo carcinoma seroso foi difusa. Com base nos critérios de Jiang e colaboradores, casos que apresentem uma expressão superior a 10% de células positivas para ALDH1 foram consideradas como ALDH1^{hi}. Um estudo de Rahadiani e colegas mostrou que um elevado nível de expressão de ALDH1 foi correlacionado com invasão linfática, resistência à quimioterapia, recidiva e prognóstico das doentes. Doentes com maior expressão de ALDH1 apresentaram pior prognóstico do que as que apresentaram com menor expressão, e elevada expressão de ALDH1 foi um fator independente de mau prognóstico. A expressão difusa da ALDH1 foi encontrada em alguns casos clínicos de adenocarcinoma endometriode (Rahadiani *et al.*, 2011). O tratamento com citostáticos, induziu alterações na expressão da ALDH pelo carcinoma seroso, que apresentou expressão focal nas secções tratadas com carboplatina, paclitaxel e doxorrubicina. A TE-17,

que corresponde a um adenocarcinoma endometriode de estágio inicial com estadiamento cirúrgico Ia, apresentou fraca expressão. Estes dados podem ser indicativos de da possibilidade de estratificação individualizada da resposta aos fármacos. No entanto, a expressão da ALDH parece depender do tipo histológico do tumor e da diferenciação que apresenta. Deste modo, tumores mais agressivos tendem a expressar de forma mais intensa este marcador de CSC.

A β -catenina, codificada pelo gene *CTNNB1*, é uma proteína de junção aderente produzida constitutivamente que mantém a polaridade celular através da interação com a E-caderina na membrana celular. No citoplasma, a β -catenina livre interage com a proteína APC e pode funcionar como um fator de transcrição (Prat *et al.*, 2007). Outro estudo descreve que os tumores endometriodes que apresentam mutações na β -catenina, são maioritariamente tumores em estágio inicial associados a um prognóstico favorável (Prat *et al.*, 2007). No nosso estudo, não se observaram diferenças na expressão deste marcador entre cada tipo histológico do tumor, entre estadiamento cirúrgico ou entre as diferentes condições de tratamento em estudo. Estes resultados permitem colocar a hipótese de que a expressão deste marcador não se correlaciona nem com o tipo de tumor nem com a resposta à terapêutica.

A expressão membranar de CD133 nas amostras tumorais do endométrio foi positiva em todas as amostras estudadas, à exceção da amostra TE-17 que apresentou uma expressão intermédia. A inexistência de invasão profunda do miométrio e o facto de se tratar de um tumor de bem diferenciado pode explicar a menor expressão deste marcador, comparativamente a outras amostras estudadas. Neste estudo, a expressão de CD133 na amostra TE-17, um adenocarcinoma endometriode de grau I em estágio inicial, apresentou sobreexpressão de marcador após tratamento com os três fármacos em estudo. O mesmo cenário foi observado no estudo de Rutella e colaboradores, em que o CD133 foi preferencialmente expresso por tumores em estádios iniciais, sem a presença de metástases nos gânglios linfáticos. Neste caso, estes dados podem indicar que as células cancerígenas que expressam CD133 apresentam um maior potencial para erradicar a população de CSC e limitar a recorrência da doença neste grupo de doentes (Rutella *et al.*, 2009).

Em relação à expressão de proteínas associadas a morte celular, como a P53, destaca-se a ausência de expressão no carcinoma seroso, cenário que não foi alterado pela terapêutica. Nos adenocarcinomas endometriodes, a expressão foi inferior a 5% ou negativa e no caso da TE-17, a expressão de P53 na secção controlo foi inferior a 50%.

A maioria dos carcinomas endometriodes apresenta uma expressão de P53, do tipo selvagem, com coloração focal e irregular em menos de 50% dos núcleos tumorais. As mutações da P53 são raramente identificadas em carcinomas endometriodes de baixo grau e são ocasionalmente identificadas em carcinomas de grau intermédio. Recentemente, Kurnit e colegas examinaram 125 casos de carcinomas endometriodes

de grau I e 2, estágio I e II, por sequenciamento de próxima geração, e encontraram mutações no *TP53*, que estavam presentes em 9% dos casos, por estarem associadas a uma menor sobrevivência livre de doença. Isto sugere que a “aquisição” de-novo de uma mutação TP53 num carcinoma endometriode de baixo grau associa-se a prognóstico desfavorável. A expressão de P53 está ausente numa pequena população de carcinomas serosos, associados a uma mutação, que resulta numa proteína truncada com uma alteração conformacional que não é detetável por anticorpos comercialmente disponíveis (Chiang e Soslow, 2014; Fadare e Parkash, 2017).

Os níveis de proliferação apresentados pelo carcinoma seroso, foram mais elevados do que os apresentados pela TE-13, um adenocarcinoma endometriode bem diferenciado com invasão profunda do miométrio. O índice de proliferação apresentado pelos carcinomas serosos, quando avaliado pelo Ki67, é habitualmente elevado (Chiang e Soslow, 2014). O aumento dos índices de proliferação apresentados pelas secções tratadas, pode ser correlacionado com resistência à terapêutica.

A expressão de caspase 3 observada nas amostras tratadas e no controlo foi semelhante nos tumores estudados, o que pode ser indicativo de morte celular independente da via das caspases. Os fármacos usados na quimioterapia que atuam a nível do DNA são a abordagem mais amplamente utilizada e eficaz para o tratamento da doença neoplásica. Uma molécula importante na resposta aos danos no DNA é a PARP, que é ativada por quebras da cadeia de DNA e facilita o acesso das enzimas de reparação ao DNA danificado. Embora a inibição da PARP possa resultar no desenvolvimento tumoral, através da indução de instabilidade genómica ou da contribuição para a morte celular como uma estratégia antitumoral em células sem outros componentes do reparação do DNA, a hiperativação da PARP diminui o NAD citosólico e induz necrose (Stacey Ricci e Zong, 2006). Neste estudo, este pode ser um dos mecanismos de morte ativados.

Este estudo com amostras de tumores do endométrio, permitiu comprovar que as células tumorais continuam em proliferação e que, a viabilidade não é comprometida por esta técnica de avaliação de resposta à terapêutica. A possibilidade de incluir as secções tumorais em blocos de parafina e ser possível uma análise de imunohistoquímica, perspetiva a possibilidade de utilizar esta técnica acessível e disponível no estudo de resposta tumoral. Esta análise, permitiu ainda observar diferenças na expressão de marcadores de CSC e associados a morte celular, após terapêutica com citostáticos. Esta plataforma pode ser promissora em prever respostas tumorais e, no futuro, estudar mecanismos de resistência particularmente da população de CSC (Gerlach *et al.*, 2014).

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Neste trabalho experimental, a linha celular de cancro do endométrio RL95-2, apresentou capacidade de formação de esferas e autorrenovação e, quando colocadas em condições aderentes, apresentaram capacidade de diferenciação. As esferas de RL95-2 apresentaram um aumento da população CD44⁺/CD24⁻ e uma tendência para elevação da ALDH, associados a fenótipo de CSC.

A ação do DEAB, inibidor da ALDH, nas populações de CSC do endométrio, diminuiu a capacidade de formação de esferas, a autorrenovação e a área de projeção. Ao nível da expressão de marcadores de CSC, as esferas de RL95-2 submetidas ao DEAB apresentaram um aumento da expressão de CD133, no entanto a população CD44⁺/CD24⁻, assim como a expressão da ALDH e da P53, não foram influenciadas por este tratamento. O mecanismo de ação do DEAB ainda não está esclarecido, mas poderá aumentar a sensibilidade celular ao tratamento com diversos fármacos anticancerígenos, através da regulação da expressão da P-gp e da BCRP, proteínas de resistência. No entanto podem estar subjacentes outros mecanismos de repressão que influenciem o fenótipo das CSC.

A resistência das CSC à quimioterapia foi observada nos estudos de resposta à terapêutica. As populações de esferas do endométrio apresentaram maior resistência à terapêutica com a carboplatina, o paclitaxel e a doxorubicina em comparação com as populações aderentes. A linha parental e as derivadas aderentes com a carboplatina apresentaram uma diminuição da expressão de marcadores envolvidos na apoptose e diminuição de marcadores de CSC como a ALDH nas populações mais diferenciadas. Nas células tumorais do endométrio o fármaco mais genotóxico foi a doxorubicina. A carboplatina e a doxorubicina foram significativamente mais genotóxicas nas populações aderentes em relação às populações de CSC.

No contexto da caracterização da resistência à terapêutica apresentada pelas populações com propriedades de CSC, considera-se importante a avaliação da atividade da ALDH e da expressão de proteínas envolvidas nos mecanismos de resistência, especificamente considerando a influência de DEAB. O aumento da sensibilização à terapêutica pelo DEAB, observado em estudos com outros tipos de cancro, constitui uma motivação para a continuação do estudo deste inibidor nas populações responsáveis pela resistência ao tratamento. A compreensão do mecanismo de ação de DEAB, sobretudo a influência na tumorigénese, disseminação e resistência, poderia possibilitar a descoberta de alvos moleculares e o desenvolvimento de terapêuticas dirigidas a vias envolvidas na resistência das CSC.

No estudo translacional com as amostras de tumores endometriais humanos, foi possível otimizar o protocolo de isolamento de esferas e uma cultura de secções tumorais. A expressão de marcadores de CSC foi mais evidente em tumores com características de prognóstico mais desfavorável. A resposta diferencial destas culturas ao tratamento confirmou a sensibilidade variável entre indivíduos e sugere que a resposta à terapêutica pode ser influenciada pelas populações que os constituem.

No futuro, dada a influência que o DEAB apresentou na modulação das populações de CSC do endométrio, seria interessante estudar a influência na resistência à quimioterapia, característica destas populações. O conhecimento do mecanismo de ação deste inibidor poderia ser essencial para a compreensão da influência de DEAB, nas populações de CSC. Os resultados obtidos com o estudo da resposta personalizada à terapêutica, a médio e a longo prazo podem ser correlacionados com a resposta ao tratamento, intervalo livre de doença e sobrevivência global.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAPRO, M. S. *et al.* - Doxorubicin versus doxorubicin and cisplatin in endometrial carcinoma: Definitive results of a randomised study (55872) by the EORTC Gynaecological Cancer Group. **Annals of Oncology**. ISSN 09237534. 14:3 (2003) 441–448. doi: 10.1093/annonc/mdg112.
- ADISHESH, M. *et al.* - Harmonisation of biobanking standards in endometrial cancer research. **British Journal of Cancer**. ISSN 15321827. 117:4 (2017) 485–493. doi: 10.1038/bjc.2017.194.
- ALCARAZ, Irene Cervelló *et al.* - Current understanding of endometrial stem cells. **Expert Review of Obstetrics & Gynecology**. . ISSN 1747-4108. 4:3 (2009) 273–282. doi: <http://dx.doi.org/10.1586/eog.09.12>.
- ALGHAMDI, Saeed *et al.* - BET protein inhibitor JQ1 inhibits growth and modulates WNT signaling in mesenchymal stem cells. **Stem cell research & therapy**. . ISSN 1757-6512. 7:2016) 22. doi: 10.1186/s13287-016-0278-3.
- ALI, Aus Tariq - Reproductive factors and the risk of endometrial cancer. **International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society**. . ISSN 1525-1438. 24:3 (2014) 384–93. doi: 10.1097/IGC.000000000000075.
- ALLEGRA, Alessandro *et al.* - The Cancer Stem Cell Hypothesis: A Guide to Potential Molecular Targets. **Cancer Investigation**. . ISSN 0735-7907. 32:9 (2014) 470–495. doi: 10.3109/07357907.2014.958231.
- ALONSO-ALCONADA, Lorena *et al.* - Molecular profiling of circulating tumor cells links plasticity to the metastatic process in endometrial cancer. **Molecular Cancer**. . ISSN 1476-4598. 13:1 (2014) 223. doi: 10.1186/1476-4598-13-223.
- AN, Yi; ONGKEKO, Weg M. - ABCG2: the key to chemoresistance in cancer stem cells? **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**. . ISSN 1744-7607. 5:March (2009) 1529–1542. doi: 10.1517/17425250903228834.
- APOSTOLOU, Panagiotis *et al.* - Use of the comet assay technique for quick and reliable prediction of in vitro response to chemotherapeutics in breast and colon cancer. **Journal of Biological Research (Greece)**. . ISSN 22415793. 21:1 (2014) 1–7. doi: 10.1186/2241-5793-21-14.
- ARORA, Vivek; QUINN, Michael A. - Endometrial cancer. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**. . ISSN 15216934. 26:3 (2012) 311–324. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2011.12.007.
- BANNO, Kouji *et al.* - Biomarkers in endometrial cancer: Possible clinical applications (review). **Oncology Letters**. . ISSN 17921074. 3:6 (2012) 1175–1180. doi: 10.3892/ol.2012.654.
- BANSAL, Nisha; YENDLURI, Vimala; WENHAM, Robert M. - The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. **Cancer Control**. . ISSN 10732748. 16:1 (2009) 8–13. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.10.010.
- BESTVINA, C. M.; FLEMING, G. F. - Chemotherapy for endometrial cancer in adjuvant and advanced disease

- settings. **Oncologist**. . ISSN 1549-490X. 21:10 (2016) 1250–1259. doi: 10.1634/theoncologist.2016-0062.
- BUHTOJAROVA, Tatiana N.; BRENNER, Carol A.; SINGH, Meenakshi - Role of current and emerging biomarkers in resolving persistent clinical dilemmas. **American Journal of Clinical Pathology**. . ISSN 19437722. 145:1 (2016) 8–21. doi: 10.1093/AJCP/AQV014.
- BURKE, William M. *et al.* - Endometrial cancer: A review and current management strategies: Part i. **Gynecologic Oncology**. . ISSN 10956859. 134:2 (2014) 385–392. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.05.018.
- BYRON, Sara A.; LOCH, David C.; POLLOCK, Pamela M. - Fibroblast growth factor receptor inhibition synergizes with paclitaxel and doxorubicin in endometrial cancer cells. **International Journal of Gynecological Cancer**. . ISSN 1048891X. 22:9 (2012) 1517–1526. doi: 10.1097/IGC.0b013e31826f6806.
- CALVET, Christophe Y.; ANDRÉ, Franck M.; MIR, Lluís M. - The culture of cancer cell lines as tumorspheres does not systematically result in cancer stem cell enrichment. **PLoS ONE**. . ISSN 19326203. 9:2 (2014). doi: 10.1371/journal.pone.0089644.
- CAO, Lu *et al.* - Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. **BMC Gastroenterology**. . ISSN 1471230X. 11:1 (2011) 71. doi: 10.1186/1471-230X-11-71.
- CARVALHO, Maria João Da Silva Fernandes Leal - Células estaminais do cancro do endométrio. Caracterização, resposta à terapêutica e padrão de metastização in vivo. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2015.
- CERVELLÓ, Irene *et al.* - Stem cells in human endometrium and endometrial carcinoma. **International journal of gynecological pathology**. . ISSN 1538-7151. 30: (2011) 317–327. doi: 10.1097/PG-P.0b013e3182102754.
- CERVELLÓ, Irene *et al.* - Somatic Stem Cells in the Human Endometrium. **Seminars in Reproductive Medicine**. . ISSN 1526-8004. 31:01 (2013) 069–076. doi: 10.1055/s-0032-1331800.
- CHAUDHRY, Parvesh; ASSELIN, Eric - Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. **Endocrine-Related Cancer**. . ISSN 13510088. 16:2 (2009) 363–380. doi: 10.1677/ERC-08-0266.
- CHIANG, Sarah; SOSLOW, Robert A. - Updates in diagnostic immunohistochemistry in endometrial carcinoma. **Seminars in Diagnostic Pathology**. . ISSN 19301111. 31:3 (2014) 205–215. doi: 10.1053/j.semdp.2014.03.002.
- CHITCHOLTAN, Kenny; SYKES, Peter H.; EVANS, John J. - The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer. **Journal of Translational Medicine**. . ISSN 14795876. 10:1 (2012) 38. doi: 10.1186/1479-5876-10-38.
- CHOIJAMTS, Batsuren *et al.* - CD133+cancer stem cell-like cells derived from uterine carcinosarcoma (malignant mixed Müllerian tumor). **Stem Cells**. . ISSN 10665099. 29:10 (2011) 1485–1495. doi: 10.1002/stem.711.
- CHON, Hye Sook *et al.* - The BCL-2 antagonist of cell death pathway influences endometrial cancer cell

- sensitivity to cisplatin. **Gynecologic Oncology**. . ISSN 00908258. 124:1 (2012) 119–124. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.09.020.
- COJOC, Monica *et al.* - A role for cancer stem cells in therapy resistance: Cellular and molecular mechanisms. **Seminars in Cancer Biology**. . ISSN 10963650. 31: (2015) 16–27. doi: 10.1016/j.semcancer.2014.06.004.
- COLAK, Selcuk; MEDEMA, Jan P. - Cancer stem cells - Important players in tumor therapy resistance. **FEBS Journal**. . ISSN 17424658. 281:21 (2014) 4779–4791. doi: 10.1111/febs.13023.
- COLOMBO, N. *et al.* - Endometrial cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**. . ISSN 09237534. 22:SUPPL. 6 (2011) 35–39. doi: 10.1093/annonc/mdr374.
- CROKER, Alysha K.; ALLAN, Alison L. - Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44+ human breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**. . ISSN 0167-6806. 133:1 (2012) 75–87. doi: 10.1007/s10549-011-1692-y.
- DARZI, Saeedeh *et al.* - Identification and Characterization of Human Endometrial Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Potential for Cellular Therapy. **STEM CELLS Translational Medicine**. . ISSN 21576564. 5:9 (2016) 1127–1132. doi: 10.5966/sctm.2015-0190.
- DE MELO, Andréia Cristina; PAULINO, Eduardo; GARCES, Álvaro Henrique Ingles - A Review of mTOR Pathway Inhibitors in Gynecologic Cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. . ISSN 19420994. (2017). doi: 10.1155/2017/4809751.
- DE SOUSA, Grazielle Fonseca; WLODARCZYK, Samarina Rodrigues; MONTEIRO, Gisele - Carboplatin: Molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. . ISSN 21759790. 50:4 (2014) 693–702. doi: 10.1590/S1984-82502014000400004.
- DI CELLO, Annalisa *et al.* - DJ-1 is a reliable serum biomarker for discriminating high-risk endometrial cancer. **Tumor Biology**. . ISSN 14230380. 39:6 (2017). doi: 10.1177/1010428317705746.
- DI CRISTOFANO, Antonio; ELLENSON, Lora Hedrick - Endometrial Carcinoma. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**. . ISSN 1553-4006. 2:1 (2007) 57–85. doi: 10.1146/annurev.pathol.2.010506.091905.
- DING, Dah-Ching *et al.* - Expression of CD133 in endometrial cancer cells and its implications. **Journal of Cancer**. . ISSN 1837-9664. 8:11 (2017) 2142–2153. doi: 10.7150/jca.18869.
- DONG, Peixin *et al.* - The impact of microRNA-mediated PI3K/AKT signaling on epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness in endometrial cancer. **Journal of Translational Medicine**. . ISSN 1479-5876. 12:1 (2014) 231. doi: 10.1186/s12967-014-0231-0.
- DONTU, Gabriela *et al.* - Stem cells in normal breast development and breast cancer. **Cell Proliferation**. . ISSN 0960-7722. 36:s1 (2003) 59–72. doi: 10.1046/j.1365-2184.36.s.1.6.x.
- EL-AWADY, Raafat A. *et al.* - Modulation of DNA damage response and induction of apoptosis mediates

synergism between doxorubicin and a new imidazopyridine derivative in breast and lung cancer cells. **DNA Repair**. . ISSN 15687856. 37: (2016) 1–11. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.10.004.

ELBASATEENY, Samah S. *et al.* - Immunohistochemical expression of cancer stem cell related markers CD44 and CD133 in endometrial cancer. **Pathology Research and Practice**. . ISSN 16180631. 212:1 (2016) 10–16. doi: 10.1016/j.prp.2015.10.008.

ELMORE, Susan - Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**. . ISSN 01926233. 35:4 (2007) 495–516. doi: 10.1080/01926230701320337.

ERRANTE, Paolo Ruggero *et al.* - Flow cytometry : a literature review. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. . ISSN 2236-5222. 14: (2015) 211–224. doi: 10.9771/cmbio.v14i2.12182.

ETHIER, Josee Lyne *et al.* - Is hormonal therapy effective in advanced endometrial cancer? A systematic review and meta-analysis. **Gynecologic Oncology**. . ISSN 10956859. 147:1 (2017) 158–166. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.07.002.

FADARE, Oluwole; PARKASH, Vinita - p53 aberrations in low grade endometrioid carcinoma of the endometrium with nodal metastases: Possible insights on pathogenesis discerned from immunohistochemistry. **Diagnostic Pathology**. . ISSN 17461596. 12:1 (2017) 1–8. doi: 10.1186/s13000-017-0668-6.

FLAHAUT, Marjorie *et al.* - Aldehyde dehydrogenase activity plays a Key role in the aggressive phenotype of neuroblastoma. **BMC Cancer**. . ISSN 14712407. 16:1 (2016) 1–13. doi: 10.1186/s12885-016-2820-1.

FLEMING, Gini F. *et al.* - for Endometrial Cancer : a Gynecologic Oncology Group Study. 132:3 (2015) 585–592. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.01.015.Temsirolimus.

FRIEL, Anne M. *et al.* - Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133 positive and negative endometrial cancer cells. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**. . ISSN 1477-7827. 8:1 (2010) 147. doi: 10.1186/1477-7827-8-147.

GADDUCCI, Angiolo; GUERRIERI, Maria Elena - Immune Checkpoint Inhibitors in Gynecological Cancers: Update of Literature and Perspectives of Clinical Research. **Anticancer Research**. . ISSN 02507005. 37:11 (2017) 5955–5965. doi: 10.21873/anticancer.12042.

GAGNON, Véronique *et al.* - Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. **Apoptosis**. . ISSN 13608185. 13:2 (2008) 259–271. doi: 10.1007/s10495-007-0165-6.

GARGETT, Caroline E.; SCHWAB, Kijana E.; DEANE, James A. - Endometrial stem/progenitor cells: The first 10 years. **Human Reproduction Update**. . ISSN 14602369. 22:2 (2016) 137–163. doi: 10.1093/humupd/dmv051.

GENTILIN, Erica *et al.* - Growth Hormone differentially modulates chemoresistance in human endometrial

- adenocarcinoma cell lines. **Endocrine**. . ISSN 15590100. 56:3 (2017) 621–632. doi: 10.1007/s12020-016-1085-4.
- GERLACH, M. M. *et al.* - Slice cultures from head and neck squamous cell carcinoma: a novel test system for drug susceptibility and mechanisms of resistance. **British Journal of Cancer**. . ISSN 0007-0920. 110:2 (2014) 479–488. doi: 10.1038/bjc.2013.700.
- GONZALEZ, R. J.; TARLOFF, J. B. - Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. **Toxicology in Vitro**. . ISSN 08872333. 15:3 (2001) 257–259. doi: 10.1016/S0887-2333(01)00014-5.
- GUY, Michael S. *et al.* - Progesterin treatment decreases CD133 + cancer stem cell populations in endometrial cancer. **Gynecologic Oncology**. . ISSN 10956859. 140:3 (2016) 518–526. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.12.022.
- HALL, Matthew D. *et al.* - The Role of Cellular Accumulation in Determining Sensitivity to Platinum-Based Chemotherapy. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. . ISSN 0362-1642. 48:1 (2008) 495–535. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.48.080907.180426.
- HAMID, R. *et al.* - Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicology in Vitro**. . ISSN 08872333. 18:5 (2004) 703–710. doi: 10.1016/j.tiv.2004.03.012.
- HARAGUCHI, Naotsugu *et al.* - Characterization of a Side Population of Cancer Cells from Human Gastrointestinal System. **Stem Cells**. . ISSN 10665099. 24:3 (2006) 506–513. doi: 10.1634/stemcells.2005-0282.
- HIRST, Jeff *et al.* - Licofelone enhances the efficacy of paclitaxel in ovarian cancer by reversing drug resistance and tumor stem-like properties. **Cancer Research**. . ISSN 15387445. 78:15 (2018) 4370–4385. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3993.
- HUBBARD, Sonya A. *et al.* - Evidence for cancer stem cells in human endometrial carcinoma. **Cancer Research**. . ISSN 00085472. 69:21 (2009) 8241–8248. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4808.
- HUBBARD, Sonya A.; GARGETT, Caroline E. - A cancer stem cell origin for human endometrial carcinoma? **Reproduction**. . ISSN 17417899. 140:1 (2010) 23–32. doi: 10.1530/REP-09-0411.
- ISLAM, Farhadul *et al.* - Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in cancer recurrence and cancer treatment. **Experimental Cell Research**. . ISSN 10902422. 335:1 (2015) 135–147. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.04.018.
- JANUCHOWSKI, Radosław *et al.* - Inhibition of ALDH1A1 activity decreases expression of drug transporters and reduces chemotherapy resistance in ovarian cancer cell lines. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. . ISSN 18785875. 78 (2016a) 248–259. doi: 10.1016/j.biocel.2016.07.017.
- JANUCHOWSKI, Radosław *et al.* - Analysis of MDR genes expression and cross-resistance in eight drug resistant

ovarian cancer cell lines. **Journal of Ovarian Research**. . ISSN 17572215. 9:1 (2016b) 1–11. doi: 10.1186/s13048-016-0278-z.

JANUCHOWSKI, Radosław; WOJTOWICZ, Karolina; ZABEL, Maciej - The role of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in cancer drug resistance. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. . ISSN 07533322. 67:7 (2013) 669–680. doi: 10.1016/j.biopha.2013.04.005.

JERRY, D. Joseph; TAO, Luwei; YAN, Haoheng - Regulation of cancer stem cells by p53. **Breast Cancer Research**. . ISSN 14655411. 10:4 (2008) 4–6. doi: 10.1186/bcr2133.

JOHNSON, S.; CHEN, H.; LO, P. - In vitro Tumorsphere Formation Assays. **Bio Protocols**. (2013) February 5; 3(3).

KAMPAN, N. C. *et al.* - Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. **Biomed Res Int**. . ISSN 23146133. (2015) 413076. doi: 10.1155/2015/413076.

KATO, K. - Endometrial cancer stem cells: a new target for cancer therapy. **Anticancer Res**. 32:6 (2012) 2283–2293.

KATO, Kiyoko *et al.* - Endometrial cancer side-population cells show prominent migration and have a potential to differentiate into the mesenchymal cell lineage. **The American journal of pathology**. . ISSN 1525-2191. 176:1 (2010) 381–92. doi: 10.2353/ajpath.2010.090056.

KATZUNG; MASTERS; TREVOR - **Farmacologia Básica e Clínica**. (2014) 12ª Edição ed. ISBN 0071764011/9780071764018.

KHARMA, Budiman *et al.* - Utilization of genomic signatures to identify high-efficacy candidate drugs for chemorefractory endometrial cancers. **International Journal of Cancer**. . ISSN 00207136. 133:9 (2013) 2234–2244. doi: 10.1002/ijc.28220.

KIM, S.; ALEXANDER, Caroline M. - Tumorsphere assay provides more accurate prediction of in vivo responses to chemotherapeutics. **Biotechnol Lett**. (2014) March; 36(3): 481–488. doi:10.1007/s10529-013-1393-1.

KONG, Fan-Fei *et al.* - Preliminary identification of endometrial cancer stem cells in vitro and in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. . ISSN 0006291X. 490:2 (2017) 506–513. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.070.

KOSHIYAMA, Masafumi *et al.* - Chemosensitivity testing of paclitaxel versus docetaxel in human gynecological carcinomas: A comparison with carboplatin. **Anticancer Research**. . ISSN 02507005. 26:5 B (2006) 3655–3659.

KOURY, Jeffrey; ZHONG, Li; HAO, Jijun - Targeting Signaling Pathways in Cancer Stem Cells for Cancer Treatment. **Stem Cells International**. . ISSN 16879678. (2017). doi: 10.1155/2017/2925869.

KRISHAN, Atwar *et al.* - The Principles of Flow Cytometry. **Laboratorymedicine**. . ISSN 0302-766X. 32:4

(2001) 207–211. doi: 10.1007/s004410000193.

KYO, Satoru; KATO, Kiyoko - Endometrial Cancer Stem Cell as a Potential Therapeutic Target. **Seminars in Reproductive Medicine**. . ISSN 15264564. 33:5 (2015) 341–349. doi: 10.1055/s-0035-1563407.

LA PORTA, Caterina Am - Thoughts about cancer stem cells in solid tumors. **World journal of stem cells**. . ISSN 1948-0210. 4:3 (2012) 17–20. doi: 10.4252/wjsc.v4.i3.17.

LARANJO, Mafalda *et al* - Mammospheres of hormonal receptor positive breast cancer diverge to triple-negative phenotype. **Breast**. . ISSN 15323080. 38 (2018) 22–29. doi: 10.1016/j.breast.2017.11.009.

LI, Zhuang Hua *et al* - Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7A) is associated with platinum-resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Journal of Translational Medicine**. . ISSN 14795876. 10:1 (2012) 21. doi: 10.1186/1479-5876-10-21.

LIU, Fu Shing - Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**. . ISSN 10284559. 46:1 (2007) 26–32. doi: 10.1016/S1028-4559(08)60102-3.

LIU, Huan *et al* - Spheres from cervical cancer cells display stemness and cancer drug resistance. **Oncology Letters**. . ISSN 17921082. 12:3 (2016) 2184–2188. doi: 10.3892/ol.2016.4893.

LIU, Suiling; LI, Xiaomao - Autophagy inhibition enhances sensitivity of endometrial carcinoma cells to paclitaxel. **International Journal of Oncology**. . ISSN 17912423. 46:6 (2015) 2399–2408. doi: 10.3892/ijo.2015.2937.

MAIOLI, Emanuela *et al* - Critical appraisal of the MTT assay in the presence of Rottlerin and uncouplers. **Biological Procedures Online**. . ISSN 14809222. 11:1 (2009) 227–240. doi: 10.1007/s12575-009-9020-1.

MAHMOOD T.; YANG Ping-Chang. - Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. **North American Journal of Medical Sciences**. (2012) 4(9):429-434. doi:10.4103/1947-2714.100998.

MAMAT, S. *et al* - Transcriptional Regulation of Aldehyde Dehydrogenase IAI Gene by Alternative Spliced Forms of Nuclear Factor Y in Tumorigenic Population of Endometrial Adenocarcinoma. **Genes & Cancer**. . ISSN 1947-6019. 2:10 (2011) 979–984. doi: 10.1177/1947601911436009.

MASUDA, Ayako *et al* - An improved method for isolation of epithelial and stromal cells from the human endometrium. **The Journal of reproduction and development**. . ISSN 1348-4400. 62:2 (2016) 213–8. doi: 10.1262/jrd.2015-137.

MAYERS, Andrea P. *et al* - Tumor mutational analysis of GOG248, a phase II study of temsirolimus or temsirolimus and alternating megestrol acetate and tamoxifen for advanced endometrial cancer (EC): An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. **Gynecol Oncol**. (2016) April;141(1): 43–48. doi:10.1016/j.ygyno.2016.02.025

MEIRELES, Cinthia G. *et al* - Effects of metformin on endometrial cancer: Systematic review and meta-

- analysis. **Gynecologic Oncology**. . ISSN 10956859. 147:1 (2017) 167–180. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.07.120.
- MIRANTES, Cristina *et al.* - Epithelial-to-mesenchymal transition and stem cells in endometrial cancer. **Human Pathology**. . ISSN 00468177. 44:10 (2013) 1973–1981. doi: 10.1016/j.humpath.2013.04.009.
- MOREB, Jan S.; UCAR-BILYEU, Deniz A.; KHAN, Abdullah - Use of retinoic acid/aldehyde dehydrogenase pathway as potential targeted therapy against cancer stem cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. . ISSN 14320843. 79:2 (2017) 295–301. doi: 10.1007/s00280-016-3213-5.
- MORICE, P. *et al.* - Endometrial cancer. **Lancet** (2016) 387: 1094–108.
- MOXLEY, K. M.; MCMEEKIN, D. S. - Endometrial Carcinoma: A Review of Chemotherapy, Drug Resistance, and the Search for New Agents. **The Oncologist**. . ISSN 1083-7159. 15:10 (2010) 1026–1033. doi: 10.1634/theoncologist.2010-0087.
- NAKAMURA, Mitsuhiro *et al.* - Prognostic impact of CD133 expression as a tumor-initiating cell marker in endometrial cancer. **Human Pathology**. . ISSN 00468177. 41:11 (2010) 1516–1529. doi: 10.1016/j.humpath.2010.05.006.
- NASSAR, Dany; BLANPAIN, Cédric - Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**. . ISSN 1553-4006. 11:1 (2016) 47–76. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044438.
- NISHINO, Makoto *et al.* - Variant CD44 expression is enriching for a cell population with cancer stem cell-like characteristics in human lung adenocarcinoma. **Journal of Cancer**. . ISSN 18379664. 8:10 (2017) 1774–1785. doi: 10.7150/jca.19732.
- OZA, Amit M. *et al.* - Phase II Study of Temozolomide in Women With Recurrent or Metastatic Endometrial Cancer: A Trial of the NCIC Clinical Trials Group. **Journal of Clinical Oncology**. . ISSN 0732-183X. 29:24 (2011) 3278–3285. doi: 10.1200/JCO.2010.34.1578.
- PLUCHINO, N.; TAYLOR, H. S. - Endometriosis and Stem Cell Trafficking. **Reproductive Sciences**. . ISSN 1933-7191. 23:12 (2016) 1616–1619. doi: 10.1177/1933719116671219.
- PONTI, Dario *et al.* - Isolation and In vitro Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem / Progenitor Cell Properties. 13 (2005) 5506–5512.
- PRAT, Jaime *et al.* - Endometrial carcinoma: pathology and genetics. **Pathology**. . ISSN 00313025. 39:1 (2007) 72–87. doi: 10.1080/00313020601136153.
- PROSKURYAKOV, Sergey Y.; GABAI, Vladimir L. - Mechanisms of tumor cell necrosis. **Current pharmaceutical design**. . ISSN 13816128. 16:1 (2010) 56–68. doi: 10.2174/138161210789941793.
- QURESHI-BAIG, Komal *et al.* - What do we learn from spheroid culture systems? Insights from tumorspheres derived from primary colon cancer tissue. **PLoS ONE**. . ISSN 19326203. 11:1 (2016) 1–24. doi:

10.1371/journal.pone.0146052.

RAHADIANI, Nur *et al.* - Expression of aldehyde dehydrogenase I (ALDH1) in endometrioid adenocarcinoma and its clinical implications. **Cancer Science**. . ISSN 13479032. 102:4 (2011) 903–908. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01864.x.

RAN, Xiaomin; ZHOU, Ping; ZHANG, Keqiang - Autophagy plays an important role in stemness mediation and the novel dual function of EIG121 in both autophagy and stemness regulation of endometrial carcinoma JEC cells. **International Journal of Oncology**. . ISSN 17912423. 51:2 (2017) 644–656. doi: 10.3892/ijo.2017.4047.

RAO, R. *et al.* - Combination of Pan-Histone Deacetylase Inhibitor and Autophagy Inhibitor Exerts Superior Efficacy against Triple-Negative Human Breast Cancer Cells. **Molecular Cancer Therapeutics**. . ISSN 1535-7163. 11:4 (2012) 973–983. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0979.

RODRIGUEZ-FREIXINOS, Victor; KARAKASIS, Katherine; OZA, Amit M. - New Targeted Agents in Endometrial Cancer: Are We Really Making Progress? **Current Oncology Reports**. . ISSN 15346269. 18:4 (2016) 1–12. doi: 10.1007/s11912-016-0507-z.

RUTELLA, Sergio *et al.* - Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors. **Clinical Cancer Research**. . ISSN 10780432. 15:13 (2009) 4299–4311. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1883.

SALVESEN, Helga B.; HALDORSEN, Ingrid S.; TROVIK, Jone - Markers for individualised therapy in endometrial carcinoma. **The Lancet Oncology**. . ISSN 14702045. 13:8 (2012) e353–e361. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70213-9.

SAVITSKAYA M. A.; ONISHCHENKO G. E. - Mechanisms of Apoptosis. **Biochemistry**, (2015) Vol. 80, No. 11, pp. 13931-405.

SEHOULI, Jalid *et al.* - New aspects of adjuvant therapy in endometrial cancer: current standards and future directions. **Critical reviews in oncology/hematology**. . ISSN 1040-8428. 67:3 (2008) 204–12. doi: 10.1016/j.critrevonc.2008.02.011.

SELVAKUMARAN M. *et al.* - Enhanced Cisplatin Cytotoxicity by Disturbing the Nucleotide Excision Repair Pathway in Ovarian Cancer Cell Lines. **CANCER RESEARCH** 63, 1311–1316, March 15 (2003).

SERAMBEQUE, Beatriz - Avaliação da resposta citotóxica da combinação da terapia fotodinâmica com a doxorubicina em osteossarcoma in vitro. Coimbra: Instituto Politécnico de Coimbra, 2015.

SHETZER, Yoav *et al.* - The paradigm of mutant p53-expressing cancer stem cells and drug resistance. **Carcinogenesis**. . ISSN 14602180. 35:6 (2014) 1196–1208. doi: 10.1093/carcin/bgu073.

SIEMENS, Helge *et al.* - Repression of c-Kit by p53 is mediated by miR-34 and is associated with reduced chemoresistance, migration and stemness. **Oncotarget**. . ISSN 1949-2553. 4:9 (2013) 1399–1415. doi:

10.18632/oncotarget.1202.

SINGH, M. *et al.* - Relationship of estrogen and progesterone receptors to clinical outcome in metastatic endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. **Gynecol Oncol.** (2007) Aug;106(2):325-33 doi: 10.1016/j.ygyno.2007.03.042

SLOMOVITZ, Brian M.; COLEMAN, Robert L. - The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. **Clinical Cancer Research.** . ISSN 10780432. 18:21 (2012) 5856–5864. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0662.

SOROSKY, Joel I. - Endometrial Cancer. **Obstetrics & Gynecology.** . ISSN 0029-7844. 120:2, Part 1 (2012) 383–397. doi: 10.1097/AOG.0b013e3182605bfl.

STACEY RICCI, M.; ZONG, W. - Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. **Oncologist.** 11:4 (2006) 342–357. doi: 10.1634/theoncologist.11-4-342.Chemotherapeutic.

STROBER, Warren - Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]**. . ISSN 1934368X. 111:November (2015) 1–3. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111.

SUN, Yi *et al.* - Isolation of Stem-Like Cancer Cells in Primary Endometrial Cancer Using Cell Surface Markers CD133 and CXCR4. **Translational Oncology.** . ISSN 19365233. 10:6 (2017) 976–987. doi: 10.1016/j.tranon.2017.07.007.

SWIFT, Lonnie P. *et al.* - Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. **Cancer Research.** . ISSN 00085472. 66:9 (2006) 4863–4871. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3410.

TAKEBE, Naoko *et al.* - Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. **Nature Reviews Clinical Oncology.** . ISSN 17594774. 8:2 (2011) 97–106. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.196.

TAKEBE, Naoko *et al.* - Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: Clinical update. **Nature Reviews Clinical Oncology.** . ISSN 17594782. 12:8 (2015) 445–464. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.61.

TAKENAKA, Konii *et al.* - The emerging role of long non-coding RNAs in endometrial cancer. **Cancer Genetics.** . ISSN 22107770. 209:10 (2016) 445–455. doi: 10.1016/j.cancergen.2016.09.005.

TANAKA, Tetsuji; TOUJIMA, Saori; TANAKA, Junko - Differential sensitivity to paclitaxel-induced apoptosis and growth suppression in paclitaxel-resistant cell lines established from HEC-1 human endometrial adenocarcinoma cells. **International Journal of Oncology.** . ISSN 10196439. 41:5 (2012) 1837–1844. doi: 10.3892/ijo.2012.1600.

THORN, Caroline F. *et al.* - Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenetics and Genomics.** ISSN 1744-6872. 21:7 (2011) 440–446. doi: 10.1097/FPC.0b013e32833ffb56.

TOGASHI K. *et al.* - A Small-molecule Kinase Inhibitor, CEP-1347, Inhibits Survivin Expression and Sensitizes

- Ovarian Cancer Stem Cells to Paclitaxel. **Anticancer Research**. Aug;38(8):4535-4542. (2018) doi: 10.21873/anticancerres.12757.
- TOMITA, Hiroyuki *et al.* - Aldehyde dehydrogenase IAI in stem cells and cancer. **Oncotarget**. . ISSN 1949-2553. 7:10 (2016) 11018–32. doi: 10.18632/oncotarget.6920.
- TRAN, Arthur-Quan; GEHRIG, Paola - Recent Advances in Endometrial Cancer. **F1000Research**. . ISSN 2046-1402. 6:2017) 81. doi: 10.12688/f1000research.10020.1.
- ULLAH, Imran; SUBBARAO, Raghavendra Baregundi; RHO, Gyu Jin - Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. **Bioscience Reports**. . ISSN 0144-8463. 35:2 (2015) 1–18. doi: 10.1042/BSR20150025.
- UNGER, Florian T. *et al.* - DNA damage induced by cis- and carboplatin as indicator for in vitro sensitivity of ovarian carcinoma cells. **BMC Cancer**. . ISSN 14712407. 9: (2009) 359. doi: 10.1186/1471-2407-9-359.
- VAN DER ZEE, Marten *et al.* - IL6/JAK1/STAT3 signaling blockade in endometrial cancer affects the ALDHhi/CD126+ stem-like component and reduces tumor burden. **Cancer Research**. . ISSN 15387445. 75:17 (2015) 3608–3622. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2498.
- VAN TONDER, Alet; JOUBERT, Annie M.; CROMARTY, A. Duncan - Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Research Notes**. . ISSN 17560500. 8:1 (2015) 1–10. doi: 10.1186/s13104-015-1000-8.
- VAZ, Arokia P. *et al.*, - A concise review on the current understanding of pancreatic cancer stem cells. **J Cancer Stem Cell Res**. (2014).
- VERMEULEN, Katrien; VAN BOCKSTAELE, Dirk R.; BERNEMAN, Zwi N. - Apoptosis: Mechanisms and relevance in cancer. **Annals of Hematology**. . ISSN 09395555. 84:10 (2005) 627–639. doi: 10.1007/s00277-005-1065-x.
- WANG, Huan *et al.* - Mammalian target of rapamycin inhibitor RAD001 sensitizes endometrial cancer cells to paclitaxel-induced apoptosis via the induction of autophagy. **Oncology Letters**. . ISSN 17921082. 12:6 (2016) 5029–5035. doi: 10.3892/ol.2016.5338.
- WANG, Li *et al.* - Enrichment and characterization of cancer stem-like cells from a cervical cancer cell line. **Molecular Medicine Reports**. . ISSN 1791-2997. 1 (2014) 2117–2123. doi: 10.3892/mmr.2014.2063.
- WIK, Elisabeth *et al.* - Lack of estrogen receptor- α is associated with epithelial-mesenchymal transition and PI3K alterations in endometrial carcinoma. **Clinical Cancer Research**. . ISSN 10780432. 19:5 (2013) 1094–1105. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3039.
- WILLIAM H. MATSUI, MD - Cancer stem cell signaling pathways. **Medicine**. . ISSN 1536-5964. 95:1 Suppl 1

(2016) S8–S19. doi: 10.1097/MD.0000000000004765.

WILSON H. et al. - Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. **Vet J** (2008) 175: 69–75, doi:10.1016/j.tvjl.2007.07.025.

XU, Chengfang *et al.* - Combination effects of paclitaxel with signaling inhibitors in endometrial cancer cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. . ISSN 15137368. 12:11 (2011) 2951–2957.

YANG, Xiaokui *et al.* - Akt-mediated cisplatin resistance in ovarian cancer: Modulation of p53 action on caspase-dependent mitochondrial death pathway. **Cancer Research**. . ISSN 00085472. 66:6 (2006) 3126–3136. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0425.

YOKOYAMA, Yuhki *et al.* - BET inhibitors suppress ALDH activity by targeting ALDH1A1 super-enhancer in ovarian cancer. **Cancer Research**. . ISSN 15387445. 76:21 (2016) 6320–6330. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0854.

ZHANG, Linlin *et al.* - Tumorspheres derived from prostate cancer cells possess chemoresistant and cancer stem cell properties. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. . ISSN 01715216. 138:4 (2012) 675–686. doi: 10.1007/s00432-011-1146-2.

ZHANG, Zhenfeng *et al.* - BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy in ovarian cancer by downregulating foxm1. **Theranostics**. . ISSN 18387640. 6:2 (2016) 219–230. doi: 10.7150/thno.13178.

ANEXOS

Índice de figuras

Figura 1 - Principais modelos de carcinogénese: o modelo hierárquico (A) e o modelo estocástico (B). O modelo hierárquico, contrariamente ao modelo estocástico, afirma que nem todas as células do tumor, mas apenas uma pequena subpopulação, apresenta capacidade de originar tumores. Abreviaturas: TIC, célula iniciadora tumoral (do inglês, tumor initiating cell) (Adaptado de Nassar e Blanpain, 2016).	22
Figura 2 - Vias de sinalização de células estaminais NOTCH, WNT e HEDGEHOG. Abreviaturas: NICD, NOTCH intracellular domain; TACE, TNF- α converting enzyme; SMO, recetor smoothed (Adaptado de Takebe et al., 2011; Vaz et al., 2014; Carvalho, 2015) e de Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).	23
Figura 3 - Constituição do endométrio humano (Adaptado de Darzi et al., 2016; Gargett, Schwab e Deane, 2016 e de Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).	27
Figura 4 - Via de sinalização PI3K/AKT/mTOR. A perda da função de PTEN resulta na ativação de AKT, que subsequentemente regula positivamente a atividade mTOR (Adaptado de Slomovitz e Coleman, 2012 e de e de Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).	32
Figura 5 - Vias moleculares e potenciais alvos terapêuticos no cancro do endométrio (Adaptado de Dong et al., 2014 e de e de Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).	39
Figura 6 - Possível localização das células estaminais do endométrio (Adaptado de (Gargett, Schwab e Deane, 2016; Carvalho, 2015).	43
Figura 7 - A família ALDH metaboliza o ácido retinoico, regulando assim a autorrenovação, diferenciação e resistência tumoral de células estaminais normais e CSCs. O retinol captado pelas células é oxidado em retinal. O retinal é oxidado em ácido retinoico por enzimas ALDH1. O ácido retinoico liga-se a dímeros de RAR α e RXRs para induzir a expressão dos seus genes alvo a jusante incluindo RAR β . Nas células que expressam ER α , o ácido retinoico pode ligar-se a dímeros de RXRs e ER α , bem como induzir a expressão de c-MYC e ciclina-D1. Abreviaturas: RAR, recetor de ácido retinoico; RXR, recetor de retinoide X; ER, recetor de estrogénio; ROS, espécies reativas de oxigénio. (Adaptado de Tomita et al., 2016 e de e de Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).	49

Figura 8 - Caracterização das células tumorais do endométrio. (A) - Imagem das linhas celulares RL95-2 e ECC-1, de uma população de esferas, ESI RL95-2 e ESI ECC-1, e de uma população derivada aderente diferenciada, GI RL95-2 e GI ECC-1. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 100x, em RL95-2 e GI RL95-2, e com uma ampliação de 200x, em ESI RL95-2. (B) - Capacidade de formação de esferas da linha RL95-2. Os resultados apresentados representam a média e o erro padrão de pelo menos sete ensaios independentes. (C) - Capacidade de autorrenovação de esferas de RL95-2. Os valores apresentados representam a média e o erro padrão de pelo menos sete ensaios independentes. (D) - Área média ocupada pelas esferas de RL95-2. Os resultados apresentados exprimem a média do número de pixels e o erro padrão de pelo menos 120 imagens por cada condição obtidas em pelo menos quatro ensaios independentes. (E) - Tempo de duplicação apresentado pela linha celular RL95-2 e pelas derivadas aderentes GI RL95-2. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de três ensaios. (F) - Percentagem de células de cada população tumoral do endométrio pelas populações CD44⁺/CD24⁻, CD44^{débil}/CD24⁻, CD44^{débil}/CD24[±] e CD44⁻/CD24⁺. Os valores exprimem a média e o erro padrão de pelo menos duas experiências independentes em duplicado. (G) - Expressão de CD133 na linha RL95-2, ESI RL95-2 e GI RL95-2. Os valores apresentados exprimem a média de intensidade de fluorescência e o erro padrão de pelo menos dois ensaios independentes em duplicado. (H) - Histogramas representativos da marcação de CD133 nas células RL95-2, ESI RL95-2 e GI RL95-2. As linhas verde, rosa, azul e amarela correspondem às populações CD44⁺/CD24⁻, CD44^{débil}/CD24⁻, CD44^{débil}/CD24[±] e CD44⁻/CD24⁺, respetivamente. (I) - Plots representativos da marcação de CD44/CD24 nas populações tumorais do endométrio de um dos ensaios. O código de cores, corresponde ao descrito para a secção H. (J) - Expressão da ALDH na linha celular RL95-2, nas esferas ESI RL95-2 e nas derivadas aderentes GI RL95-2. Os valores apresentados correspondem à razão entre as intensidades de fluorescência da ALDH e da β -actina. Os gráficos representam a alteração relativamente à linha celular RL95-2 (razão ALDH/actina do controlo igual a 1). Os resultados apresentados correspondem à média e ao erro padrão de pelo menos dois ensaios independentes. (K) - Expressão da P53 na linha celular RL95-2, nas esferas ESI RL95-2 e nas derivadas aderentes GI RL95-2. Os valores apresentados correspondem à razão entre as intensidades de fluorescência da P53 e da β -actina. Os gráficos representam a alteração relativamente à linha celular RL95-2 (razão ALDH/actina do controlo igual a 1). Os resultados apresentados correspondem à média e ao erro padrão de pelo menos dois ensaios independentes. A significância estatística está representada com ** para $p < 0,010$ e * para $p < 0,050$. 80

Figura 9 - Avaliação da atividade metabólica das linhas celulares humanas de cancro do endométrio, RL95-2 e ECC-1, após 48 horas de incubação com o inibidor da ALDH, ATRA. Os resultados apresentados

correspondem à média e ao erro padrão de dois ensaios independentes realizados em triplicado. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$ e *** para $p < 0,001$ 81

Figura 10 - Avaliação da atividade metabólica das linhas celulares humanas de cancro do endométrio, RL95-2 e ECC-1, após 48 horas de incubação com o inibidor da ALDH, DEAB. Os valores apresentados correspondem à média e ao erro padrão de dois ensaios independentes realizados em triplicado. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$ e *** para $p < 0,001$ 82

Figura 11 - Avaliação da atividade metabólica das linhas celulares humanas de cancro do endométrio, RL95-2 e ECC-1, após 48 horas de incubação com o inibidor da ALDH, JQ1. Os resultados apresentados representam à média e ao erro padrão de dois ensaios independentes realizados em triplicado. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$ 83

Figura 12 - Expressão da ALDH nas linhas celulares RL95-2 e ECC1, após incubação com o inibidor ATRA. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da ALDH e da Actina e os gráficos representam a alteração relativamente a cada linha celular submetida ao solvente do inibidor (razão ALDH/actina do solvente igual a 1). Os valores apresentados são referentes a pelo menos dois ensaios independentes. 84

Figura 13 - Expressão da ALDH nas linhas celulares RL95-2 e ECC1, após incubação com o inibidor DEAB. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da ALDH e da Actina e os gráficos representam a alteração relativamente a cada linha celular submetida ao solvente do inibidor (razão ALDH/actina do solvente igual a 1). Os resultados apresentados são referentes a pelo menos dois ensaios independentes. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$ 84

Figura 14 - Expressão da ALDH nas linhas celulares RL95-2 e ECC1, após incubação com o inibidor JQ1. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da ALDH e da Actina e os gráficos representam a alteração relativamente a cada linha celular submetida ao solvente do inibidor (razão ALDH/actina do solvente igual a 1). Os valores apresentados representam pelo menos dois ensaios independentes. 85

Figura 15 - Capacidade de formação de esferas, obtidas através das linhas celulares de cancro do endométrio, RL95-2 e ECC-1, submetidas ou não à ação do inibidor da ALDH, DEAB. Os resultados apresentados representam a média e o erro padrão de pelo menos sete ensaios independentes. A significância estatística está representada com ** para $p < 0,010$ 86

Figura 16 - Capacidade de autorrenovação de esferas, ESI RL95-2 e ESI ECC-1, também sob a influência de DEAB. Os valores apresentados representam a média e o erro padrão de pelo menos sete ensaios independentes. 86

- Figura 17 - Imagens das esferas, ESI RL95-2 e ESI ECC-1, representativas das fotografias obtidas para análise da área ocupada pelas esferas. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 200x.87
- Figura 18 - Área média ocupada pelas esferas, ESI RL95-2 e ESI ECC-1, também sob influência do inibidor DEAB. Os resultados apresentados exprimem a média do número de pixéis e o erro padrão de pelo menos 120 imagens por cada condição obtidas em pelo menos quatro ensaios independentes. A significância estatística está representada com *** para $p < 0,001$87
- Figura 19 - Eficiência clonogénica apresentadas pelas esferas da linha ECC-1, ESI ECC-1, e das esferas submetidas ao inibidor DEAB. Os resultados representam a média e o erro padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado. A significância estatística está representada com * para $p < 0,050$88
- Figura 20 - Expressão de CD133 nas esferas ESI RL95-2 e ESI ECC-1 e ESI submetidas ao inibidor DEAB. Os valores apresentados exprimem a média de intensidade de fluorescência e o erro padrão de pelo menos dois ensaios independentes realizados em duplicado. A significância estatística está representada com * para $p < 0,050$, com ** para $p < 0,010$ e com *** para $p < 0,001$89
- Figura 21 - Histogramas representativos da marcação de CD133 nas ESI RL95-2 e ESI ECC-1 e ESI submetidas ao inibidor DEAB num dos ensaios. Nos histogramas, as linhas verde, rosa, azul e amarela correspondem às populações $CD44^+/CD24^-$, $CD44^{débil}/CD24^-$, $CD44^{débil}/CD24^\pm$ e $CD44^-/CD24^+$, respetivamente.90
- Figura 22 - Plots representativos da marcação de CD44/CD24 nas populações de CSC do endométrio e sob a expressão de DEAB num dos ensaios. As linhas verde, rosa, azul e amarela correspondem às populações $CD44^+/CD24^-$, $CD44^{débil}/CD24^-$, $CD44^{débil}/CD24^\pm$ e $CD44^-/CD24^+$, respetivamente.90
- Figura 23 - Expressão da ALDH das esferas ESI RL95-2 e ESI ECC-1, submetidas ao inibidor DEAB. Os resultados apresentados exprimem a razão entre as intensidades de fluorescência da ALDH e da β -actina. Os gráficos representam a alteração relativamente às esferas ESI RL95-2 e ESI ECC-1, não submetidas ao inibidor (razão ALDH/actina do controlo igual a 1). Os resultados apresentados correspondem à média e ao erro padrão de pelo menos quatro ensaios independentes.91
- Figura 24 - Expressão da P53 das esferas ESI RL95-2 e ESI ECC-1, submetidas ao DEAB. Os resultados apresentados exprimem a razão entre as intensidades de fluorescência da P53 e da β -actina. Os gráficos representam a alteração relativamente às esferas ESI RL95-2 e ESI ECC-1, não submetidas ao inibidor (razão ALDH/actina do controlo igual a 1). Os valores apresentados correspondem à média e ao erro padrão de pelo menos três ensaios independentes.92

- Figura 25 - Atividade metabólica da linha celular RL95-2, das ESI RL95-2 e das GI RL95-2 submetidas a tratamento com carboplatina na concentração de 200 μM (gráfico superior) e de 500 μM (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas, obtida através da técnica de Alamar Blue[®]. Os resultados apresentados representam a média e o erro padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado..... 102
- Figura 26 - Atividade metabólica da linha celular RL95-2, das ESI RL95-2 e das GI RL95-2 submetidas a tratamento com paclitaxel na concentração de 0,3 μM (gráfico superior), de 0,6 μM (gráfico do meio) e de 1,2 μM (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas, obtida através da técnica de Alamar Blue[®]. Os resultados apresentados representam a média e o erro padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado. A significância estatística está representada com * para $p < 0,050$, ** para $p < 0,010$ e *** para $p < 0,001$ 103
- Figura 27 - Atividade metabólica da linha celular RL95-2, das ESI RL95-2 e das GI RL95-2 submetidas a tratamento com doxorrubicina na concentração de 0,05 μM (gráfico superior), de 0,3 μM (gráfico do meio) e de 7,3 μM (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas, obtida através da técnica de Alamar Blue[®]. Os resultados apresentados representam a média e o erro padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado..... 105
- Figura 28 - Atividade metabólica da linha celular RL95-2 e das GI RL95-2 após tratamento com carboplatina na concentração de 200 μM (gráfico superior) e de 500 μM (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas, obtida através do ensaio de MTT. Os valores apresentados representam a média e o erro padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado. 106
- Figura 29 - Atividade metabólica da linha celular RL95-2 e das GI RL95-2 submetidas a tratamento com paclitaxel na concentração de 0,3 μM (gráfico superior), de 0,6 μM (gráfico do meio) e de 1,2 μM (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas, obtida através do ensaio de MTT. Os valores apresentados representam a média e o erro padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado. A significância estatística está representada com * para $p < 0,050$, ** para $p < 0,010$ e *** para $p < 0,001$ 108
- Figura 30 - Atividade metabólica da linha celular RL95-2 e das GI RL95-2 submetidas a tratamento com doxorrubicina na concentração de 0,05 μM (gráfico superior), de 0,3 μM (gráfico do meio) e de 7,3 μM (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas, obtida através do ensaio de MTT. Os valores apresentados representam a média e o erro padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado..... 109
- Figura 31 - Níveis de caspase 3 expressos pelas linhas celulares RL95-2 e ECC-I, ESI RL95-2, ESI ECC-I e derivadas aderentes de ambas as linhas celulares após tratamento com carboplatina. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação ao controlo (células não tratadas), ao qual se considerou

o valor de expressão I. Os valores apresentados são referentes a pelo menos três experiências independentes. A significância estatística está representada com * para $p < 0,050$ e ** para $p < 0,010$ 110

Figura 32 - Níveis de caspase 3 expressos pelas linhas celulares RL95-2 e ECC-1, ESI RL95-2, ESI ECC-1 e derivadas aderentes de ambas as linhas celulares após tratamento com paclitaxel. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação ao controlo (células não tratadas), ao qual se considerou o valor de expressão I. Os valores apresentados são referentes a pelo menos três experiências independentes. 111

Figura 33 - Níveis de caspase 3 expressos pelas linhas celulares RL95-2 e ECC-1, ESI RL95-2, ESI ECC-1 e derivadas aderentes de ambas as linhas celulares após tratamento com doxorubicina. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação ao controlo (células não tratadas), ao qual se considerou o valor de expressão I. Os valores apresentados são referentes a pelo menos três experiências independentes. 111

Figura 34 - Expressão de ALDH nas células RL95-2, ESI RL95-2 e GI RL95-2, após 24 horas de incubação com carboplatina, paclitaxel e doxorubicina. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da ALDH e da actina. Os gráficos representam a alteração relativamente às populações controlo (razão ALDH/actina do controlo igual a 1). Os valores apresentados exprimem a média e o erro-padrão de pelo menos um ensaio. A significância estatística está representada com * para $p < 0,050$ 112

Figura 35 - Expressão de P53 nas populações RL95-2, ESI RL95-2 e GI RL95-2, após 24 horas de incubação com carboplatina, paclitaxel e doxorubicina. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da P53 e da actina. Os gráficos representam a alteração relativamente às populações controlo (razão P53/actina do controlo igual a 1). Os resultados apresentados exprimem a média e o erro-padrão de pelo menos um ensaio. A significância estatística está representada com * para $p < 0,050$ 113

Figura 36 - Imagens representativas dos cometas obtidos nas células RL95-2, ESI RL95-2 e GI RL95-2, submetidas a tratamento com carboplatina, paclitaxel e doxorubicina, durante 24 horas. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 100x. 113

Figura 37 - Imagens das culturas primárias de explantes obtidas das amostras TE-15 (imagem à esquerda) e TE-16 (imagem à direita). As imagens foram obtidas com uma ampliação de 100x. 128

Figura 38 - Populações de esferas, obtidas das amostras TE-15 (imagem à esquerda) e TE-16 (imagem à direita), após 5 dias de protocolo de formação de esferas. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 400x e 200x, respetivamente. 128

Figura 39 - Capacidade de autorrenovação de esferas, ESI TE-15, também sob a influência de DEAB... 129

Figura 40 - Área média ocupada pelas esferas, ESI TE-15, também sob influência do inibidor DEAB. Os resultados apresentados exprimem a média do número de pixéis e o erro padrão de pelo menos 27 imagens por cada condição obtidas num ensaio. A significância estatística está representada com *** para $p < 0,001$.
..... 129

Figura 41 - Imagens das esferas, ESI TE 15, representativas das fotografias obtidas para quantificação da área ocupada pelas esferas. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 200x..... 129

Figura 42 - Representação da expressão dos marcadores de CSC nas secções tumorais do endométrio. Na marcação da expressão da ALDH, o painel A é referente à expressão focal apresentada na secção controlo da amostra TE-13, o painel B é referente à expressão difusa apresentada pela secção controlo da TE-16. Na marcação da expressão da β -catenina, o painel A é referente à expressão positiva apresentada na secção controlo da amostra TE-16, o painel B é referente à expressão positiva apresentada pela secção tratada com carboplatina da TE-17. Na marcação da expressão do CD133, o painel A é referente à expressão positiva apresentada na secção controlo da amostra TE-13, o painel B é referente à expressão positiva apresentada pela secção controlo da TE-16. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 200x.... 131

Figura 43 - Representação da expressão de proteínas associadas a morte celular e do indicador de proliferação nas secções tumorais do endométrio. Na marcação da expressão da P53, o painel A é referente à expressão negativa apresentada na secção controlo da amostra TE-16, o painel B é referente à expressão negativa apresentada pela secção tratada com carboplatina da TE-16. Na marcação da expressão da caspase 3, o painel A é referente à expressão intermédia apresentada na secção tratada com carboplatina da amostra TE-16, o painel B é referente à expressão intermédia apresentada pela secção tratada com paclitaxel da TE-17. Na marcação da expressão do Ki67, o painel A é referente à expressão de 30% de proliferação celular apresentada na secção controlo da amostra TE-13, o painel B é referente à expressão de 60% de proliferação celular apresentada pela secção controlo da TE-16. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 200x..... 133

Índice de tabelas

Tabela 1 — Abordagens usadas na deteção e isolamento das CSC (Islam et al., 2015). Legenda: MACS - magnetic activated cell sorting; RT-PCR - real time - polymerase chain reaction; RT-qPCR - real time - quantitative polymerase chain reaction.	25
Tabela 2 — Marcadores de CSC comumente usados em diversos tipos de tumores (Islam et al., 2015). ..	26
Tabela 3 — Sistema de estadiamento da FIGO para o cancro do endométrio (Colombo <i>et al.</i> , 2011).	30
Tabela 4 — Percentagem de células de cada população de CSC do endométrio pelas populações CD44 ⁺ /CD24 ⁻ , CD44 ^{débil} /CD24 ⁻ , CD44 ^{débil} /CD24 [±] e CD44 ⁻ /CD24 ⁺ . Os valores exprimem a média e o erro padrão de pelo menos duas experiências independentes realizadas em duplicado.	89
Tabela 5 - P90 do momento da cauda dos cometas da linha celular RL95-2, nas ESI RL95-2 e nas GI RL95-2 após o tratamento com carboplatina, paclitaxel e doxorrubicina.....	114
Tabela 6 — Características clínicas e patológicas das doentes.....	127
Tabela 7 — Expressão de marcadores associados a fenótipo de CSC nas amostras tumorais do endométrio.	127
Tabela 8 — Expressão de marcadores de CSC nas amostras tumorais do endométrio submetidas à terapêutica com carboplatina, paclitaxel e doxorrubicina durante 24 horas.	130
Tabela 9 - Expressão de proteínas associadas a morte celular e do indicador de proliferação Ki67 nas amostras tumorais do endométrio submetidas à terapêutica com carboplatina, paclitaxel e doxorrubicina durante 24 horas.....	132

Lista de abreviaturas e símbolos

ABCG2 - *ATP-binding cassette sub-family G member 2*

AKT - *Protein Kinase B*

ALDH - *Aldehyde dehydrogenase*

ATC - *Amplifying trafficking cells*

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP - *Adenosine triphosphate*

ATRA - *Ácido Trans-Retinóico*

BAX - *Bcl-2-associated X protein*

BCA - *Bicinchononic acid*

BCL-2 - *B-cell lymphoma 2*

BCL-XL - *B-cell lymphoma - extra large*

BCRP1 - *Breast cancer resistance protein 1*

bFGF - *Fibroblast growth factor basic*

BRCA - *breast cancer gene 1/2*

BrdU - *bromodeoxyuridine*

BSA - *Bovine serum albumin*

CAD - *Caspase-activated DNase*

CD - *Cluster of differentiation*

CHUC - *Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra*

CSC - *Cancer stem cells*

DEAB - *Dietilaminobenzaldeído*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - *Dimetilsulfóxido*

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

DOC - *2,5-Dimethoxy-4-chloroamphetamine*

DTT - *Dithiothreitol*

EDTA - *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EGF - *Epidermal growth factor*

EGFR - *Epidermal Growth Factor Receptor*

EMT - *Epithelial-Mesenchymal Transition*

ER - *Estrogen receptor*

ERCCI - *Excision repair cross-complementing gene 1*

ES - *Endometrial spheres*

FBS - *Fetal Bovine Serum*

FDA - *Food and Drug Administration*

FIGO - *Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia*

GABA - *Gamma-aminobutyric acid*

GTPase - *guanosine triphosphate*

HER2/NEU - *Human Epidermal growth factor Receptor 2*

HNPCC - *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*

JAK/STAT - *Janus Tyrosine Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*

K-RAS - *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

LRC - *Label-Retaining Cells*

LRP - *low density lipoprotein receptor-related protein*

MACS - *Magnetic Activated Cell Sorting*

MAPK/ERK - *Mitogen-activated Protein/Extracellular Signal-regulated Kinase*

MDR - *Multiple drug resistance*

MLH1 - *MutL homolog 1*

mRNA - *messenger ribonucleic acid*

MSC - *Mesenchymal Stem Cells-like*

MSH2 - *MutS protein homolog 2*

MSH6 - *MutS homolog 6*

MSI - *Microsatellite instability*

mTOR - *Mammalian Target of Rapamycin*

MTT - *brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium*

NAD(P) - *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NER - *Nucleotide excision repair*

NF-κB - *Nuclear Factor kappa B*

NICD - *NOTCH intracellular domain*

NRP2 - *Neuropilin-2*

PARP - *Poly (ADP-ribose) Polymerase*

PBS - *Phosphate buffer saline*

PCR - *Polymerase chain reaction*

PD-1 - *Programmed cell death-1*

PDGF-R β - *platelet derived growth factor receptor-beta*

PD-L1 - *Programmed cell death-ligand 1*

Pg-P - *Glycoprotein P*

PI3K/AKT - *Phosphatidylinositol-3-kinase/Protein Kinase B*

PI3K/AKT/mTOR - *Phosphatidylinositol-3-kinase/Protein Kinase B/mammalian Target of Rapamycin*

PI3KCA - *phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha*

PMSF - *Phenylmethanesulfonyl fluoride*

POLE - *Polymerase epsilon*

PR - *Progesterone receptor*

PTEN - *Phosphatase and Tensin Homolog*

PVDF - *Polyvinylidene difluoride*

RAR - *receptor de ácido retinoico*

Rb - *Retinoblastoma*

RIPA - *tampão de radioimunoprecipitação*

ROS - *espécies reativas de oxigénio*

RPMI - *Rooswell Park Memorial Institute 1640 Medium*

RRM1 - *Ribonucleotide reductase M1*

RT-PCR - *Real Time - Polymerase Chain Reaction*

RT-qPCR - *Real Time - quantitative Polymerase Chain Reaction*

RXR - *receptor de retinoide X*

SDS - *Sodium dodecyl sulfate*

SMO - *Receptor smoothened*

SP - *Side population*

SSC - *Somatic stem cells*

TACE – *TNF- α converting enzyme*

TBST - *Tris-Buffered Saline Tween-20*

TE - *Tumor endometrial*

TGF β - *Transforming Growth Factor- β*

TIC - *tumor initiating cell*

TNF - *Tumor necrosis factor*

TRAIL - *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*



MINISTÉRIO DA SAÚDE
 HOSPITAIS DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
 Av. Bissaya Barreto
 e
 Praceta Prof. Mota Pinto
 3000-075 COIMBRA

Telefones { Bloco Central / Bloco de Celas { 239 400 400
 239 400 500
 239 400 600
 Maternidade Dr. Daniel de Matos - 239 403 939
 Telefax n.º 239 823 907

Visto / Ao
 G.A.I. para
 difusão

19/12/05
 H.U.C.
 Prof. Doutor João Pedroso de Lima
 Director Clínico

COMISSÃO DE ÉTICA PARA A SAÚDE

Presidente: Prof. Doutor José Joaquim Sousa Barros; Vice-Presidente:
 Dr. David Amador Rocha; Vogais: Dra. Maria Odete Isabel; Prof. Doutor
 Carlos Alberto Fontes Ribeiro; Enfermeiro: José Mendes Bajanca;
 Jurista: Prof. Doutor José de Faria e Costa;
 Teólogo: Padre José António Afonso Pais

Exmo. Senhor:
 Director Clínico dos HUC

N/Ref^ª
 CES

Ofício N^º
 1013

Data
 19.12.2005

ASSUNTO: Banco de Tumores de Ginecologia e da Mama - "Propostas de Consentimento Informado - uma, para a colheita de tecido fresco e/ou plasma e seu armazenamento, e outra, para base de dados pessoais" - Prof. Doutor Carlos Freire de Oliveira - Director do Serviço de Ginecologia.

A Comissão de Ética para a Saúde dos Hospitais da Universidade de Coimbra, na sua reunião do dia 15 de Dezembro de 2005, após análise das propostas mencionadas em epígrafe, deu parecer favorável às formulações de consentimento informado.

Com os nossos melhores cumprimentos.

O PRESIDENTE DA COMISSÃO DE ÉTICA

Prof. Doutor José Joaquim Sousa Barros



Consentimento

Para a colheita de tecido fresco e/ou plasma e seu armazenamento

Eu _____

tendo em conta os esclarecimentos prestado de acordo com a Lei nº 12/2005 de 26 de Janeiro, autorizo que, nos Serviços de Ginecologia e de Anatomia Patológica dos "Hospitais da Universidade de Coimbra" (HUC), seja colhido tecido fresco do meu organismo e/ou sangue (plasma) e que estes sejam congelados, por um período de vinte anos, contados a partir deste consentimento.

Sei que o material colhido será utilizado com o único objectivo de investigação básica ou aplicada, sem fins lucrativos; sei que a investigação em Medicina e Biologia Molecular no futuro poderá proporcionar melhores cuidados de diagnóstico ou tratamento a doentes. A investigação não me traz directamente quaisquer riscos ou benefícios.

Os responsáveis pelo banco são os Serviços de Ginecologia e de Anatomia Patológica dos HUC.

Sei que não sofro qualquer dano por dar este consentimento e o material colhido será armazenado com garantia de segurança, garantindo a privacidade e a confidencialidade das pessoas participantes.

Os resultados obtidos com a investigação realizada neste material não me serão comunicados.

Data ____/____/____

A Doente

O Médico

LISTA DE SERVIÇO

David Rebelo
Doutora Isabel Torgal
Vatália Amaral

ESTUDANTES GRADUADOS

Isabel Dias
Maria Gil Sampaio
Ilsa Abraú
Carlos Marques
Luí Lagarto
Luís Almeida e Sousa
Carlos Guerra
Filipe Raimundo
Luís Falcão
Doutor Fernando Mota
Arlete Manarte
Doutora Margarida F. Dias
Carlos Coimbra
Cristina Frutuoso

ESTUDANTES EVENTUAIS

Carlos Nobre

SULTORES

Patol.: Drª Teresa Simões Silva
Histórica: Dr. M.J. Freire dos Santos
Gin.: Dr. António Jorge Pinho
Mamária: Drª Manuela Gonçalo
Ginecologia Interna: Drª Isabel Fonseca
Terapia: Drª Paula Soares
Ginologia: Drª Graça Santos
Gin.: Prof. Doutor Arnaldo Figueiredo

ENFERMEIRAS-CHEFE

Graça Silva
Fernanda Matias

P. SECRETARIADO CLÍNICO

Áudria Rodrigues

Apartado 9015
HUC
Praçeta Mota Pinto
PT, 3001-301 COIMBRA

##351.239.400-500/-600

ext.:
10312 - Ana Paula
10305 - Maria José

##351.239.721-478/837-083

Paula: anapar@huc.min-saude.pt
Maria José: dirginec@huc.min-saude.pt



Consentimento
para base de dados pessoais

CHEFES DE SERVIÇO

Dr. David Rebelo
Prof.^a Doutora Isabel Torgal
Dr.^a Natália Amaral

ASSISTENTES GRADUADOS

Dr.^a Isabel Dias
Dr.^a Maria Gil Sampaio
Dr.^a Elsa Abraúl
Dr. Carlos Marques
Dr. Rui Lagarto
Dr. Luís Almeida e Sousa
Dr. Carlos Guerra
Prof.^a Mestre Dulce Raimundo
Dr. Francisco Falcão
Prof. Doutor Fernando Mota
Dr.^a Arlete Manarte
Prof.^a Doutora Margarida F. Dias
Dr. Carlos Coimbra
Dr.^a Cristina Frutuoso

ASSISTENTES EVENTUAIS

Dr. Carlos Nobre

CONSULTORES

Anat. Patol.: Dr.^a Teresa Simões Silva
Cir. Plástica: Dr. M.J. Freire dos Santos
Cirurgia: Dr. António Jorge Pinho
Imag. Mamária: Dr.^a Manuela Gonçalo
Medicina Interna: Dr.^a Isabel Fonseca
Radioterapia: Dr.^a Paula Soares
Sexologia: Dr.^a Graça Santos
Urologia: Prof. Doutor Arnaldo Figueiredo

ENFERMEIRAS-CHEFE

Enf.^a Graça Silva
Enf.^a Fernanda Matias

RESP. SECRETARIADO CLÍNICO

D. Cláudia Rodrigues

Eu _____
tendo em conta os esclarecimentos prestados de acordo com a Lei nº 67/98 de 26 de Outubro, autorizo que, nos Serviços de Ginecologia e de Anatomia Patológica dos "Hospitais da Universidade de Coimbra" (HUC), construam uma base de dados que tem como único objectivo o armazenamento de informação obtida através da investigação realizada com o material biológico que anteriormente colheram do meu organismo. Os dados serão armazenados pelo período correspondente àquela investigação - vinte anos contados a partir daquela recolha. Os dados são recolhidos com o único objectivo de servirem a investigação básica ou aplicada, sem fins lucrativos, que se pretende realizar, e que no futuro poderá proporcionar melhores cuidados de diagnóstico ou tratamento a doentes.

Os dados da minha história clínica apenas serão integrados nesta base, quando se tornem indispensáveis para esta investigação.

Qualquer comunicação ou utilização dos meus dados para outras investigações apenas será realizada, após completa e irreversível anonimização dos dados.

Sei que não sofro qualquer dano por dar este consentimento e os dados serão conservados com garantia de segurança da minha privacidade e confidencialidade.

Sempre que achar conveniente terei direito a solicitar a sua eliminação, nos termos da Lei.

Data ____/____/____

A Doente

O Médico

Apartado 9015
HUC
Praceta Mota Pinto
PT, 3001-301 COIMBRA

##351.239.400-500/-600
ext.:
10312 - Ana Paula
10305 - Maria José

##351.239.721-478/837-083

Ana Paula: anapar@huc.min-saude.pt
Maria José: dirginec@huc.min-saude.pt



COMISSÃO NACIONAL
DE PROTECÇÃO DE DADOS

Para:
Presidente do Conselho de
Administração do Hospital da
Universidade de Coimbra
Praceta Mota Pinto
3000 - 075 COIMBRA

N/Ref. 02.02
Proc. n.º 938/2006
Of. n.º 6154 18/09/2007

Assunto: Legalização de tratamentos automatizados de dados pessoais.

Com referência ao assunto em epígrafe, fica(m) V. Exa(s), devidamente notificado(s) para todo o conteúdo da Autorização desta CNPD n.º 1692/2007, proferida em 17 de Setembro p. p., cuja cópia se anexa.

Com os melhores cumprimentos.

A Secretária da C.N.P.D,

(Isabel Cristina Cruz)

RC

Rua de São Bento, 148 - 3.º - 1200-821 LISBOA — Telefone: 213 928 400 - Fax: 213 976 832
E-mail: geral@cnpd.pt Internet: <http://www.cnpd.pt>



COMISSÃO NACIONAL
DE PROTECÇÃO DE DADOS

Processo n.º 938/06

AUTORIZAÇÃO N.º 692/2007

Os Hospitais da Universidade de Coimbra, notificou um tratamento de dados pessoais com a finalidade efectuar estudos científicos na área da saúde.

Os HUC, no âmbito da prestação de cuidados de saúde, possuem material biológico e pretendem constituir um banco de material biológico com a finalidade de desenvolver estudos de investigação científica.

Os dados a recolher são: número de processo, quatro primeiras iniciais do nome, serviço requisitante, data da colheita e material biológico.

A CNPD já se pronunciou na sua Deliberação n.º 227/2007 sobre o enquadramento legal, os fundamentos de legitimidade, os princípios orientadores para o correcto cumprimento da Lei de Protecção de Dados, bem como as condições gerais aplicáveis ao tratamento de dados pessoais para a finalidade de estudos científicos.

No caso em apreço, a notificação enquadra-se apenas parcialmente no âmbito tipificado pela referida Deliberação. De facto, o presente tratamento consiste na criação de um biobanco com o objectivo futuro de permitir a realização de estudos de investigação.

Para o processamento da informação com vista à criação e manutenção deste tratamento de dados, será necessário obter o consentimento expresso e prévio e garantir o direito de informação ao titular.

Assim, mantendo-se a fundamentação daquela Deliberação, importa atender ao disposto nos artigos 18º e 19º da Lei n.º 12/2005, de 26 de Janeiro, designadamente no que respeita às exigências específicas do conteúdo do consentimento (n.º 5 do art.º 18º).

Só nestas condições a recolha de dados pessoais será lícita para esta finalidade (art.º 5º, n.º 1 al. a) e b) da Lei 67/98).



O fundamento de legitimidade terá de ser, pelos motivos constantes na referida Deliberação e dos aqui expostos, o consentimento do titular dos dados.

Importa ainda realçar que, nos termos do n.º 11 do referido artigo 19º da Lei n.º 12/2005, que as amostras devem ser codificadas, devendo os códigos ficar armazenados separadamente, mas sempre em instituições públicas.

Deve o responsável garantir, também, o cumprimento do n.º 15 do já citado artigo 19º, no que respeita à informação ao titular quando ocorra qualquer das situações aí previstas.

No que respeita aos estudos que venham a ser elaborados com base no banco de amostras existentes constituem tratamentos de dados autónomos, pelo que, nos termos do disposto no artigo 27º da LPD, têm de ser notificados de *per si* e obtido o respectivo consentimento do titular.

Assim, tendo em atenção o disposto nas disposições combinadas dos artigos 28º, n.º1, alínea a) e 30º da Lei n.º 67/98, de 26 de Outubro, as disposições citadas da Lei n.º 12/2005 e as condições e limites fixados na referida Deliberação, que se dão aqui por reproduzidos e que também fundamentam esta decisão, autoriza-se o tratamento de dados pessoais nos seguintes termos:

Responsável pelo tratamento: Hospitais da Universidade de Coimbra

Finalidade: constituir um banco de material biológico com a finalidade de desenvolver estudos de investigação científica.

Categoria de Dados pessoais tratados: número de processo, quatro primeiras iniciais do nome, serviço requisitante, data da colheita e material biológico.

Entidades a quem podem ser comunicados: Não há.

Formas de exercício do direito de acesso e rectificação: junto do responsável. Porque há tratamento de dados de saúde, o direito de acesso deverá ser exercido, nos termos do n.º 5 do artigo 11º da Lei 67/98, isto é, por intermédio de médico escolhido pelo titular dos dados, que pode ser, a solicitação do titular o médico/investigador e no exercício do direito de rectificação deste tipo de dados, deverá o titular, de igual modo,



COMISSÃO NACIONAL
DE PROTECÇÃO DE DADOS

exercê-lo directamente junto do médico/investigador, uma vez que o conhecimento destes dados está limitado a estas pessoas.

Interconexões de tratamentos: Não há.

Transferências de dados para países terceiros: Não há

Dos termos e condições fixados na Deliberação n.º227/2007 e na presente Autorização decorrem obrigações que o responsável deve cumprir. Deve, igualmente, dar conhecimento dessas condições a todos os intervenientes no circuito de informação.

Lisboa,

Ana Roque

Carlos Campos Lebo

Eduardo Campos

Helena Delgado António

Luis Barroso (Relator)

Vasco Almeida

Luis Lingnau da Silveira (Presidente)