

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Carolina Ribeiro Alves Silva

**RA-223 NO TRATAMENTO DO CARCINOMA  
DA PRÓSTATA METASTÁTICO**

**Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia  
Biomédica orientada pela Professora Doutora Ana Salomé dos  
Santos Pires Lourenço e pela Professora Doutora Maria Filomena  
Rabaça Roque Botelho e apresentada à Faculdade de Ciências e  
Tecnologia da Universidade de Coimbra**

Outubro de 2021



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

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



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

**Marie Curie**



# Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, diretora do Instituto de Biofísica e orientadora desta dissertação, por me ter acolhido na sua equipa e por estar sempre disponível para esclarecer qualquer dúvida. Agradeço por todas as críticas e conselhos na revisão do manuscrito e por ser um exemplo no rigor, empenho e dedicação.

À Professora Doutora Ana Salomé Pires, orientadora desta dissertação, pela disponibilidade, simpatia, apoio e motivação. Agradeço toda a ajuda que me deu na compreensão dos resultados, pela entrega na correção da dissertação, mesmo quando o tempo era escasso, e pela disponibilidade constante para esclarecer qualquer dúvida que pudesse surgir. Agradeço também todos os ensinamentos e conhecimentos que me transmitiu, que foram e serão valiosos.

À Mestre Inês Marques, por ter sido o “farol” desta dissertação e por me ter orientado em todas as fases. Agradeço toda a ajuda que me deu na minha integração no laboratório, no conhecimento das regras e boas práticas e na compreensão das técnicas e protocolos. Por todo o incentivo e amizade nas horas de maiores dificuldades, pela disponibilidade em esclarecer todas as minhas dúvidas e pela partilha de conhecimentos. Agradeço também todas as críticas construtivas na revisão do manuscrito, a ajuda na análise estatística e as sugestões derivadas da experiência científica que enriqueceram esta dissertação. Sem dúvida que guardarei para sempre os seus conselhos e ensinamentos e nunca esquecerei o apoio incondicional e a dedicação a esta dissertação.

À Doutora Mafalda Laranjo, pela disponibilidade constante, pela partilha de conhecimentos e pela ajuda no laboratório e nas experiências de microscopia.

À Professora Doutora Ana Margarida Abrantes, por ser um exemplo de dedicação e empenho, pela simpatia e disponibilidade demonstrada.

Ao Mestre Ricardo Teixeira, por toda a ajuda no laboratório, pelas palavras amigas e pela partilha de conhecimentos.

Ao Serviço de Medicina Nuclear do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, dirigido pela Dra. Gracinda Costa, e ao Instituto de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina de Lisboa, dirigido pela Dra. Guilhermina Cantinho, pela doação do radiofármaco dicloreto de rádio.

Ao Mestre Paulo Teixeira, pela ajuda na imunocitoquímica e na obtenção das imagens morfológicas.

À Ana, Lúcia Fernandes, Lúcia Monteiro, Gabriela e Beatriz, pela ajuda na realização de algumas técnicas, por tornarem o dia a dia mais descontraído, pelo apoio demonstrado, companheirismo e por todas as conversas e momentos de descontração.

A todos os professores que fizeram parte do meu percurso escolar e académico e me influenciaram positivamente na forma de pensar e de ser. Gostaria de destacar a minha professora primária Joana Paulino, os professores Filipe Xavier e Amélia Mendes e os Professores Universitários João Carvalho, Manuel Fiolhais, João Gil, Manuela Grazina e Isabel Lopes.

À Inês Gomes, que me acompanha desde o 1º ano do Mestrado Integrado, por fazer parte de todos os momentos e ser o meu braço direito neste percurso. Agradeço toda a ajuda e apoio incondicional que me deu, não só nas horas passadas no laboratório, mas também na escrita da dissertação. Sem dúvida que é das minhas maiores referências pela amizade, dedicação, companheirismo e pelo coração genuíno. Obrigada pelas palavras amigas, pelos conselhos nas horas difíceis e por me ajudares a ultrapassar todos os obstáculos. Estou grata por partilhares comigo mais uma etapa da nossa caminhada, com a certeza de que estarás presente nas próximas.

Aos meus colegas de trabalho, Ana, Bernardo, Diogo, Gonçalo, Nuno e Ritinha, por me terem acompanhado e apoiado na última fase de escrita da dissertação. Por me ensinarem todos os dias a importância do rigor, do trabalho em equipa e da organização. Obrigada pelas palavras encorajadoras e amizade.

Aos animadores do Projeto Tau, por me ajudarem a respirar e a descontrair nos momentos de maior stress, por me mostrarem que estou à altura dos desafios que me colocam e por me acompanharem no essencial da vida. Em vocês, encontro mais

energia para dar e para ser. Ao João e à Helena, por me darem força e alegria no caminho e me encorajarem a ser todos os dias melhor.

À Joana Santos, à Joana Padrão e à Filipa Páscoa por me acompanharem em todo o meu percurso académico e por poder partilhar convosco momentos inesquecíveis, preocupações e conquistas. Ao Manuel e ao Miguel, pela amizade, conselhos e pelos momentos divertidos que me proporcionaram ao longo destes anos. Às minhas afilhadas Joana Gamboias e Joana Henriques, por confiarem em mim, pelos ensinamentos partilhados e momentos que não irei esquecer. À Sara, minha amiga de longa data, por acreditar em mim, mesmo estando ausente. Ao António José, por partilhar comigo o meu percurso e ter sempre uma palavra amiga para dar. Ao Afonso, por ser o meu guia no percurso académico, por me fazer ver diferentes perspetivas e por estar sempre disponível para me ajudar. Acima de tudo, por ser a prova que a amizade pode ultrapassar todos os obstáculos. Obrigada por acreditares sempre em mim.

Ao André, por todo o amor, carinho e incentivo que me deu ao longo desta etapa. Foste o pilar que me suportou nos maus momentos e a primeira pessoa a quem eu contava os bons momentos. Obrigada por seres parte essencial do meu percurso, pela compreensão quando eu estava mais ausente e por me apoiares incondicionalmente nas minhas escolhas. Sem dúvida que a escrita desta dissertação não era possível sem a tua força, que era muitas vezes a minha força. Obrigada!

Gostaria de fazer um agradecimento especial aos meus pais, Sandra e Pedro, que são a minha pedra angular. Sem vocês nada disto seria possível, portanto, a vocês, agradeço toda a educação e valores, todo o apoio que me deram desde a escolha do curso, a ajuda nos momentos menos bons e por serem, para mim, um exemplo de determinação e garra. Ao meu pai, pela boa disposição, pela paciência nas remarcações de jantares, por me apoiar em todo o meu percurso e por estar sempre disponível para dar uma palavra de amor ou um conselho. À minha mãe, quero agradecer também toda a ajuda logística que me deu na fase final da escrita da dissertação, onde o tempo era escasso. Acima de tudo, por ser a minha companheira e melhor amiga, confiar em mim e partilharmos momentos que nunca esquecerei. Um eterno obrigado por tudo!

Por último, gostaria de agradecer e dedicar esta dissertação aos meus avós Maria do Carmo e Fernando. Não há palavras suficientes para agradecer tudo o que fizeram

e fazem por mim. Eles são o motor que possibilitaram todo o meu percurso acadêmico e quem me incentivou mais para concluir esta etapa. Acima de tudo, agradeço por poder ser o seu maior orgulho. Um bem-haja!

# Resumo

O cancro da próstata (CaP) é a segunda neoplasia masculina mais comum em todo o mundo, sendo que em 2020 foram diagnosticados 1 414 259 casos de CaP. A terapia de privação de androgénios é o tratamento de primeira linha para o CaP avançado, no entanto, a regressão do tumor após a castração é, frequentemente, apenas temporária e o tumor reincide e progride para a resistência à castração. Neste estágio do CaP, é muito comum o aparecimento de metástases, sendo que as metástases ósseas são as mais frequentes. Este tipo de metástases ocorre em mais de 90% dos doentes e provoca sintomas como fraturas, anemia e perda de peso, os quais levam à diminuição da qualidade de vida do doente. Este estado avançado da doença não tem cura, mas o rádio-223 revela-se uma opção terapêutica que melhora a sobrevivência global e diminui a dor associada a alguns efeitos secundários. Sabe-se que este radioisótopo, emissor predominante de partículas  $\alpha$ , infiltra-se no tecido ósseo e vai ser incorporado pelos osteoblastos, contudo, os mecanismos subjacentes aos seus efeitos no nicho metastático ainda não estão completamente compreendidos.

O objetivo principal deste projeto é, então, o estudo dos efeitos do rádio-223 em modelos celulares tridimensionais e homotípicos de CaP. Para o atingir, este trabalho iniciou-se com a otimização e caracterização de modelos celulares tridimensionais homotípicos de CaP. Seguiu-se a translação e validação do modelo de irradiação com rádio-223 para os modelos 3D para, por fim, permitir a avaliação dos efeitos radiobiológicos do rádio-223 nos modelos tridimensionais, utilizando diversas técnicas de biologia celular e molecular.

Para tal, foram utilizadas duas linhas celulares de CaP (PC3 e LNCaP) e foi desenvolvido um modelo 3D de esferoides, recorrendo à junção dos métodos *hanging drop* e *magnetic levitation*. A validação do método de irradiação e de cálculo de dose do rádio-223 para os modelos 3D foi realizada através da avaliação dos efeitos biológicos em termos de conteúdo proteico e de atividade metabólica celular, após irradiação dos esferoides e utilizando duas abordagens experimentais diferentes para obter a mesma dose de irradiação. Após validação, os efeitos do rádio-223 nos esferoides foram estudados após irradiação com doses até 40 mGy, avaliando-se para a dose mais elevada os efeitos na proliferação, sobrevivência e viabilidade celulares.

Através da metodologia desenvolvida, foi possível criar, de uma forma eficaz, esferoides de células PC3 reprodutíveis e compactos, capazes de manter a sua estrutura ao longo de 10 dias. Os esferoides constituídos por células LNCaP

aumentaram a sua compactação ao longo dos dias, mas apresentaram forma e área muito distintas entre si, pelo que não foram utilizados para os estudos de radiobiologia. A equação do cálculo de dose do rádio-223 foi validada para a irradiação de modelos celulares 3D, não se verificando diferenças significativas entre os efeitos biológicos observados com as duas abordagens usadas. A avaliação da atividade metabólica celular, após irradiação dos esferoides com doses até 40 mGy, permitiu aferir indiretamente que o aumento da dose não levava a uma diminuição acentuada da proliferação. Contudo, através do ensaio com marcação por Ki-67, verificou-se uma diminuição da proliferação celular para uma dose de 40 mGy. Este efeito é confirmado pela progressiva desintegração do esferoide ao longo do tempo e pelo aumento de eventos como apoptose e necrose. O ensaio clonogénico mostrou, ainda, uma perda total da capacidade clonogénica das células quando sujeitas a uma dose de 40 mGy, indicando a perda de capacidade de sobrevivência a longo prazo após irradiação com rádio-223.

Desta forma, os resultados obtidos confirmam que o rádio-223 provoca um efeito citotóxico, diminuindo o tamanho dos esferoides, a proliferação, a capacidade clonogénica e aumentando os eventos relacionados com morte celular. Estes efeitos foram verificados em modelos celulares 3D, estruturas moleculares mais complexas e mais próximas do microambiente tumoral, sustentando assim a sua utilização para futuros estudos do mecanismo molecular do rádio nas metástases do CaP. Este conhecimento permitirá aprofundar as potencialidades do rádio-223 e maximizar a sua aplicabilidade, tendo em vista o aumento da sobrevivência global e a melhoria da qualidade de vida do doente com CaP.

# Abstract

Prostate cancer is the second most common neoplasm in the world in men, with 1 414 259 reported cases in 2020. The first-line treatment for advanced-stage prostate cancer is androgen deprivation therapy, but the tumor regression after castration is temporary in most cases, with a consequent and progressive castration-resistant relapsing. In this growth stage, the formation of metastases is very common, with bone metastases being the most frequent conditions, present in more than 90% of the patients. They cause other conditions like bone fractures, anemia, and weight loss, ultimately leading to a decrease in the patient's quality of life. There is no cure for prostate cancer in this advanced-stage, but radium-223 presents a viable therapeutic option, both improving the overall survival rate and the pain associated with some side effects of the disease. This radioactive isotope emits predominantly  $\alpha$ -particles, penetrating the bone tissue incorporated by the osteoblasts. However, the effects of these mechanisms in the metastatic environment are not fully understood.

The main goal of this project is to study the effects of radium-223 in homotypic three-dimensional cellular models of prostate cancer. To assess such effects, the optimization and characterization of the homotypic three-dimensional cellular models were first performed. Then, the adaptation and validation of the irradiation model with radium-223 into the 3D models were done, allowing the evaluation using several cellular and molecular biological techniques of the radiobiological effects of the isotope in such models.

To achieve this, two cell lines of prostate cancer (PC3 and LNCaP) were used, and a 3D spherical model was developed, adopting the hanging drop and magnetic levitation methods. The validation of the irradiation method and the calculation of the dose of radium-223 for the 3D models were performed by evaluating the biological effects in the protein content and cell metabolic activity, after irradiating the spheroids through two different experimental approaches, in order to obtain the same irradiation dose. After the validation, the effects of radium-223 in the spheroids were studied after irradiation with doses up to 40 mGy, evaluating, for the highest dose, the cellular effects on proliferation, survival and viability.

Using this methodology, it was possible to effectively create reproducible and compact spheroids of PC3 cells, capable of maintaining their structure for 10 days. The spheroids of LNCaP increased their compactness through the days, but were not used

in the radiobiological studies, as they manifested very distinct sizes and areas. The equation for the calculation of the dose for radium-223 was validated for the irradiation of the 3D cellular models, since no significant differences were observed between the two experimental approaches used. The evaluation of the cell metabolic activity, after irradiating the spheroids with doses up to 40 mGy, allowed to conclude that the increase of the radium-223 dose does not alter cell proliferation. However, it was observed a decrease in Ki-67 expression for a dose of 40 mGy. This effect is confirmed by the progressive disintegration of the spheroid overtime, and by the increase of events like apoptosis and necrosis. Moreover, the clonogenic assay showed a total loss of the clonogenic capacity of the cells irradiated with a 40 mGy dose, indicating a loss of the long-term survival capability after the radium-223 irradiation.

In conclusion, the results confirmed that radium-223 has a cytotoxic effect on the spheroids, decreasing the size, proliferation, and clonogenic capacity of the spheroids, and increasing the effects related to cellular death. These effects were observed in 3D cellular models, which are complex molecular structures similar to the tumor microenvironment, therefore supporting future studies of the molecular mechanism of radium-223 against prostate cancer metastases. This knowledge will allow deepening the potentialities of radium-223 and maximizing its use with the goal of increase the global survival and enhance the quality of life of prostate cancer patients.

# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>I</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>V</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VII</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>XI</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>XV</b>
<b>Lista de Equações</b> .....	<b>XV</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Símbolos</b> .....	<b>XVII</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1. Radiação Ionizante .....	4
1.1.1. O elemento Rádio.....	4
1.1.2. Rádio-223.....	6
1.1.3. Efeitos físicos e biológicos da radiação ionizante .....	7
1.1.4. Lei de <i>Bergonie</i> e <i>Tribondeau</i> , 5Rs da Radiobiologia e resposta celular..	10
1.2. Cancro da próstata .....	14
1.2.1. A Próstata .....	14
1.2.2. Epidemiologia .....	15
1.2.3. Diagnóstico .....	18
1.2.4. Estadiamento.....	19
1.2.5. Transformação maligna da próstata .....	21
1.2.6. Terapêutica.....	25
1.3. Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático resistente à castração .....	28
1.4. Modelos celulares tridimensionais (3D) .....	32
1.4.1. Evolução dos modelos celulares.....	32
1.4.2. Microambiente tumoral e culturas celulares 3D.....	33
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>37</b>
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	<b>41</b>
3.1. Cultura celular.....	43
3.2. Estabelecimento das culturas celulares 3D .....	45

3.3. Determinação da área dos esferoides .....	50
3.4. Validação do cálculo de dose e irradiação das células com Rádio-223.....	50
3.5. Análise do conteúdo proteico pelo ensaio de SRB.....	54
3.6. Análise da atividade metabólica pelo ensaio XTT.....	54
3.7. Estudos de morfologia pelo método de coloração May-Grünwald-Giemsa .....	56
3.8. Ensaio clonogénico .....	57
3.9. Estudos de expressão de Ki-67 por imunocitoquímica.....	58
3.10. Caracterização da estrutura e viabilidade dos esferoides por microscopia de fluorescência.....	59
3.11. Análise estatística .....	60
<b>4. Resultados.....</b>	<b>63</b>
4.1. Desenvolvimento e Caracterização dos esferoides .....	65
4.2. Validação do modelo de irradiação para culturas celulares 3D .....	68
4.3. Efeitos radiobiológicos do Rádio-223 em esferoides PC3 .....	71
4.3.1. Estrutura do esferoide .....	72
4.3.2. Proliferação celular .....	74
4.3.3. Morfologia celular .....	76
4.3.4. Sobrevivência celular .....	78
4.3.5. Viabilidade e morte celular .....	79
<b>5. Discussão .....</b>	<b>81</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>93</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>97</b>
Anexo I.....	115

# Lista de Figuras

Figura 1: Propriedades do elemento rádio. [Adaptado de (Hanusa, 2019)].....	5
Figura 2: Mulheres a pintar relógios com rádio em 1932 na fábrica de Ingersoll. (Aron, 2017).....	5
Figura 3: Representação esquemática da cadeia de decaimento do rádio-223. Ao lado das setas está representado o tipo de decaimento e a energia de cada partícula $\alpha$ entre parênteses. ....	7
Figura 4: As partículas $\alpha$ têm uma grande ionização específica e um percurso relativamente linear à medida que interagem com a matéria. [Adaptado de (Kelsey <i>et al.</i> , 2014)].....	8
Figura 5: Localização das 4 zonas da próstata (zona central, zona fibromuscular, zona de transição e zona periférica), das vesículas seminais, do ducto ejaculatório, da uretra e da bexiga. É ainda apresentada histologia representativa do tecido normal da próstata (esquerda), e do tecido de cancro da próstata (direita), que mostra rutura da organização epitelial. [Adaptado de (Bonollo <i>et al.</i> , 2020)].....	15
Figura 6: Número de novos casos masculinos de cancro em 2020 (todas as idades). [Adaptado de (Ferlay <i>et al.</i> , 2020)].....	16
Figura 7: Ilustração do sistema de classificação de <i>Gleason</i> , desde o grau 1 (menos agressivo) até ao grau 5 (mais agressivo). (Prostate Cancer Foundation of Australia, 2020).....	20
Figura 8: Transformação maligna da próstata, seguindo um processo de várias etapas, começando com PIN, podendo progredir até ao CaP metastático. [Adaptado de (Wang <i>et al.</i> , 2018)].....	21
Figura 9: Representação esquemática da formação da metástase óssea. Um subgrupo de células malignas do tumor primário adquire a capacidade de migrar (1), entrar na corrente sanguínea (2), sobreviver à vigilância do sistema imunitário e sair da corrente sanguínea (3) e finalmente espalhar-se colonizando um local distante do corpo (4). [Adaptado de (Guerrieri <i>et al.</i> , 2020)].....	24
Figura 10: Mecanismo de ação do rádio-223. O rádio-223 substitui o cálcio em complexos de hidroxiapatite no osso. A radiação $\alpha$ conduz a citotoxicidade através da indução de quebras na dupla cadeia de ADN em células tumorais adjacentes, osteoblastos e osteoclastos, levando à inibição de crescimento tumoral e a uma estabilização da estrutura normal. [Adaptado de (Morris <i>et al.</i> , 2019)] .....	31
Figura 11: Principais diferenças entre culturas celulares 2D e culturas celulares 3D no microambiente tumoral. [Adaptado de (Fontana <i>et al.</i> , 2020)] .....	35

Figura 12: Células PC3 (à esquerda) e células LNCaP (à direita) com ampliação 100X num microscópio ótico invertido (Motic AE31).....	44
Figura 13: Gotas de PBS formadas na tampa de uma placa de 24 poços de baixa aderência. ....	47
Figura 14: Placa de 24 poços de baixa aderência invertida, com gotas da suspensão celular formadas no fundo da placa.....	47
Figura 15: Esferoides visíveis macroscopicamente. ....	48
Figura 16: Placa magnética de concentração.....	48
Figura 17: <i>MagPen</i> .....	49
Figura 18: Esquema de todo o procedimento realizado para a formação dos esferoides, recorrendo a uma junção dos métodos <i>Hanging Drop</i> e <i>Magnetic Levitation</i> .....	49
Figura 19: Linha temporal do processo de formação dos esferoides, respetiva irradiação e realização dos ensaios. No dia -1, o processo iniciou-se com a formação das gotas de células em <i>hanging drop</i> , no dia 0 verificou-se a formação dos esferoides, no dia 1 foi adicionado o meio de cultura e no dia 2 procedeu-se à irradiação dos esferoides, mantendo-os em cultura durante 8 dias. No dia 10, foram realizados os ensaios para avaliar os efeitos radiobiológicos do rádio-223. ....	53
Figura 20: Reação do XTT com o PMS (ITW Reagents, 2021).....	55
Figura 21: Linha do tempo desde a formação da gota em <i>hanging drop</i> até à realização do ensaio clonogénico. No dia -1, o processo iniciou-se com a formação das gotas de células em <i>hanging drop</i> , no dia 0 verificou-se a formação dos esferoides, no dia 1 foi adicionado o meio de cultura e no dia 2 procedeu-se à irradiação dos esferoides, mantendo-os depois em cultura durante 8 dias. No dia 10, as células provenientes destes esferoides foram semeadas para a realização do ensaio clonogénico, o qual terminou no para dia 22.....	57
Figura 22: Imagens representativas da evolução dos esferoides de células PC3, em termos de forma e tamanho, durante 9 dias. As imagens foram obtidas recorrendo a um microscópio invertido com uma ampliação de 40X, com apresentação da escala correspondente a 1 mm. ....	66
Figura 23: Curva de evolução da área dos esferoides de células PC3 ao longo do tempo. À esquerda estão representadas as curvas da área de cada esferoide e à direita está representada a curva com a média dos 3 esferoides. Os resultados são expressos pela média e desvio-padrão (DP), com n=3. ANOVA de 1 fator (**** p<0,0001).....	66
Figura 24: Imagens representativas da <i>evolução</i> dos esferoides de células LNCaP, em termos de forma e tamanho, durante 9 dias. As imagens foram <i>obtidas</i> recorrendo a um microscópio invertido com uma ampliação de 40X, com apresentação da escala correspondente a 1 mm. ....	67

Figura 25: Curva de evolução dos esferoides de células LNCaP ao longo do tempo, tendo em conta as suas áreas. À esquerda estão representadas as curvas da área de cada esferoide e à direita está representada a curva com a média dos 3 esferoides. Os resultados são expressos pela média e desvio-padrão (DP), com n=3. ANOVA de 1 fator.....68

Figura 26: Avaliação do conteúdo proteico celular pelo ensaio SRB nas culturas bidimensionais, realizado 8 dias após a irradiação com 0, 4, 10 e 20 mGy de rádio-223, seguindo duas abordagens: a preto, t=8 min (fixando o t em 8 minutos e fazendo variar a A<sub>0</sub> para obter a respetiva dose) e a cinzento, A<sub>0</sub>=0,8 µCi (fixando a A<sub>0</sub> em 0,8 µCi e fazendo variar o t para obter a respetiva dose). Os resultados estão normalizados ao controlo, expressos como média e erro-padrão (EP) de, pelo menos, 10 experiências independentes realizadas em *triplicado*, ANOVA de dois fatores (\*\*\*\* p<0,0001; \*\* p<0,01; \*\*\*\* p<0,0001; \*\* p<0,01)..... 69

Figura 27: Avaliação da atividade metabólica celular pelo ensaio XTT nos esferoides, realizado 8 dias após a irradiação com rádio-223 com doses de 0, 4, 10 e 20 mGy, seguindo as duas abordagens: a preto, t=8 min (fixando o tempo em 8 minutos e fazendo variar a atividade inicial para obter a respetiva dose) e a cinzento, A<sub>0</sub>=0,8 µCi (fixando a atividade inicial em 0,8 µCi e fazendo variar o tempo para obter a respetiva dose). Os resultados estão normalizados ao controlo, expressos como média e desvio-padrão (DP) e com pelo menos 3 experiências independentes *realizadas em duplicado*. ANOVA de dois fatores (\*\*\*\* p<0,0001; \*\*\* p<0,001)..... 71

Figura 28: Imagens representativas da forma e crescimento dos esferoides de células PC3 após irradiação com 40 mGy de rádio-223. As imagens foram obtidas imediatamente após a irradiação (dia 2) e ao longo dos dias 3, 4, 5, 6 e 9, depois da irradiação. As imagens foram recolhidas recorrendo a um microscópio invertido com uma ampliação de 40X, com apresentação da escala correspondente a 1 mm..... 72

Figura 29: Curva de evolução da área dos esferoides de células PC3, durante 7 dias após irradiação com 40 mGy de rádio-223. Os resultados são expressos pela média e desvio-padrão (DP), com n=3. ANOVA de 1 fator (\*\*\*\* p<0,0001; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01). . 73

Figura 30: Curvas de evolução da área dos esferoides de células PC3, durante 7 dias após irradiação: controlo e irradiados com 40 mGy de rádio-223. Os resultados são expressos pela média e desvio-padrão (DP), com n=3. O dia 0 representa o dia da formação do esferoide. ANOVA de 1 fator (\*\*\*\* p<0,0001)..... 74

Figura 31: Avaliação da atividade metabólica celular pelo ensaio XTT em esferoides de células PC3, realizado 8 dias após a irradiação com rádio-223, com doses de 0, 10, 20, 30 e 40 mGy. Os resultados estão normalizados ao controlo, expressos como média e erro-padrão (EP), com pelo menos 4 experiências independentes *realizadas em quadruplicado*. ANOVA de 2 fatores (\*\* p<0,01)..... 75

Figura 32: Imunohistoquímica em esferoides, com marcação com Ki-67. A imagem a) corresponde à marcação no esferoide controlo e a imagem b) à marcação no esferoide

irradiado com uma dose de 40 mGy de rádio-223. A coloração a azul é hematoxilina para visualização do núcleo e a coloração a castanho é o marcador. As imagens foram recolhidas recorrendo a um microscópio ótico com ampliação 20X e 100X. .... 76

Figura 33: Imagens representativas de características morfológicas das células de esferoides PC3, com coloração por *May-Grünwald-Giemsa*. O conjunto de imagens a) corresponde a células de esferoides controlo não irradiados e o conjunto de imagens b) corresponde a células de esferoides após a irradiação com 40 mGy de rádio-223. As setas indicam evidências morfológicas compatíveis com a morte celular do tipo apoptose e necrose. A seta azul corresponde a fragmentação do núcleo, a seta verde corresponde a vacuolização citoplasmática, a seta vermelha a *blebbing*, a seta preta a células multinucleadas e a célula amarela a extravasamento do citoplasma. As imagens foram obtidas recorrendo a um microscópio ótico com uma ampliação de 400X. .... 77

Figura 34: Imagem representativa de uma placa onde foi realizado ensaio clonogénico. Os 3 poços de cima correspondem ao controlo e os 3 poços de baixo correspondem aos poços de células irradiadas com 40 mGy de rádio-223..... 79

Figura 35: Imagens representativas de esferoides de células PC3, marcados com Anexina V, Iodeto de Propídio e DAPI. As imagens representam uma fusão das duas técnicas e foram obtidas com recurso a um microscópio de fluorescência com ampliação 100X. A coloração azul representa a marcação com DAPI e a coloração verde representa a marcação com Anexina V. Não se obteve qualquer marcação com Iodeto de Propídio.....80

# Lista de Tabelas

Tabela 1: Atividade inicial e tempo de irradiação para irradiar um volume de 500 $\mu\text{L}$ de meio de suspensão celular, para as respectivas doses, segundo as duas abordagens utilizadas: na 1ª abordagem é fixado o $t$ em 8 min e na 2ª abordagem é fixada a $A_0$ em 0,8 $\mu\text{Ci}$ . .....	52
Tabela 2: Atividade inicial e tempo de irradiação para irradiar um volume de 500 $\mu\text{L}$ de meio com células em esferoides, para as respectivas doses.....	53
Tabela 3: Anticorpo usado na imunocitoquímica e respectivas características (clone, tempo de incubação, diluição e fornecedor). .....	59

# Lista de Equações

Equação 1: Cálculo da concentração de células através do método de exclusão de azul de tripano. ....	45
Equação 2: Equação do cálculo de dose do rádio-223.....	50
Equação 3: Cálculo da eficiência da placa. ....	58
Equação 4: Cálculo do fator de sobrevivência. ....	58



# Lista de Abreviaturas e Símbolos

$^{18}\text{F}$ -FCH: Fluorocolina marcada com flúor-18

$^{18}\text{F}$ -FDG: Fluorodesoxiglucose marcada com flúor-18

$^{207}\text{Pb}$ : Chumbo-207

$^{211}\text{Bi}$ : Bismuto-211

$^{211}\text{Pb}$ : Chumbo-211

$^{216}\text{Po}$ : Polónio-206

$^{219}\text{Rn}$ : Radónio-219

$^{223}\text{Ra}$ : Rádio-223

2D: 2 dimensões

3D: 3 dimensões

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

$A_0$ : Atividade inicial

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADT: *Androgen Deprivation Therapy*

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

ALSYMPCA: *Alpharadin in Symptomatic Prostate Cancer*

Anexina V: AnV

ARN: Ácido ribonucleico

ATCC: *American Type Culture Collection*

Bq: *Becquerel*

BRCA2: *Breast cancer 2, early onset*

CaP: Carcinoma da Próstata

$\text{CO}_2$ : Dióxido de carbono

CRPC: *Castration-resistant prostate cancer*

D: Dose absorvida

DAPI: *4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride*

EMA: *European Medicines Agency*

EP: Eficiência da placa

EUA: Estados Unidos da América

FDA: *Food and Drug Administration*

FS: Fator de sobrevivência

Gy: *Gray*

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogénio

HIFU: *High intensity focused ultrasound*

ICC: Imunocitoquímica

IDH: Índice de Desenvolvimento Humano

IP: Iodeto de Propídio

keV: *elétron-volt*

LET: *Linear Energy Transfer*

LH: *Luteinizing hormone*

LHRH: *Luteinizing hormone–releasing hormone*

mCRPC: *Metastatic castration-resistant prostate cancer*

MEC: Matriz extracelular

NADH: Dinucleótido de nicotinamida e adenina

O<sub>2</sub>: Oxigénio

OER: *Oxygen enhancement ratio*

OH•: Hidroxilo

PBS: *Phosphate buffered saline*

PET: *Positron emission tomography*

PIN: *Prostatic intraepithelial neoplasia*

PMS: *N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate - Phenazine methosulfate*

PS: *Phosphatidylserine*

PSA: *Prostate-specific antigen*

RA: Recetor de androgénio

ROS: *Reactive oxygen species*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SRB: Sulforodamina B

t: Tempo

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

TNM: *Tumour-Node-Metastasis*

XTT: 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide

ZnS: Sulfeto de zinco



# 1. Introdução



Em 1895, Conrad W. Röntgen descobriu os raios-X, seguindo-se a descoberta dos “raios urânicos” por Henri Becquerel, durante a sua pesquisa sobre a fosforescência dos sais de urânio (Becquerel, 1896; Roentgen, 1896).

Marie Sklodowska-Curie, interessada nos misteriosos “raios urânicos”, começou a trabalhar no laboratório de Pierre Curie em Paris, usando minério de urânio de pechblenda da mina de Joachimstal na Polónia. Ela tentou identificar as substâncias e minerais que emitiam radiação ionizante e notou que esta rocha emitia cerca de 2,5 vezes mais radiação do que o explicado pelo conteúdo de urânio. Depois da descoberta do polónio, observaram uma alta emissão de radiação noutra fração química que continha bário. Seguindo um procedimento de separação, obtiveram um sal cuja análise de espectroscopia de emissão revelou que as linhas observadas não correspondiam a nenhum elemento conhecido (Carvalho, 2011; Curie *et al.*, 1898; Fröman, 1996). Os Curie escreveram: “Há uma forte razão para acreditar que a substância obtida contém um novo elemento. Propomos nomeá-lo como Rádio” (Curie *et al.*, 1898, p. 1217), e escreveram ainda: “Esta nova substância radioativa, provavelmente, ainda contém uma grande quantidade de bário, mas a radioatividade do rádio parece enorme” (Curie *et al.*, 1898, p. 1217). Os “raios urânicos” passaram, então, a denominar-se “radioatividade”.

Após a descoberta do rádio, no ano de 1900, Henry Becquerel carregou um tubo com uma pequena quantidade deste elemento no seu colete durante 14 dias, desenvolvendo uma queimadura na pele. Pierre Curie decidiu, então, investigar o sucedido, colocando uma pequena fonte de rádio no seu braço durante 10 horas. À semelhança de Becquerel, Pierre Curie ficou também com uma queimadura localizada. Ernest Besnier observou a queimadura de Becquerel e notou que esta era semelhante a queimaduras provocadas por raios-X. Dr. Henri Danlos usou, então, o material radioativo para tratar lúpus e outras doenças dermatológicas (Carvalho, 2011; Danlos & Bloch, 1901).

No tratamento do cancro, o rádio foi usado pela primeira vez em braquiterapia. No início, era colocado diretamente na superfície do tumor ou intracavitariamente (no cancro da vagina ou do útero) e, na década de 1910, os médicos começaram a introduzir a fonte radioativa intersticialmente, ou seja, profundamente no tumor. Os cancros da mama, da próstata, do esófago e do cérebro foram os primeiros a ser tratados com esse método. Contudo, devido à falta de dosimetria adequada e à inevitabilidade do contato

direto com o material radioativo, o método era muito perigoso para os médicos e doentes que o utilizavam (Kułakowski, 2011).

Estas descobertas, feitas há mais de um século, são a base para as mais recentes investigações científicas. A descoberta do rádio por Marie Curie e Pierre Curie abriu uma nova era no tratamento do cancro e a possibilidade de salvar muitas vidas.

## 1.1. Radiação Ionizante

A radiação ionizante tem a capacidade de remover eletrões dos átomos, moléculas ou iões, ou seja, ionizá-los. A ionização pode-se dar a partir da interação da radiação eletromagnética com a matéria ou através de colisões entre partículas (Forshier, 2009).

A interação da radiação eletromagnética (por exemplo, os raios-X e os raios- $\gamma$ ) envolve a transmissão de energia. Quando um fóton incide em matéria, este transfere parte ou totalmente a sua energia para o alvo (átomo, molécula ou ião). Se a energia transferida for superior à energia de ligação do eletrão na orbital mais exterior do alvo (também conhecida como energia de ionização), este eletrão é ejetado com a diferença energética do processo. No entanto, se a energia transferida não for suficiente para ionizar o alvo, o eletrão passa para uma orbital mais externa e, posteriormente, volta à orbital original emitindo fótons. (Kelsey *et al.*, 2014; Podgorsak, 2005).

### 1.1.1. O elemento Rádio

O rádio (Ra) é um elemento químico radioativo e é o metal alcalino-terroso mais pesado do grupo 2 (IIa) da tabela periódica. Tal como se pode constatar na Figura 1, o seu número atómico é 88 e encontra-se no estado sólido à temperatura ambiente, tendo um aspeto macio, brilhante e com uma cor prateada. São conhecidos 34 isótopos do rádio e todos eles são radioativos (Emsley, 2012; Hanusa, 2019).

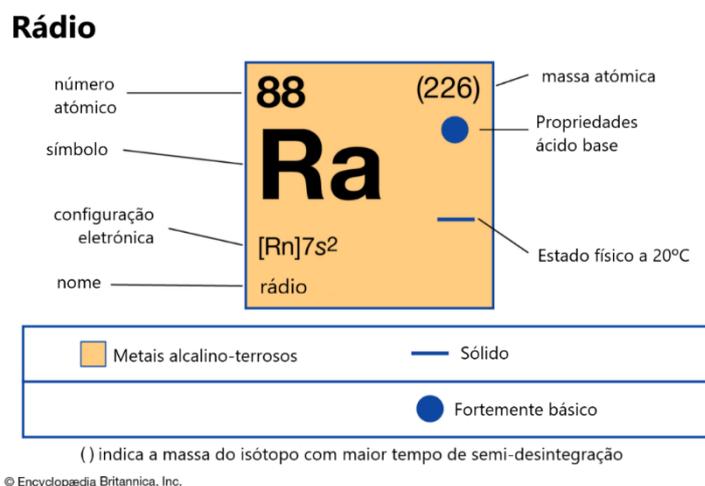


Figura 1: Propriedades do elemento rádio. [Adaptado de (Hanusa, 2019)]

Nas décadas de 1910 e 1920, uma “onda” de rádio invadiu os Estados Unidos e a Europa, sendo que o rádio foi adicionado a uma ampla variedade de produtos, incluindo pasta de dentes, cremes faciais e até comida (Gunderman & Gonda, 2015).

O rádio, que emite uma luz azul fraca, era também adicionado a tintas destinadas à pintura de relógios e de instrumentos de aeronaves. Para aumentar a sua luminescência, era adicionado sulfeto de zinco (ZnS) que atuava como cintilador, ou seja, um material que emite luz visível em resposta à radiação ionizante. Estas tintas eram consideradas “especiais” porque brilhavam no escuro, mas provocaram muitas mortes às pintoras dos mostradores de relógios (Figura 2). Estas pintoras desconheciam os perigos do rádio e lambiam frequentemente o pincel para este ficar com a ponta mais fina, ingerindo diretamente o rádio (Aron, 2017; Curtis, 1998; Gunderman & Gonda, 2015).



Figura 2: Mulheres a pintar relógios com rádio em 1932 na fábrica de Ingersoll. (Aron, 2017)

O rádio-226 é o isótopo de rádio mais abundante na natureza e o que tem um período de semi-desintegração físico ( $T_{1/2}$ ) mais longo, de 1600 anos (Emsley, 2012; Hanusa, 2019).

### 1.1.2. Rádio-223

O rádio-223 é um radioisótopo emissor predominantemente de partículas alfa ( $\alpha$ ), com um período de semi-desintegração físico de 11,4 dias. Cada decaimento de rádio-223 resulta na emissão de 4 partículas  $\alpha$  na cadeia de decaimento primária (Figura 3). As partículas  $\alpha$  são caracterizadas pela elevada transferência linear de energia (LET, do inglês *linear energy transfer*) - energia transferida por unidade de comprimento de percurso - na ordem dos 100 keV/mm em tecidos moles (Forshier, 2009). Devido à elevada LET, a distância de penetração no tecido é limitada, aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  (Dondossola *et al.*, 2019).

O rádio-223 pode ser produzido artificialmente em grandes quantidades com um custo reduzido. Este radioisótopo é gerado a partir do decaimento do tório-227 ( $T_{1/2}=18,7$  dias) que, por sua vez, é o produto do decaimento do actínio-227 ( $T_{1/2}= 21,7$  anos) (Leung *et al.*, 2020; Marques, 2016).

O decaimento do rádio-223 para chumbo-207 pode ser encontrado na Figura 3 e é acompanhado por uma série de emissões  $\alpha$ ,  $\beta$ , acompanhados ou não por emissão  $\gamma$ , com diferentes energias e probabilidades de emissão, distribuída pelas frações: 95,3% de partículas  $\alpha$ , 3,6% de partículas  $\beta$  e 1,1% de radiação  $\gamma$  (Marques, 2016; Yard *et al.*, 2019).

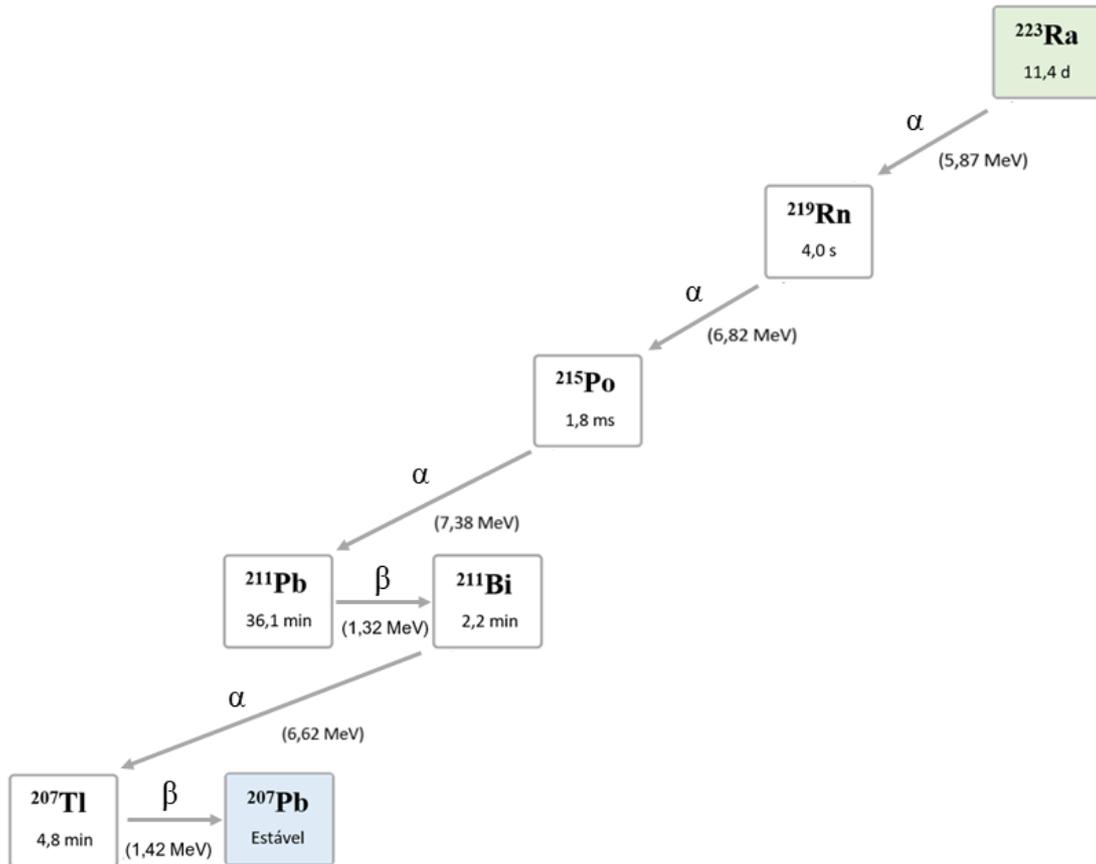


Figura 3: Representação esquemática da cadeia de decaimento do rádio-223. Ao lado das setas está representado o tipo de decaimento e a energia de cada partícula  $\alpha$  ou  $\beta$  entre parênteses.

### 1.1.3. Efeitos físicos e biológicos da radiação ionizante

A partícula  $\alpha$ , com uma carga positiva de +2, é composta por dois prótons e dois nêutrons. As partículas  $\alpha$  interagem com os elétrons para ionizar átomos ou moléculas ao longo do seu percurso. Como resultado dessas interações, a partícula  $\alpha$  perde uma grande quantidade de energia numa curta distância, o que limita a sua profundidade de penetração a apenas alguns centímetros no ar ou a menos de um milímetro na pele humana (Kelsey *et al.*, 2014).

Quando as células são expostas à radiação ionizante, os efeitos físicos entre a radiação e os átomos ou moléculas das células ocorrem em primeiro lugar, seguido do possível dano biológico às funções celulares (Hall, 1985; Kelsey *et al.*, 2014).

### Efeitos físicos

Os efeitos físicos incluem os processos de ionização e excitação que ocorrem nos átomos e moléculas do material atravessado. Ao longo do percurso das partículas, estas vão depositando energia e vão sofrendo interações electrostáticas com os eletrões dos átomos (Figura 4). Para partículas carregadas, a ionização específica é o número de pares de iões formados por unidade de comprimento de percurso. As partículas  $\alpha$  podem produzir vários milhares de pares de iões por milímetro (Hall, 1985; Kelsey *et al.*, 2014).

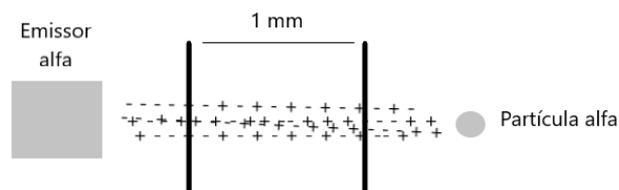


Figura 4: As partículas  $\alpha$  têm uma grande ionização específica e um percurso relativamente linear à medida que interagem com a matéria. [Adaptado de (Kelsey *et al.*, 2014)]

### Efeitos biológicos

Os efeitos biológicos da radiação resultam principalmente de lesões no ADN, que é o alvo mais crítico dentro da célula. No entanto existem, também, outros locais na célula que, quando danificados, podem conduzir à morte celular. Quando a radiação ionizante é absorvida no material biológico, o dano à célula pode ocorrer de duas formas: direta ou indireta (Podgorsak, 2005). Estes efeitos são denominados *target*, ou seja, no alvo.

Na ação direta, a radiação interage diretamente com o alvo crítico na célula, como por exemplo, moléculas de ADN. Os átomos do próprio alvo podem ser ionizados ou excitados através de interações de *Coulomb*, levando à cadeia de eventos físicos e químicos que eventualmente produz o dano biológico. Uma partícula  $\alpha$  incidente pode quebrar diretamente as ligações químicas numa molécula de ADN. A ação direta é

dominante na interação de partículas de alto LET, como as partículas  $\alpha$ , com o material biológico (Kelsey *et al.*, 2014; Podgorsak, 2005).

Na ação indireta, a radiação ionizante exerce o seu efeito através da ação de espécies radicalares produzidas, por exemplo, na sequência da radiólise da água. Esse processo deve-se à interação da radiação com as moléculas de água que são especialmente abundantes já que o corpo humano é constituído, aproximadamente, por 70% de água. As espécies radicalares produzidas, como por exemplo o radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), interagem com átomos e moléculas dentro das células, em particular o ADN, para produzir modificações químicas e danos moleculares. Das espécies radicalares, os radicais livres são átomos eletricamente neutros que contêm eletrões livres, ou seja, não ligados e que são altamente eletrofílicos e reativos (Beyzadeoglu *et al.*, 2010; Marques, 2016; Yard *et al.*, 2019).

### **Outros efeitos**

Existem outros efeitos da radiação, efeitos *non-targeted*, que são observados, também. Destes podemos referir o efeito *Bystander*, o efeito *Abscopal* e a instabilidade genómica (Elgazzar & Kazem, 2015; Marques, 2016; Schmid *et al.*, 2012).

O efeito *Bystander* refere-se à observação de que células fora do campo de radiação podem sofrer danos após células próximas no mesmo organismo serem expostas à radiação. As células não irradiadas podem demonstrar efeitos da radiação como resultado de sinais recebidos de células vizinhas. Desenvolvimentos recentes na análise de ADN permitiram a deteção de alterações na estrutura deste, resultantes de mutações, que são transmitidas às gerações futuras da linha celular (Brito & Etchebere, 2020; Kelsey *et al.*, 2014).

O efeito *Abscopal* promove morte celular distante, uma vez que a radiação ionizante e os seus produtos de decaimento estimulam reações inflamatórias e do sistema imunitário por meio de citocinas. Portanto, irá provocar efeitos distantes observados após a terapia localizada com recurso à radiação ionizante. Contudo, os mecanismos exatos deste efeito ainda precisam de ser elucidados (Brito & Etchebere, 2020; Schmid *et al.*, 2012).

A instabilidade genómica é definida como um aumento de alterações no genoma, manifestando-se como aberrações cromossómicas, formação de micronúcleos,

mutações genéticas e aneuploidia. A gravidade da instabilidade genómica é influenciada pela LET (Schmid *et al.*, 2012).

#### **1.1.4. Lei de *Bergonie e Tribondeau*, 5Rs da Radiobiologia e resposta celular**

A Lei de *Bergonie e Tribondeau*, postulada em 1906 (Forshier, 2009), afirma que:

- Células estaminais ou indiferenciadas são mais radiosensíveis do que células diferenciadas;
- Os tecidos e órgãos mais jovens são mais radiosensíveis do que os tecidos e órgãos mais velhos;
- Quanto mais alta a atividade metabólica da célula, maior a radiosensibilidade;
- Quanto maior a taxa de proliferação dos tecidos, maior a sua radiosensibilidade.

Em 1925, Ancel e Vitemberger introduziram o conceito de “período de latência”, sugerindo que a suscetibilidade das células às lesões induzidas pela radiação ionizante é a mesma, mas que o tempo de manifestação dos danos produzidos varia de acordo com o tipo de célula (Forshier, 2009). O período de latência, que é dependente da dose e da necessidade de divisão, pode variar entre minutos a anos. Por esse motivo, é difícil determinar se as alterações visíveis nas células, tecidos e órgãos são causadas por radiação ou por outras fontes (Bolus, 2001; Forshier, 2009).

A interação da radiação com as células está relacionada com acaso e probabilidade, isto é, a radiação pode ou não interagir e, se interagir, pode ou não haver lesão celular.

Certas propriedades de tecidos e células podem modificar significativamente os efeitos biológicos da radiação ionizante. Os 5Rs da radiobiologia descrevem como as células respondem à radiação ionizante, sendo estes a radiosensibilidade, a redistribuição no ciclo celular, a reparação das células, a reoxigenação e a repopulação.

##### **A. Radiossensibilidade**

Conforme definido anteriormente na *Lei de Bergonie e Tribondeau*, as células indiferenciadas são significativamente mais radiosensíveis do que as células diferenciadas. Assim, células indiferenciadas que se dividam muito rapidamente são

consideradas altamente radiosensíveis e incluem as espermatogónias, eritroblastos e as células das criptas intestinais. As células com radiosensibilidade intermédia incluem as células endoteliais, osteoblastos e fibroblastos. As células com baixa radiosensibilidade incluem células musculares, nervosas e condrócitos. Considerando os constituintes celulares, o núcleo é, em geral, relativamente mais radiosensível do que o citoplasma, sendo o ADN o componente celular mais radiosensível (Elgazzar & Kazem, 2015; Forshier, 2009).

## **B. Redistribuição no ciclo celular**

A redistribuição de células dentro do ciclo celular é determinante para a resposta das células à radiação, devido às variações na radiosensibilidade das células dependendo da fase do ciclo em que se encontram (Withers, 1975).

O ciclo de vida da célula inclui várias fases: a fase de crescimento (G1), a fase de síntese de ADN (S), a fase de preparação para a divisão (G2), a mitose (M) e a fase de não crescimento (G0), onde as células permanecem num estado quiescente. Todas as fases do ciclo celular podem ser afetadas pela radiação ionizante e a radiosensibilidade de uma determinada célula varia de uma fase do ciclo celular para outra (Elgazzar & Kazem, 2015).

Quando as células na fase G0/G1 do ciclo celular são expostas à radiação, apesar de, por vezes, poderem prosseguir para a fase S, estas tendem a interromper a sua progressão para a fase G2 (Deckbar *et al.*, 2011) A mitose é a fase mais radiosensível uma vez que os cromossomas estão condensados e emparelhados e, conseqüentemente, o ADN está mais concentrado numa pequena área. As células na fase S são as mais radorresistentes, porque os genes, enzimas e proteínas responsáveis pela reparação estão superexpressos, em comparação com as outras fases do ciclo celular. A irradiação durante a fase G2 retarda o início da divisão celular e a irradiação durante a mitose induz aberrações cromossómicas, ou seja, quebras, eliminações, translocações, entre outras. A sensibilidade de uma dada fase do ciclo celular também difere de um tipo de célula para outro (Bolus, 2001; Elgazzar & Kazem, 2015; Forshier, 2009; Hubenak *et al.*, 2014).

### **C. Reparação das células**

Algumas células têm uma maior capacidade do que outras para reparar os danos causados pela radiação ionizante. Por exemplo, as células que permanecem na fase de não crescimento (G0) exibem uma maior capacidade de reparar as lesões provocadas pela radiação. Consequentemente, os efeitos biológicos da mesma dose de radiação são diferentes (Elgazzar & Kazem, 2015; Yashar, 2018). Ao contrário das células normais, que têm preservada a capacidade de reparar os danos da radiação, as células neoplásicas frequentemente replicam-se em taxas anormalmente altas e a radiação interfere na sua capacidade mitótica ou proliferativa (Hornig & Greene, 2010).

Há ainda outro fator que influencia a reparação das células, a taxa de dose. Se a dose é administrada rapidamente, numa única exposição, a reparação dos danos da radiação são mais difíceis. Alternativamente, se a dose total for administrada muito lentamente a uma taxa de dose mais baixa, ou em frações, há mais tempo para reparar o dano por radiação (Pickrell, 2009).

### **D. Reoxigenação**

O oxigénio molecular tem a capacidade de potenciar a resposta à radiação. O efeito do oxigénio é descrito numericamente pela taxa de enriquecimento de oxigénio (OER) e é definida como a dose de radiação que produz uma determinada resposta biológica em condições anóxicas dividida pela dose de radiação que produz a mesma resposta biológica em condições aeróbias. É postulado que o oxigénio é necessário para que as espécies reativas de oxigénio se formem durante a radiólise da água. Sem o oxigénio, produz-se menos peróxido de hidrogénio e, portanto, o dano celular é mais reduzido (Elgazzar & Kazem, 2015; Forshier, 2009).

Os tumores apresentam uma grande multiplicação celular e um crescimento muito rápido. Como resultado, surgem regiões intratumorais pouco vascularizadas, que se traduzem em áreas de hipoxia. Como as células hipóxicas são muito menos sensíveis à radiação, as áreas de hipoxia no tumor são consideradas uma causa importante da falha das terapias com radiação ionizante. A hipoxia em tumores pode ser crónica ou aguda e as células tumorais radorresistentes requerem tratamentos que sejam eficazes contra cada um desses tipos de hipoxia. Os tumores que tenham grande heterogeneidade vascular apresentam uma maior agressividade, pelo facto de condicionarem a resposta às terapêuticas (Abrantes, 2013; Van Der Kogel, 2009).

## **E. Repopulação**

A repopulação baseia-se numa resposta de regeneração do tecido que parece ser iniciada pela exposição prolongada à radiação. Os complexos mecanismos biológicos incluem uma profunda reorganização da estrutura proliferativa, tanto ao nível da célula alvo quanto ao nível do tecido total. As células que se podem dividir continuamente, como células estaminais e células epiteliais intestinais, têm uma capacidade de repopular mais rapidamente (Dörr, 2015; Steel, 1989).

A repopulação nos tecidos tumorais é definida como a proliferação de células tumorais sobreviventes após morte celular induzida por radiação. Assim, a repopulação constitui um maior problema nos tumores, principalmente nos tumores de proliferação rápida.

A radioterapia é normalmente administrada em pequenas doses (entre 1,8 e 2 Gy), espaçadas por pelo menos 24h, para permitir a recuperação dos tecidos não tumorais e a repopulação das células sobreviventes. Contudo, à medida que as células são mortas devido a lesões por radiação, a repopulação de células tumorais sobreviventes também ocorre, aumentando a população destas células. A supressão efetiva da repopulação de células tumorais é, portanto, um fator importante para o sucesso da radioterapia (Kim & Tannock, 2005; Ng et al., 2013).

As células são geralmente consideradas “mortas” pela radiação se perderam a integridade reprodutiva, e não pelo facto de sobreviverem fisicamente na população (Hall, 1985).

## 1.2. Cancro da próstata

### 1.2.1. A Próstata

A próstata é um órgão músculo-glandular (Marques, 2016) e é também a maior glândula acessória do sistema genital masculino (Beyzadeoglu *et al.*, 2010). A sua principal função é segregar um fluido alcalino que ajuda na mobilidade e na nutrição dos espermatozoides (Dunn & Kazer, 2011; Marques, 2016).

Este órgão, em forma de pirâmide, está localizado na pélvis, envolve a uretra prostática e é composto por uma base, um ápice e superfícies anterior, posterior e inferior lateral. O ápice da próstata está em contacto com a uretra peniana e a base em contacto com a bexiga. A base encontra-se ligada ao colo da bexiga e a uretra sai do meio desta, perto da superfície anterior, que é estreita e convexa. As vesículas seminais estão localizadas bilateralmente na base da próstata (Dunn & Kazer, 2011; Ittmann, 2018; Shen & Abate-shen, 2010).

*John E. McNeal*, em 1988, propôs um modelo anatómico da próstata, onde esta é dividida em quatro regiões (Figura 5): a zona fibromuscular anterior (estroma), a zona central, a zona de transição e a zona periférica (Marques, 2016; Tavares, 2019).

A zona periférica constitui cerca de 70% do tecido da próstata normal e é o local de origem de 75-80% dos carcinomas da próstata (Beyzadeoglu *et al.*, 2010). A zona de transição está localizada perto da uretra prostática e é impercetível na maioria dos homens jovens, constituindo cerca de 5% da próstata. Na maioria dos homens mais velhos, a zona de transição está consideravelmente aumentada pela hiperplasia benigna da próstata, uma proliferação benigna extremamente comum do tecido da zona de transição. Os carcinomas prostáticos surgem, também, na zona de transição e há evidências consideráveis de que os carcinomas originados nesta zona são clínica e biologicamente diferentes dos da zona periférica. A zona central rodeia os canais ejaculatórios e é uma região em forma de cone, com a porção mais larga na base da próstata e o ápice no colículo seminal (Ittmann, 2018; Marques, 2016). Por último, a zona fibromuscular representa a parte não glandular da próstata, é formada essencialmente por tecido muscular e fibroso e forma toda a superfície anterior da próstata (Santo, 2017).

A nível histológico, a próstata tem um epitélio constituído por três tipos de células epiteliais diferenciadas: as células basais, as células secretoras e as células neuroendócrinas (Shen & Abate-shen, 2010).

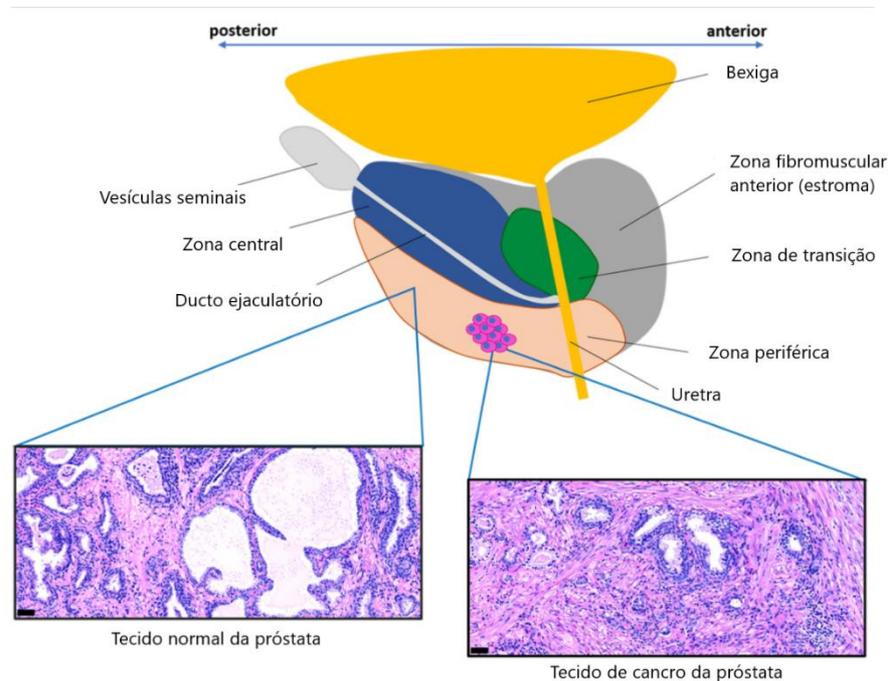


Figura 5: Localização das 4 zonas da próstata (zona central, zona fibromuscular, zona de transição e zona periférica), das vesículas seminais, do ducto ejaculatório, da uretra e da bexiga. É ainda apresentada histologia representativa do tecido normal da próstata (esquerda), e do tecido de cancro da próstata (direita), que mostra rutura da organização epitelial. [Adaptado de (Bonollo et al., 2020)]

### 1.2.2. Epidemiologia

O carcinoma da próstata (CaP) é a segunda neoplasia masculina mais comum em todo o mundo, compreendendo 14,1% de todos os diagnósticos de cancro masculino. O risco global cumulativo de CaP ao longo da vida entre os homens é de 3,86% (Ferlay *et al.*, 2020).

De acordo com os dados mais recentes do GLOBOCAN, apresentados na Figura 6, houve 1 414 259 casos de CaP em todo o mundo em 2020, o que equivale a uma taxa de incidência (número de novos casos que ocorrem numa população por ano) de

36/100 000 homens, e compreende 7,3% de todos os diagnósticos de cancro (Bray *et al.*, 2018; Ferlay *et al.*, 2020).

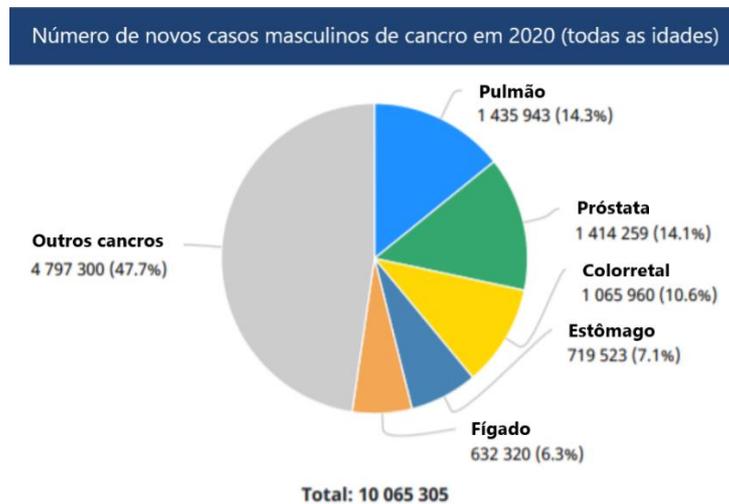


Figura 6: Número de novos casos masculinos de cancro em 2020 (todas as idades). [Adaptado de (Ferlay *et al.*, 2020)]

O CaP é significativamente mais comum em países com um Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) muito alto, como os EUA, Reino Unido e Japão, com um risco cumulativo de cancro ao longo da vida de 7,88%. Pelo contrário, em países com um IDH baixo e médio, o risco cumulativo é de apenas 3,29% e 0,94%, respetivamente (Ferlay *et al.*, 2020).

No total, morreram 375 304 homens em todo o mundo de CaP em 2020, compreendendo 3,8% de todas as mortes por cancro. Embora o diagnóstico de CaP próstata seja 3 vezes mais comum em países com alto IDH, a mortalidade por cancro nestes países é muito menor do que em países com baixo IDH. O risco cumulativo de morte por CaP em países com IDH muito alto é 0,75% enquanto que em países com IDH baixo é 1,74% (Ferlay *et al.*, 2020).

Em Portugal, em 2020, houve 6759 novos casos de CaP e 1917 mortes devidas a CaP. Estes dados representam mais de 6% das mortes por cancro, na população geral (Ferlay *et al.*, 2020).

## Fatores de risco

Os fatores de risco para o desenvolvimento de CaP incluem a idade avançada, etnia, fatores genéticos, história familiar e o estilo de vida. O aumento do consumo de gordura animal saturada e de carne vermelha, a menor ingestão de frutas, vegetais e vitaminas, a obesidade e a inatividade física, a inflamação, a hiperglicemia, infecções e exposição ambiental a produtos químicos ou radiação ionizante estão positivamente associados a um maior risco de desenvolvimento de CaP (Rawla, 2019).

Segundo o *National Cancer Institute*, observou-se que o risco de desenvolver CaP aumenta principalmente após os 50 anos de idade, em homens caucasianos sem história familiar de cancro da próstata, e após os 40 anos em homens de raça negra ou com história familiar de CaP (National Cancer Institute, 2017).

Em relação a fatores genéticos, segundo *Jacob Ramon e Louis J. Denis*, várias mutações hereditárias, mais notavelmente no gene *BRCA2*, foram associadas a um aumento do risco de CaP. Mutações no gene *BRCA2* levam a um aumento de 8,6 vezes do risco de CaP em homens com mais de 65 anos ou 2,64 vezes em todos os homens (Ramon & Denis, 2007).

A obesidade tem sido implicada na desregulação da insulina, na sinalização de citocinas inflamatórias e na indução de stresse oxidativo prejudicial ao ADN, aumentando o risco de várias neoplasias, incluindo os câncros da mama e da próstata (Pollak, 2012). Segundo um estudo desenvolvido por *Michael Porter e Janet Stanford*, homens obesos do grau I apresentam um aumento de 20% do risco de mortalidade por CaP, enquanto que os homens obesos de grau II apresentam um aumento de 34% (Porter & Stanford, 2005). A obesidade foi, também, associada a um maior risco de doença mais agressiva, falha no tratamento e aumento da mortalidade específica por cancro de próstata, juntamente com mortalidade por comorbidades associadas (Ramon & Denis, 2007).

A grande ingestão de gordura na dieta parece estar relacionada com um maior risco de desenvolvimento de CaP (Sonn *et al.*, 2005), enquanto que os fitoestrogénios, presentes numa dieta rica em soja, têm sido associados a uma diminuição deste risco. Assim, a baixa incidência nos países asiáticos pode ser parcialmente explicada pelos efeitos de uma dieta com baixo teor de gordura animal e rica em soja (Denis *et al.*, 1999; Magee & Rowland, 2004).

### 1.2.3. Diagnóstico

A abordagem para o diagnóstico do CaP mudou radicalmente nos últimos anos e, atualmente, a ênfase está no diagnóstico precoce. O diagnóstico do CaP numa fase inicial aumenta o número de opções terapêuticas disponíveis (Borley & Feneley, 2009; Ingle et al., 2013; Marques, 2016).

#### A. Toque retal

A maioria dos carcinomas da próstata localiza-se na zona periférica da glândula prostática e pode ser palpável ao toque retal (Calais da Silva, 2013). Assim, o toque retal é o teste primário para a avaliação clínica inicial da próstata. Este foi o primeiro teste de rastreio a ser utilizado, sendo atualmente ainda usado rotineiramente juntamente com a pesquisa do antígeno específico da próstata (PSA, do inglês *prostate-specific antigen*). O toque retal tem o benefício de detetar tumores que não segregam PSA, no entanto, é um teste com pouca reprodutibilidade (Borley & Feneley, 2009; Marques, 2016; Tavares, 2019).

#### B. Antígeno específico da próstata (PSA)

O PSA é uma glicoproteína segregada pelo epitélio prostático (Ingle *et al.*, 2013). Como biomarcador, o PSA é específico do órgão, mas não específico do cancro, o que significa que, para além do carcinoma, também pode detetar tumores benignos da próstata, facto que reduz a sua especificidade como um teste de deteção específico do CaP (Calais da Silva, 2013; Tavares, 2019). O valor absoluto do PSA é, então, útil para detetar anomalias na próstata e avaliar a resposta ao tratamento, embora a sua utilização como um método de rastreio também seja comum, embora controversa (Adhyam & Gupta, 2012).

Os valores normais de PSA em homens saudáveis são geralmente < 4 ng/mL, porém, os níveis séricos de PSA são influenciados pela idade dos doentes e tamanho da próstata. Num homem saudável de 60 anos, sem evidências de carcinoma prostático, a concentração sérica de PSA aumenta em aproximadamente 3,2% ao ano (Ingle *et al.*, 2013).

### **C. Biópsia prostática**

A biópsia prostática é um exame que permite a obtenção de pequenos cilindros de tecido prostático para análise microscópica e identificação da presença ou ausência de células malignas. Consiste numa ecografia prostática transrectal à qual se associa a recolha eco-guiada de fragmentos de próstata (Maia, 2010). A ecografia fornece imagens da próstata e das vesículas seminais utilizando uma sonda intra-retal. Esta técnica é útil para fornecer imagem total da próstata, identificar quistos, abcessos e calcificações dentro da próstata e é usada também para determinar o seu volume (Borley & Feneley, 2009).

As indicações para as biópsias prostáticas incluem toque retal anormal, um PSA elevado ou um aumento do PSA, e biópsias anteriores que mostram neoplasia intraepitelial isolada (PIN, do inglês *prostatic intraepithelial neoplasia*) (Borley & Feneley, 2009; Tavares, 2019).

### **1.2.4. Estadiamento**

O que distingue as células tumorais das células normais é o seu crescimento ilimitado e imprevisível. Para conhecer o grau de diferenciação histológico é necessário analisar a amostra do tecido da próstata que foi recolhido na biópsia. Com base no resultado, é possível saber a agressividade do tumor através do sistema de classificação de *Gleason*.

O sistema de classificação de *Gleason*, que foi originalmente definido por *Donald Gleason* (Gleason *et al.*, 1974) com base nos padrões histológicos do adenocarcinoma da próstata, foi refinado ao longo dos anos e é, atualmente, o sistema de classificação mais amplamente usado para definir a agressividade do carcinoma da próstata (Epstein *et al.*, 2016).

A classificação de *Gleason* baseia-se na arquitetura das células malignas dentro do tumor e no grau de diferenciação das mesmas. Uma vez que a próstata é uma glândula, quanto menos glandular for a aparência microscópica, maior o grau de *Gleason*, variando este de 1 a 5, como se pode verificar na Figura 7 (Leslie., 2020).

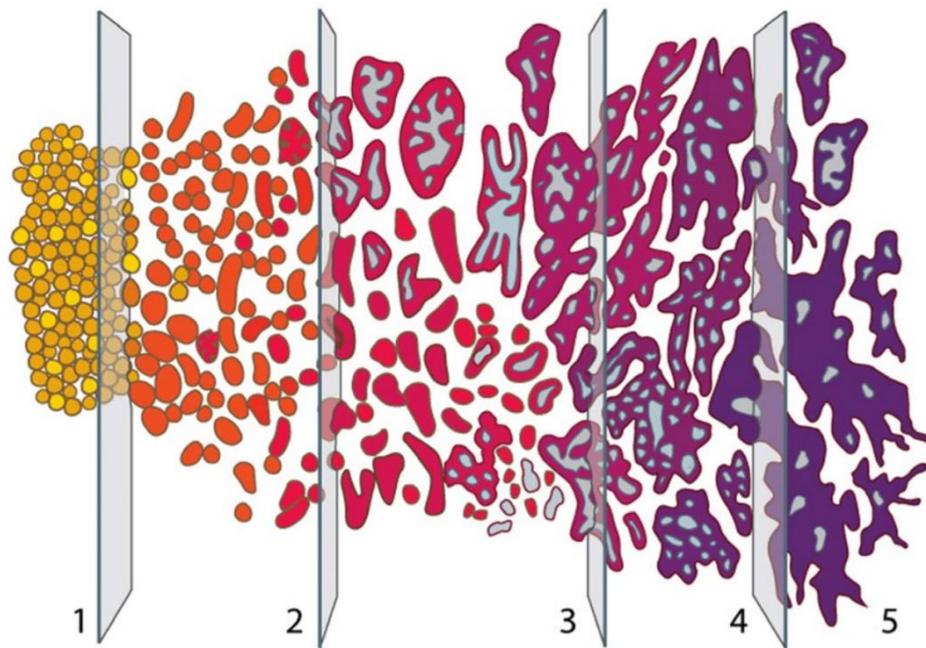


Figura 7: Ilustração do sistema de classificação de *Gleason*, desde o grau 1 (menos agressivo) até ao grau 5 (mais agressivo). (Prostate Cancer Foundation of Australia, 2020)

O grau de *Gleason* é sempre uma soma de dois números. Estes dois números representam o grau de *Gleason* do padrão predominante adicionado ao grau de *Gleason* do padrão mais comum seguinte. Em 2014, a Conferência de Consenso da Sociedade Internacional de Patologia Urológica recomendou algumas alterações ao sistema de classificação de *Gleason*. Assim, todas as somas correspondentes a 6 ou menos encontram-se no grau I; se a soma corresponder a  $3+4=7$  situa-se no grau II; se corresponder a  $4+3=7$  situa-se no grau III;  $4+4=8$  situa-se no grau IV e todas as somas correspondentes a 9 e 10 no grau V (Leslie., 2020; Litwin & Tan, 2017). Quanto maior o grau de *Gleason*, maior a agressividade que se traduz na maior a rapidez com que o cancro pode crescer ou se disseminar (Beyzadeoglu *et al.*, 2010).

O sistema de estadiamento do CaP tem como base a classificação TNM (do inglês, *Tumour-Node-Metastasis*) propostas pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), que se fundamentam nos parâmetros de tamanho e de do tumor primário, categoria T, extensão, ou não, da neoplasia aos gânglios linfáticos regionais, categoria N, e existência, ou não, de metástases à distância, categoria M (Calais da Silva, 2013). A tabela do sistema de estadiamento TNM pode ser encontrada no ANEXO I.

Deste modo, analisando o sistema de classificação TNM, é possível classificar a doença em três grandes grupos: localizada, onde o tumor se encontra confinado à próstata (T1 e T2); localmente avançada, quando a doença evolui e se estende para regiões fora da cápsula da próstata (T3) ou mesmo para a bexiga (T4); e por último, metastática, definida pela presença de tumor noutras zonas do organismo, normalmente os gânglios linfáticos (N) e o osso (M) (Marques, 2016; Tavares, 2019).

### 1.2.5. Transformação maligna da próstata

A transformação maligna da próstata segue um processo de várias etapas, iniciando como PIN, uma alteração pré-invasiva do CaP. Ao ser detetada por biópsia, a PIN é indicação clínica para acompanhamento do doente pois pode evoluir para CaP localizado e, em seguida, CaP avançado com invasão local, culminando em CaP metastático (Wang *et al.*, 2018). Este processo está representado na Figura 8.

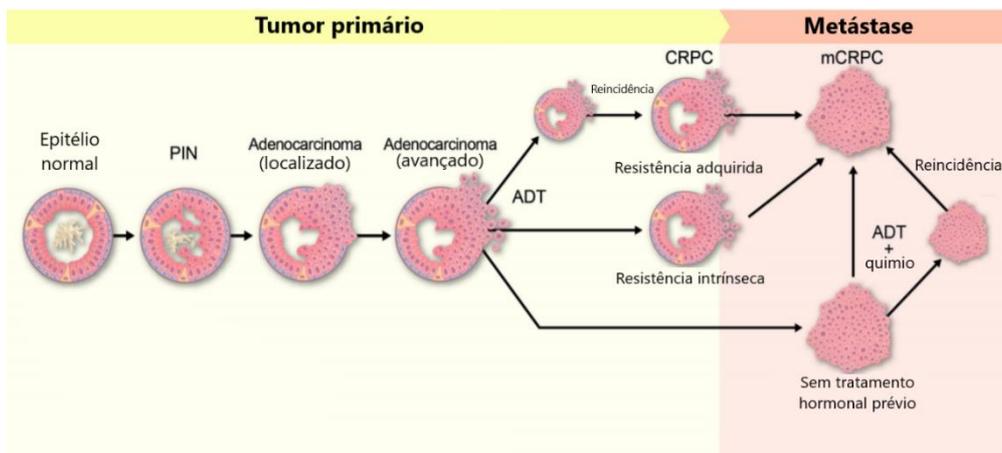


Figura 8: Transformação maligna da próstata, seguindo um processo de várias etapas, começando com PIN, podendo progredir até ao CaP metastático. [Adaptado de (Wang *et al.*, 2018)]

Os androgénios são essenciais para o desenvolvimento normal da próstata, mas também para o aparecimento do carcinoma da próstata por meio das suas interações com o recetor de androgénio (RA, do inglês, *androgen-receptor*). No CaP, os androgénios suprimem a proliferação de células basais, suportam a sobrevivência de células luminais e promovem metástases (Shen & Abate-shen, 2010). Assim, uma característica central do carcinoma da próstata é sua capacidade de resposta hormonal, reconhecida pela primeira vez por *Charles Huggins* e *Clarence Hodges* (Huggins &

Hodges, 2002), ao relatar que a castração, isto é, a remoção dos androgénios testiculares através de cirurgia ou de tratamento químico, levou à regressão do tumor em doentes com CaP. (Ramon & Denis, 2007; Shen & Abate-shen, 2010; Wang *et al.*, 2018).

### **A resistência à castração**

A resistência à castração é estabelecida quando há progressão da doença em doentes com concentração sérica de testosterona compatível com castração e com um contínuo aumento do valor sérico do PSA, como progressão de doença pré-existente e/ou pelo aparecimento de novas lesões metastáticas (Calais da Silva, 2013).

A terapia de privação de androgénios (ADT, do inglês *androgen deprivation therapy*), usando agentes que bloqueiam esta hormona, é agora o tratamento de primeira linha para o CaP avançado. No entanto, a regressão do tumor após a castração é apenas temporária e, em 80-90% dos doentes, o tumor reincide e progride para a resistência à castração, denominado de carcinoma da próstata resistente à castração (CRPC, do inglês *castration-resistant prostate cancer*). Uma das principais características da transição para um estado resistente à castração é a sinalização anormal do RA. As células do CRPC, não só continuam a expressar o RA, como se caracterizam pela amplificação e hiperativação deste, o que as torna hipersensíveis a níveis baixos de androgénios. A sinalização do RA é ativada nestas células em parte por síntese intratumoral de androgénio, permitindo o crescimento do tumor mesmo com níveis muito baixos de testosterona sérica (Libardi Do Amaral, 2017).

### **Metastização**

O carcinoma da próstata avançado metastiza primeiro para as zonas adjacentes, disseminando depois para órgãos distantes, sendo os ossos o local mais comum de metástase. As metástases ósseas ocorrem em mais de 90% dos doentes com CRPC. Um dos problemas das metástases ósseas é que podem estar na base do aparecimento de fraturas, compressão da medula espinhal, insuficiência na medula óssea, anemia, perda de peso, hipercoagulabilidade e aumento da suscetibilidade a infeções (Saad & Hotte, 2010). Quando o CRPC metastiza, passa a ser denominado de CaP metastático resistente à castração (mCRPC, do inglês *metastatic castration-resistant prostate cancer*).

O osso apresenta uma composição muito heterogênea, sendo constituído por uma parte orgânica e uma inorgânica. A parte orgânica é formada por 90% de colagénio e por uma substância amorfa que contém proteínas. A parte inorgânica, presente em maior quantidade, é constituída por cristais de hidroxapatite, que dão maior resistência aos ossos e são compostos por sais minerais como fosfato de cálcio (Marques, 2016; Writer, 2020).

A remodelação óssea normal combina processos de reabsorção óssea, realizados por osteoclastos, que precede a formação óssea, realizada por osteoblastos. Assim, a quantidade de osso reabsorvido é igual à quantidade de osso formado. Esta ação sincronizada mantém a massa óssea em equilíbrio fisiológico, garantindo um esqueleto saudável. Na metástase óssea, há uma interação dinâmica entre as células tumorais com os osteoblastos, os osteoclastos e todas as outras células da matriz óssea, de onde resulta num “ciclo vicioso”, deixando de haver o equilíbrio entre a reabsorção e a formação ósseas. Este processo apoia a sobrevivência das células tumorais e o crescimento do tumor (Bagi, 2005; Wang *et al.*, 2018).

A invasão local é um dos primeiros passos fundamentais na metastização pois, sem ela, a propagação do tumor não pode ocorrer. Depois da infiltração das células tumorais em tecidos adjacentes ao tumor primário, vai existir migração das células neoplásicas entrando nas circulações sanguínea ou linfática após terem rompido as barreiras endoteliais. A partir daí, as células devem sobreviver na circulação sanguínea ou linfática, extravasando em outros tecidos a partir do sistema circulatório, onde se vão nidar e proliferar para formar uma micro-metástase. A subsequente proliferação vai conduzir à colonização (Clarke *et al.*, 2009; Tavares, 2019). Na Figura 9 é apresentada uma representação esquemática do processo de formação de uma metástase óssea.

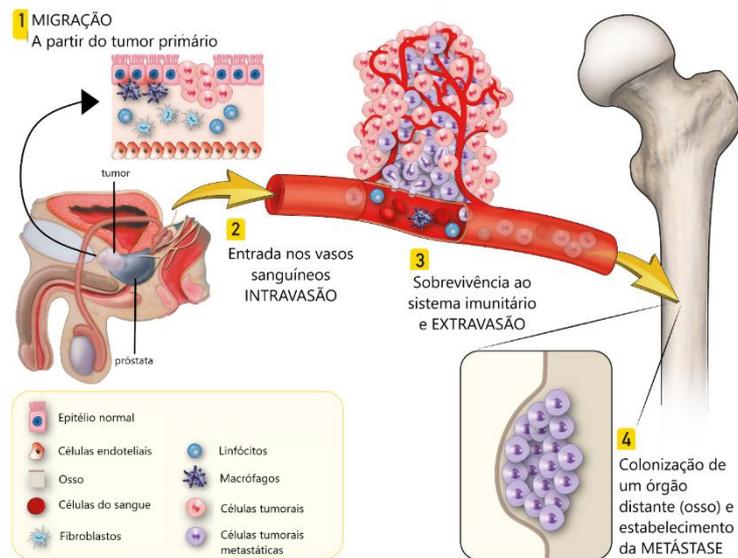


Figura 9: Representação esquemática da formação da metástase óssea. Um subgrupo de células malignas do tumor primário adquire a capacidade de migrar (1), entrar na corrente sanguínea (2), sobreviver à vigilância do sistema imunitário e sair da corrente sanguínea (3) e finalmente espalhar-se colonizando um local distante do corpo (4). [Adaptado de (Guerrieri *et al.*, 2020)]

O diagnóstico das metástases ósseas pode ser realizado através de uma cintigrafia óssea ou de uma tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês, *positron emission tomography*). Para a cintigrafia óssea, o radiofármaco mais utilizado é o hidroximetil difosfonato marcado com tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ ). Este radiofármaco vai ter alta afinidade em relação ao osso pois vai-se incorporar na hidroxiapatite na superfície do osso. A absorção deste composto depende do fluxo sanguíneo e da atividade osteoblástica local e, por isso, a cintigrafia óssea em doentes com carcinoma da próstata é uma técnica extremamente sensível. Na PET podem ser usados os radiofármacos  $^{18}\text{F-FCH}$  (fluorocolina),  $^{18}\text{F-Fluoreto}$  de sódio ou mesmo o  $^{18}\text{F-FDG}$  (fluorodesoxiglicose). A PET com a utilização do primeiro radiofármaco representa o exame mais preciso para estadiar o carcinoma da próstata de risco intermédio ou alto, de forma não invasiva. Comparativamente à  $^{18}\text{F-FCH}$ , o  $^{18}\text{F-Fluoreto}$  de sódio apresenta sensibilidade sobreponível, especialmente na deteção de metástases ósseas, mas menor especificidade (Bagi, 2005; Calais da Silva, 2013). O  $^{18}\text{F-FDG}$ , apesar de não ser tão específico, é o radiofármaco mais utilizado para a deteção de tumores e é também recomendado para a deteção de metástases ósseas (Abrantes *et al.*, 2020).

### 1.2.6. Terapêutica

O tratamento do carcinoma da próstata depende do grau, estadiamento e idade e vai desde a vigilância ativa até uma combinação de cirurgia, quimioterapia, radiação e/ou ADT (Wang *et al.*, 2018). A escolha da terapia pode influenciar a sobrevivência, bem como o risco de efeitos adversos induzidos pela terapia (Ramon & Denis, 2007).

#### A. Vigilância ativa

O termo “vigilância ativa” é usado para descrever uma estratégia de tratamento que inclui adiar o tratamento até que seja necessário intervir. A principal razão para este tipo de tratamento baseia-se no facto de que, para muitos doentes de risco definido por um grau de *Gleason* de I, a doença é indolor e de crescimento lento. Desta forma, poupa-se as comorbilidades consequentes de tratamentos desnecessários. Os doentes que recebem vigilância ativa devem ser acompanhados cuidadosamente com várias medições de PSA e biópsias periódicas da próstata (Ramon & Denis, 2007).

Os cancros de baixo risco (grau de *Gleason* I) são normalmente controlados por vigilância ativa, uma vez que os resultados de ensaios clínicos randomizados não mostram diferenças significativas entre vigilância ativa e prostatectomia radical ou radioterapia (Wang *et al.*, 2018).

Em oposição, estão os cancros de alto risco (*Gleason* IV ou V), que recebem um tratamento mais agressivo, incluindo terapias baseadas em cirurgia e radioterapia (Wang *et al.*, 2018).

#### B. Prostatectomia radical

A prostatectomia radical é uma operação para remover a próstata e os tecidos que a rodeiam. Isto geralmente inclui as vesículas seminais e alguns gânglios linfáticos próximos. A prostatectomia radical pode curar o carcinoma da próstata em homens cujo cancro está limitado à próstata, contudo, esta técnica só se realiza em homens com menos de 70 anos e com uma esperança média de vida superior a 10 anos. Este tratamento envolve alguns riscos como a incontinência urinária e a disfunção erétil (Bandukwala, 2021).

### **C. ADT**

Ao remover a fonte testicular de androgénios, através de castração cirúrgica, ocorre um declínio considerável das concentrações de testosterona, embora persista um nível muito baixo desta hormona, conhecido como "nível de castração". A orquiectomia bilateral é um procedimento cirúrgico simples e livre de complicações, que pode ser facilmente realizado sob anestesia local, contudo é uma modalidade pouco utilizada (Ramon & Denis, 2007).

A castração química pode ser obtida com a administração de estrogénios, análogos da hormona libertadora de hormona luteinizante (LHRH, do inglês *Luteinizing hormone-releasing hormone*), antagonistas da LHRH e antiandrogénios (Calais da Silva, 2013).

O eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal regula diversas formas de supressão da testosterona num contexto de carcinoma da próstata. A LHRH é produzida pelas células neuroendócrinas no hipotálamo e estimula a hipófise anterior para libertar a hormona luteinizante (LH, do inglês *Luteinizing hormone*). A LH estimula as células de *Leydig* testiculares levando à produção de testosterona. A testosterona, por sua vez, inibe o hipotálamo atuando como "feedback negativo", mantendo os níveis de testosterona em valores normais (Calais da Silva, 2013).

As potentes terapias hormonais de segunda geração aprovadas pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) incluem enzalutamida, abiraterona e apalutamida. (Wang *et al.*, 2018)

### **D. Quimioterapia**

Atualmente, só os doentes de carcinoma da próstata com doença metastática (mCRPC) devem ser considerados para quimioterapia (Calais da Silva, 2013).

Até 2010, o tratamento de 1ª linha para mCRPC era a quimioterapia com docetaxel. Outro agente de quimioterapia, o cabazitaxel, foi aprovado em 2010 para os doentes com mCRPC previamente tratados com docetaxel. Contudo, as opções de tratamento para o mCRPC expandiram-se significativamente na última década com mais agentes de quimioterapia aprovados para mCRPC.

### **E. HIFU**

O HIFU (do inglês, *high intensity focused ultrassound*) consiste na utilização de ondas de ultrassom emitidas a partir de um transdutor, que causam danos nos tecidos por efeitos mecânicos e térmicos, originando cavitação da próstata. O objetivo do HIFU é aquecer tecidos malignos acima de 65 °C de modo a serem destruídos por necrose de coagulação. O HIFU é um procedimento demorado, realizado sob anestesia geral ou regional, com o doente deitado na posição lateral (Calais da Silva, 2013; Monteiro, 2006).

### **F. Terapias com Recurso a Radiação Ionizante**

A terapia com radiação ionizante pode ser altamente eficaz se o tumor for sensível à radiação e se a localização do tumor for tal que permita uma abordagem radiológica eficaz (Bagi, 2005).

Dois modalidades de radioterapia podem ser aplicadas, a radioterapia por fonte externa e a radioterapia interna, ou braquiterapia. A irradiação externa é a modalidade mais convencional e pode ser considerada uma alternativa à prostatectomia radical, com resultados comparáveis em termos de sobrevivência e de qualidade de vida. As comorbidades habitualmente associadas à irradiação de tecidos vizinhos do órgão-alvo (dermatite, proctite, cistite) têm vindo progressivamente a reduzir devido às constantes melhorias das técnicas utilizadas, como a radioterapia conformacional 3D. A combinação com ADT permite melhorar os resultados obtidos em casos de alto risco (Monteiro, 2006).

O tratamento das metástases ósseas representa um esforço extremamente desafiante devido aos obstáculos causados pela localização da metástase, a anatomia, as características histológicas, a grande dinâmica celular da remodelação óssea e a fisiologia da metástase óssea. A heterogeneidade dos microambientes ósseo e tumoral apresenta obstáculos adicionais, tal como a deposição do fármaco no local esquelético específico, de modo a tornar o tratamento eficaz. A deposição de radiação ionizante num osso que contenha um tumor metastático pode ser conseguida usando radioterapia externa com raios-X (ou raios-gama) ou com outra modalidade que consiste na injeção de radioisótopos que possam ir até ao osso. Embora os doentes com dor óssea metastática sejam, por definição, incuráveis, a radioterapia paliativa pode reduzir ou eliminar a dor das metástases ósseas em 80% dos doentes, melhorando a sua

qualidade de vida. Embora doses mais elevadas de radiação possam produzir um melhor controlo do tumor, a dose que pode ser dada é limitada pela possibilidade de danificar o tecido normal à volta do tumor. Os recentes avanços na radioterapia conformacional permitem uma melhor distribuição da dose ao volume-alvo e "modelação" do feixe de radiação e, assim, em conformidade com a forma do tumor. Outras modalidades de tratamento como o uso de bifosfonatos visam prevenir as fraturas ósseas (Bagi, 2005).

A braquiterapia consiste na colocação transperineal de pequenos implantes radioativos intraprostáticos, que emitem radiação  $\gamma$ , guiada por técnicas imagiológicas, e permite a administração de doses maiores de radiação com menor comorbidade associada. É uma técnica segura e eficiente. Contudo, têm sido adotados alguns critérios de elegibilidade, tais como próstata de pequeno volume, grau de *Gleason* <IV e reduzida sintomatologia do aparelho urinário. Uma complicação frequente desta modalidade são as queixas urinárias de natureza irritativa (Calais da Silva, 2013; Monteiro, 2006).

Do ponto de vista terapêutico, por serem normalmente administrados por injeção intravenosa, os radiofármacos são tratamentos sistémicos, emitindo radiação  $\alpha$  ou  $\beta$  e estão indicados em doentes com CRPC com metástases ósseas sintomáticas. Para tratar a doença óssea sintomática, já foram utilizados como terapias paliativas alguns agentes emissores de partículas beta, como o estrôncio-89 (Metastron®), o samário-153 (Quadramet®), o fósforo-32 e o rénio-186. Estes radiofármacos foram eficazes no alívio da dor, no entanto, não melhoraram significativamente a sobrevivência. Mais recentemente, surgiu o estudo ALSYMPCA, que demonstrou uma melhoria na sobrevivência geral para os doentes que receberam o emissor  $\alpha$  rádio-223 (Wallis & Klaassen, 2019).

### **1.3. Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático resistente à castração**

*Neuman et al.*, em 1955, demonstrou que os processos de fixação do rádio-223 envolvem uma troca iónica deste radionuclídeo com alguns iões de cálcio na superfície mineral óssea. Após estudos pré-clínicos e de fase I e II, um ensaio de fase III chamado

ALSYMPCA procurou determinar a eficácia clínica deste radiofármaco. Neste ensaio, o dicloreto de rádio-223 ( $^{223}\text{RaCl}_2$ ) (XOFIGO<sup>®</sup>, Bayer Pharma, Berlin, Germany) demonstrou uma melhoria considerável na sobrevivência global, um perfil de segurança favorável, um atraso no aparecimento de eventos relacionados com as metástases ósseas e uma diminuição da dor associada a alguns efeitos secundários. Assim, este radiofármaco adquiriu uma importante posição terapêutica entre os fármacos disponíveis para doentes com mCRPC (Marques *et al.*, 2018).

O XOFIGO<sup>®</sup> (Bayer Pharma, Berlin, Germany) foi o primeiro radiofármaco com um radionuclídeo emissor  $\alpha$  a ser aprovado pela FDA e pela EMA (do inglês, *European Medicines Agency*), em 2013, para tratamento do mCRPC (Wissing *et al.*, 2013). É destinado exclusivamente ao tratamento de metástases ósseas em doentes com mCRPC, que não apresentem evidências de metástases viscerais (Marques *et al.*, 2018). Em 2018, a EMA recomendou restringir o uso de XOFIGO<sup>®</sup> a doentes que tenham feito exclusivamente dois tratamentos anteriores para CaP metastático ou que não possam receber outros tratamentos. No comunicado, a EMA referiu:

*“Pensa-se que o Xofigo<sup>®</sup>, que é absorvido pelo osso, acumula-se em locais onde o osso já está danificado, por exemplo, por osteoporose ou microfraturas, aumentando o risco de fratura. No entanto, as razões para uma possível morte precoce vistas neste estudo não são totalmente compreendidas. A empresa que comercializa o XOFIGO<sup>®</sup> terá que realizar estudos para caracterizar melhor esses eventos e esclarecer os mecanismos por detrás destes” (Xofigo | European Medicines Agency, 2018).*

## **Radiofármaco e farmacocinética**

XOFIGO<sup>®</sup> é uma solução de  $^{223}\text{RaCl}_2$ , constituindo um fármaco que emite partículas  $\alpha$  terapêuticas direcionado para as metástases ósseas. Quando é produzido, tem uma atividade específica de 1100 kBq/mL. Este fármaco é indicado para o tratamento de doentes com CRPC com metástases ósseas sintomáticas e nenhuma doença metastática visceral conhecida (EMA, 2010).

O procedimento terapêutico consiste em administrar lentamente (durante cerca de 1 minuto) 6 injeções intravenosas em intervalos de 4 semanas. Em cada injeção é administrada uma atividade de 55 kBq/kg de XOFIGO<sup>®</sup> (Deshayes *et al.*, 2017).

Após a injeção intravenosa, o rádio-223 é rapidamente eliminado do sangue e é incorporado principalmente no osso e nas metástases ósseas sendo excretado por via intestinal. A excreção fecal é a principal via de eliminação e cerca de 5% é excretado por via urinária. O rádio-223 não é metabolizado pelo fígado nem eliminado pela biliar. Sete dias após a injeção, aproximadamente 76% da atividade administrada foi eliminada. As reações adversas mais frequentemente observadas ( $\geq 10\%$ ) foram diarreia, náuseas, vômitos e edema periférico. As alterações hematológicas mais comuns ( $\geq 10\%$ ) relacionadas à administração de rádio-223 foram a anemia, a linfocitopenia, a leucopenia, a trombocitopenia e a neutropenia (Nguyen *et al.*, 2016).

O período de semi-desintegração do rádio-223 é suficiente para a sua preparação, distribuição e administração. A sua baixa radiação gama é favorável do ponto de vista de manuseio, proteção contra radiação e tratamento em regime de ambulatório (Marques *et al.*, 2018)

### **Mecanismo de ação**

O rádio-223 é um osteomímico que é absorvido pelo tecido ósseo, devido às suas semelhanças físicas com o cálcio e à sua incorporação ativa pelos osteoblastos. O alvo da injeção intravenosa de rádio-223 é a hidroxiapatite [ $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ], que é a principal componente da matriz óssea inorgânica. O rádio-223 vai-se localizar em áreas de metástases osteoblásticas que contêm hidroxiapatite (Nguyen *et al.*, 2016).

As partículas  $\alpha$  emitidas, de elevada energia, vão quebrar a dupla cadeia de ADN, provocando a morte celular. Como a radiação  $\alpha$  tem um curto alcance, é possível confinar a morte celular às células tumorais e ao microambiente tumoral envolvente, provocando uma citotoxicidade localizada, mas diminuindo a toxicidade dos efeitos secundários. Os efeitos tóxicos da radiação  $\alpha$  no microambiente tumoral interrompem, também, a atividade dos osteoblastos e osteoclastos, interrompendo o feedback positivo entre essas células. Como consequência ocorre a inibição do crescimento tumoral e há uma estabilização da estrutura normal (Figura 10) (Morris *et al.*, 2019).

Depois de uma injeção intravenosa de rádio-223, há uma rápida depuração do sangue (12% da atividade injetada permanece no sangue em 10 minutos, 2% em 4 horas e 1% em 24 horas) com grande retenção óssea. A concentração no osso ocorre depois de 10 minutos com uma concentração de 99% em 24 horas. O rádio-223

permanece no osso por, pelo menos, 14 dias e com um período de semi-desintegração efetivo médio de 8,2 dias. A radioatividade não se localiza diretamente nos tumores, mas sim na superfície óssea ao redor da lesão óssea e nas regiões de atividade óssea (Brito & Etchebehere, 2020; EMA, 2010).

O sistema esquelético é a localização que recebe uma dose mais elevada (16 Gy) após injeção intravenosa, seguida do cólon. Após seis ciclos de tratamento com rádio-223, a dose de radiação absorvida no endóstio normal é de 16 Gy, aproximadamente 10 vezes maior do que a dose de radiação absorvida na medula óssea (1,5 Gy) (Brito & Etchebehere, 2020).

A localização do radiofármaco na superfície óssea, a forma como ele interage com as vias moleculares das células e o processo de intercalação do rádio-223 na estrutura cristalina do osso ainda não estão completamente esclarecidos (Marques *et al.*, 2021). Torna-se, portanto, necessário compreender melhor o microambiente tumoral da metástase através da utilização de modelos celulares mais complexos (3D) que permitam avaliar os efeitos radiobiológicos do rádio-223 e a sua citotoxicidade num ambiente o mais próximo ao humano.

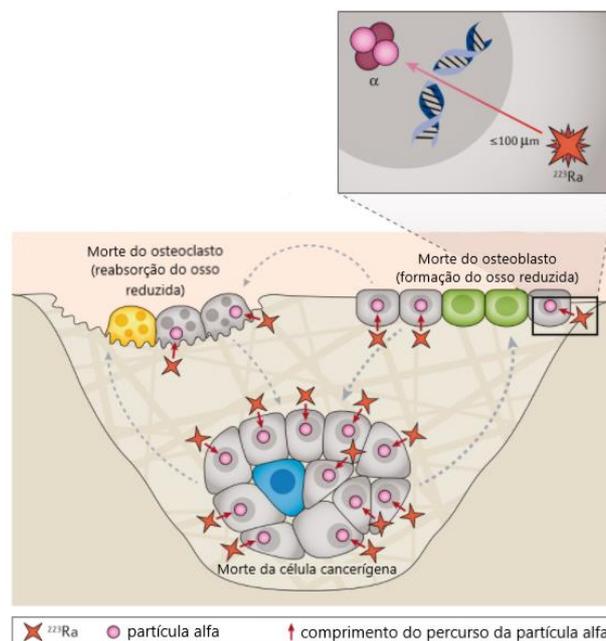


Figura 10: Mecanismo de ação do rádio-223. O rádio-223 substitui o cálcio em complexos de hidroxiapatite no osso. A radiação  $\alpha$  conduz a citotoxicidade através da indução de quebras na dupla cadeia de ADN em células tumorais adjacentes, osteoblastos e osteoclastos, levando à inibição de crescimento tumoral e a uma estabilização da estrutura normal. [Adaptado de (Morris *et al.*, 2019)]

## 1.4. Modelos celulares tridimensionais (3D)

### 1.4.1. Evolução dos modelos celulares

A avaliação e aprovação de terapêuticas para o cancro envolvem uma série de etapas que incluem estudos pré-clínicos, nomeadamente estudos *in vitro* e *in vivo*, antes de passar para fases de ensaio clínico (Tavares, 2019). Uma grande maioria dos ensaios *in vitro* compreendem a utilização de culturas celulares bidimensionais (2D). Nas culturas celulares 2D aderentes, as células crescem numa monocamada num frasco de cultura ou numa placa de *petri*, ligada a uma superfície plástica, com revestimentos específicos para potenciar a adesão celular. As vantagens das culturas 2D estão associadas com a manutenção simples e de baixo custo, com a sua fácil configuração e com o desempenho de testes funcionais. Infelizmente, as culturas 2D aderentes têm inúmeras desvantagens (Kapałczyńska *et al.*, 2018). A principal desvantagem desta técnica é que não mimetiza as estruturas naturais dos tecidos ou tumores, perdendo as suas propriedades específicas (Kapałczyńska *et al.*, 2018; Lin & Chang, 2008). As interações intercelulares e entre as células e o ambiente extracelular não são representativas das que ocorrem no ambiente tumoral humano que, por sua vez, são responsáveis pela diferenciação, proliferação, expressão génica e proteica, capacidade de resposta a estímulos, metabolismo de fármacos e outras funções celulares. Além disso, enquanto que as células distribuídas numa monocamada têm acesso ilimitado aos componentes do meio, como oxigénio e nutrientes, o mesmo não se aplica às células tumorais *in vivo*, pois essa disponibilidade é mais variável por causa da arquitetura natural do tumor (Kapałczyńska *et al.*, 2018).

A maioria das células constituintes do corpo humano interagem com células vizinhas e componentes da matriz extracelular (MEC) para estabelecer uma organização 3D única (Lin & Chang, 2008). Portanto, para fornecer uma alternativa fisiologicamente mais relevante, a cultura de células em modelos tridimensionais (3D) tem sido amplamente desenvolvida. Ao considerar a interação célula-célula e interações célula-MEC, a cultura celular 3D permite que as células repliquem várias características críticas presentes nos tecidos, incluindo morfologia, diferenciação, polaridade, taxa de proliferação, expressão génica e gradientes de nutrientes e de oxigénio (Koledova, 2017). Estas interações célula-célula e célula-MEC formam uma complexa rede de

comunicação de sinais bioquímicos e mecânicos, que são críticos para a fisiologia celular normal (Lin & Chang, 2008).

Assim, é importante salientar que as culturas celulares 3D colmatam a lacuna entre as culturas celulares 2D e os modelos animais. Os modelos de cultura 3D incorporam interações fisiologicamente relevantes, embora ainda sejam passíveis de manipulação genética fácil, análise bioquímica e imagem, difíceis de implementar num modelo animal. Ao fornecer um microambiente reproduzível e controlado que imita as condições *in vivo*, as culturas 3D tornaram-se uma alternativa válida ao uso de modelos animais, mas também reduzindo as incertezas experimentais decorrentes de culturas celulares 2D (Koledova, 2017; Lin & Chang, 2008).

As questões éticas sobre a utilização de animais na investigação do cancro são altamente controversas e os testes em animais são fortemente desencorajados se puderem ser substituídos por ensaios em cultura celular. Para além disso, os modelos animais acarretam custos mais elevados e outros problemas como a diferença de espécies e a disponibilidade limitada (Fontana *et al.*, 2020). Desde modo, os modelos celulares 3D evoluíram drasticamente ao longo dos anos e têm-se posicionado fortemente como modelos pré-clínicos válidos para o estudo de vários mecanismos de doença e de avaliação do potencial de novos tratamentos.

#### **1.4.2. Microambiente tumoral e culturas celulares 3D**

Os tumores sólidos são compostos por tecido conjuntivo e células do estroma, como as células endoteliais, do sistema imunitário e fibroblastos (Tavares, 2019) e, também, por componentes da MEC existentes num microambiente 3D altamente interativo. As células tumorais que crescem em culturas celulares 3D são expostas a forças adesivas, topográficas e mecânicas dramaticamente diferentes em comparação com as células que crescem em culturas bidimensionais. Adicionalmente, as interações célula-célula e célula-MEC em tumores sólidos de várias camadas constituem uma barreira de permeabilidade que os agentes terapêuticos devem ultrapassar (Sant & Johnston, 2017).

Existem vários tipos de modelos celulares 3D que podem ser classificados em 3 grandes grupos: as culturas 3D mecanicamente sustentadas, as culturas 3D sem suporte mecânico e os insertos (Tavares, 2019).

Dentro do grupo das culturas 3D mecanicamente sustentadas estão os organoides, que são aglomerações complexas de células específicas de órgãos, como as do estômago, do fígado ou da bexiga. Eles são constituídos por células estaminais ou progenitoras e juntam-se automaticamente quando recebem um ambiente extracelular de suporte, como um biopolímero ou colagénio (Abraham, 2020; Rossi, 2018)

No grupo das culturas 3D sem suporte, existem os esferoides. Estes são aglomerados simples de células abrangentes como de tecido tumoral, hepatócitos, tecido nervoso, etc. Não requerem uma estrutura para formar as culturas 3D pois fazem-no apenas juntando-se umas com as outras, baseando-se na capacidade de adesão homotípica célula-célula (Abraham, 2020; Rossi, 2018).

A semelhança dos esferoides com nódulos tumorais avascularizados impulsionou a sua aplicação em testes com agentes quimioterapêuticos e novos fármacos. Este modelo 3D surgiu como uma abordagem pioneira, a partir do qual têm sido desenvolvidos cada vez mais ensaios de alto desempenho para triagem de fármacos antitumorais. Também têm sido utilizados na modelação 3D de tumores sólidos derivados de tecidos epiteliais, como cancro da mama, do pulmão, da próstata ou colorretal (Abraham, 2020; Zanoni *et al.*, 2020).

Dentro dos esferoides, as taxas de consumo de oxigénio diferem substancialmente das registadas durante o crescimento 2D, onde existe uma relação superfície-volume maior e todas as células têm igual contacto com o sobrenadante. Na verdade, em modelos 3D, apenas a camada externa de células interage diretamente com o meio, simulando as condições hipóxicas *in vivo*, onde apenas uma pequena porção de tecido é alcançado por vasos sanguíneos (Figura 11) (Fontana *et al.*, 2020).

A Figura 11 resume as principais diferenças entre as culturas celulares bidimensionais e tridimensionais.

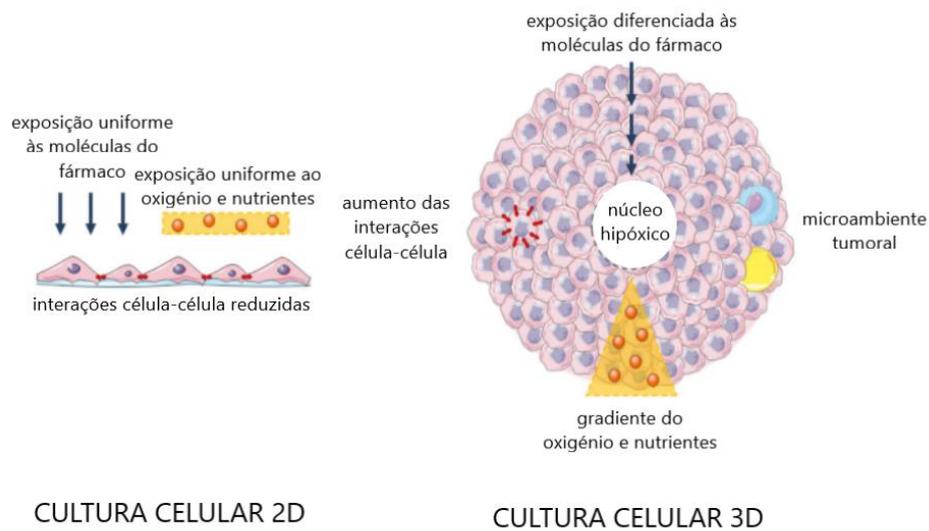


Figura 11: Principais diferenças entre culturas celulares 2D e culturas celulares 3D no microambiente tumoral. [Adaptado de (Fontana *et al.*, 2020) ]

Em particular, a aplicabilidade dos modelos 3D no estudo do carcinoma da próstata prende-se com o facto desta neoplasia metastizar principalmente para o osso, onde dá origem a um microambiente tumoral complexo. Ao estudar formas de combater a metástase, uma das principais limitações é representada pela natureza complexa do ambiente ósseo e pela falta de modelos simples, baratos e fiáveis que refletem os eventos biológicos que ocorrem em humanos (Fontana *et al.*, 2020).

Os esferoides de células tumorais podem ser compostos por um único tipo de células (homotípicos) ou por múltiplos tipos de células em co-cultura (heterotípicos). Se o objetivo for recriar o microambiente tumoral, será imprescindível cultivar as células tumorais com outros tipos de células, que também estão presentes, como fibroblastos ou células epiteliais. Assim, a reprodução da comunicação celular e das vias de sinalização observadas nos tumores sólidos será mais fidedigna. Em particular, os fibroblastos representam uma das populações mais abundantes de células no microambiente tumoral, contribuindo para a iniciação do tumor, para a sua progressão, metastização e resposta à terapia. Por este motivo, os esferoides heterotípicos são amplamente usados nos estudos envolvidos na descoberta de fármacos (Tavares, 2019; Zanoni *et al.*, 2020).

As culturas tridimensionais de células de CaP podem ser obtidas através de várias metodologias, com diferentes tecnologias. Um método muito popular envolve culturas não aderentes com superfícies geralmente revestidas com agarose. Este é um método relativamente simples e de baixo custo. Outro método comum envolve a criação dos esferoides pela técnica de *hanging drop*, onde as células são cultivadas em gotas suspensas até formarem estruturas arredondadas. Nos esferoides obtidos por esta técnica, os contactos célula-célula são preservados, é possível criar esferoides heterotípicos e o número de células pode ser controlado, assim como o volume do meio. Porém, revela-se um desafio a substituição do meio, a transferência dos esferoides e a incorporação de substâncias na gota, limitando o seu uso. Os *scaffolds* também são utilizados, funcionando como substitutos da matriz celular, e fornecem suporte físico para a formação e para o crescimento dos esferoides. Na produção de esferoides, é utilizado também um método com substratos de polímeros hidrofílicos que mimetizam a matriz extracelular e incluem o matrigel, o alginato e o colagénio. As células agregam-se espontaneamente e para além das interações célula-célula, também é preservado o contacto matriz-célula. Este método tem a desvantagem de os esferoides poderem sofrer modificações estruturais ao longo do tempo. No entanto, são caros e as experiências nem sempre são reprodutíveis. Por último, existe uma abordagem mais complexa, baseada em dispositivos microfluídicos, onde as células são cultivadas para recriar a arquitetura *in vitro* da massa tumoral *in vivo*. No entanto, essa tecnologia ainda está a ser desenvolvida e não está ao alcance de muitos dos laboratórios devido ao elevado custo (Fontana *et al.*, 2020).

As técnicas de cultura celular 3D tornaram-se indispensáveis para modelar o microambiente tumoral, aceleraram a compreensão da carcinogénese e levaram a abordagens mais avançadas no estudo de fármacos. No entanto, vários desafios permanecem em fazer sistemas de cultura 3D fisiologicamente mais relevantes, que não só integrem os elementos essenciais do CaP, mas que também sejam automatizados e permitam realizar análises com um alto rendimento (Fontana *et al.*, 2020; Koledova, 2017).

## 2. Objetivos



O CaP é a segunda neoplasia masculina mais comum em todo o mundo. Os estádios mais avançados e metastizados (mCRPC) da doença não têm cura, mas o rádio-223 revela-se uma opção terapêutica que melhora a sobrevivência global. Sabe-se que este radioisótopo, emissor predominantemente de partículas  $\alpha$ , é captado pelo tecido ósseo e vai ser incorporado pelos osteoblastos na matriz óssea. Os mecanismos subjacentes à incorporação do rádio-223 ainda não estão completamente compreendidos e, para além disso, torna-se necessário aprofundar mais o conhecimento em relação ao seu efeito no nicho metastático, no sentido de aumentar a utilidade terapêutica do rádio-223.

Tendo isto em conta, o projeto “*Ra-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático*” tem o principal objetivo de estudar os efeitos do rádio-223 em modelos celulares tridimensionais e homotípicos de CaP, mais especificamente em esferoides constituídos por uma linha celular metastática de cancro da próstata. Para atingir este objetivo principal, foi necessário delinear os seguintes objetivos específicos:

- Estabelecer e otimizar um modelo 3D homotípico de CaP;
- Validar o método de irradiação e de cálculo de dose do rádio-223 para os modelos 3D;
- Avaliar os efeitos biológicos do rádio-223 na sobrevivência, na proliferação e na viabilidade das células constituintes dos modelos 3D desenvolvidos.



## 3. Materiais e Métodos



Como referido na Introdução, é necessário fazer o estabelecimento de culturas tridimensionais para modelar o microambiente tumoral das células de CaP. Assim, a primeira etapa do estudo consistiu em estabelecer culturas 3D e fazer a respetiva otimização. Para tal, utilizou-se um protocolo com uma junção dos métodos *hanging drop* e *magnetic levitation*, dois métodos comumente utilizados em laboratório.

Posteriormente, procedeu-se à irradiação das culturas com o rádio-223. Contudo, devido à mudança das condições de irradiação para os modelos 3D, foi necessário validar o método de irradiação, com recurso ao ensaio SRB (sulfurodamina B) para avaliar o conteúdo proteico celular. No processo de validação, foi também utilizada o ensaio XTT (do inglês *2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide*) para avaliar a proliferação celular em culturas 3D.

Por fim, os efeitos biológicos do rádio-223 no modelo 3D foram avaliados recorrendo à imunocitoquímica, à coloração por *May-Grünwald Giemsa*, ao ensaio clonogénico e à microscopia de fluorescência com marcação tripla com Anexina V/Iodeto de Propídio/DAPI.

A grande vantagem de usar a cultura celular para qualquer uma destas aplicações é a consistência e reprodutibilidade dos resultados que podem ser obtidos a partir da utilização de um lote de células clonais, sendo que os modelos 3D apresentam uma melhor translação para os processos que ocorrem no organismo humano (ThermoFisher, 2020).

### 3.1. Cultura celular

O termo “cultura celular” refere-se a um modelo *in vitro* em que há remoção de células de um animal ou humano e ao seu crescimento subsequente num ambiente artificial favorável. Esse ambiente artificial em que as células são cultivadas, consiste em utilizar um recipiente adequado com um meio de cultura que fornece todos os nutrientes essenciais (aminoácidos, hidratos de carbono, vitaminas e minerais), fatores de crescimento, hormonas e gases (O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) e que regula o ambiente físico-químico (pH, pressão osmótica e temperatura). Para a manutenção da linha celular, é essencial

que esta seja mantida em condições assépticas e livre de qualquer tipo de contaminação (ThermoFisher, 2020).

As linhas celulares utilizadas neste projeto foram a PC3 (ATCC® CRL-1435™) e a LNCaP (ATCC® CRL-1740™), ambas linhas celulares humanas de cancro da próstata, adquiridas à ATCC (do inglês, *American Type Culture Collection*), cujas células podem ser visualizadas na Figura 12. A linha celular PC3 foi iniciada em 1979, a partir de uma metástase óssea de um adenocarcinoma da próstata de grau IV, derivado de um homem caucasiano de 62 anos. Estas células apresentam um grande potencial metastático e não expressam recetores hormonais (ATCC, 2021b; Domińska et al., 2016). A linha celular LNCaP foi isolada em 1977 a partir de uma biópsia de um gânglio linfático supraclavicular de um homem caucasiano de 50 anos com diagnóstico confirmado de carcinoma metastático da próstata. Estas células têm um crescimento lento e expressam recetores hormonais (ATCC, 2021a; Domińska et al., 2016).

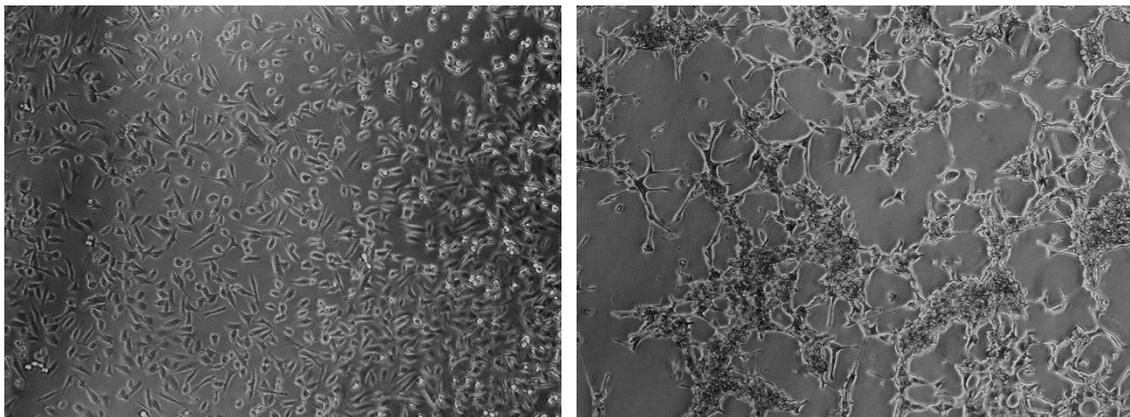


Figura 12: Células PC3 (à esquerda) e células LNCaP (à direita) com ampliação 100X num microscópio ótico invertido (Motic AE31).

Ambas as linhas celulares foram descongeladas, cultivadas em cultura aderente e mantidas, de acordo com o recomendado pela ATCC, numa incubadora (Binder, Germany), com uma atmosfera húmida, composta por 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. O meio de cultura utilizado foi o *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, suplementado com 5 g/L de glucose (Scharlab GL01271000), 100 µM de piruvato de sódio (Gibco 11360), 5% de soro bovino fetal (Sigma F7524) e 1% de antibiótico (Sigma A5955). As células foram testadas regularmente para a presença de *Mycoplasma* e todas as experiências foram realizadas em células com passagem inferior a 50.

Para o desenvolvimento das experiências foi necessário que as células fossem destacadas da superfície aderente e colocadas em suspensão celular. Este processo de destacar as células do frasco iniciou-se com a remoção do meio de cultura. De seguida, as células foram lavadas com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*), com um pH de 7,4. O PBS foi, então, descartado e as células incubadas com 2 mL de solução tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma T-4049), no caso da cultura de células PC3, ou Tryple™ Express (Gibco 12605-028), no caso da cultura de células LNCaP. Após 5 min de incubação a 37°C, as respetivas soluções de dissociação foram inativadas com 5 mL do meio de cultura descrito previamente. Depois de homogeneizar, foi obtida uma suspensão celular resultante. A concentração celular foi determinada recorrendo ao método de exclusão de azul tripano.

O método de exclusão de azul tripano é usado para determinar o número de células viáveis presentes numa suspensão de células. Este método é baseado no princípio de que as células viáveis possuem a membrana celular intacta que não é permeável ao azul tripano, enquanto as células inviáveis apresentam danos na membrana celular que as tornam permeáveis ao corante. Neste método, uma suspensão celular foi misturada com um volume igual de azul tripano (Sigma T0776) na diluição de 1:20 em água ultra-pura e, então, examinada visualmente ao microscópio para determinar se as células incorporaram ou excluíram o corante. Uma célula viável terá um citoplasma claro, enquanto que uma célula inviável terá um citoplasma azul (Strober, 2015; Tavares, 2019). As células foram contadas com recurso a uma câmara de *neubauer* e a um microscópio ótico invertido (Motic AE31) com ampliação 200X. A concentração celular foi determinada através da Equação 1:

$$[\text{Células}] (\text{n}^\circ \text{ células/mL}) = \text{Média (células viáveis nos 4 quadrantes)} \times 2 \times 10\,000$$

Equação 1: Cálculo da concentração de células através do método de exclusão de azul de tripano.

## 3.2. Estabelecimento das culturas celulares 3D

Para estabelecer culturas celulares 3D, foram formados esferoides de células recorrendo a uma junção de dois métodos diferentes: *hanging drop* (Foty, 2011) e *magnetic levitation* (Haisler et al., 2013).

A técnica *hanging drop* permite que células individuais agreguem e formem esferoides na forma de gotícula, devido à ação simultânea da tensão superficial e da força gravitacional (Ryu et al., 2019). Esta técnica é amplamente utilizada e as suas principais vantagens são a preservação da forma e da estrutura das células, o baixo custo, o facto de poder produzir um grande número de esferoides em condições reprodutíveis e não requerer um equipamento específico (Costa et al., 2016). Contudo, esta técnica tem algumas limitações como a fragilidade dos esferoides quando é, posteriormente, acrescentado o meio de cultura e também a dificuldade de transferência dos esferoides para outro suporte.

No método *magnetic levitation*, as células são incubadas com nanopartículas magnéticas compostas por nanopartículas de ouro, óxido de ferro e sequências de peptídeos aderentes às células. Estas nanopartículas vão ser internalizadas na célula através da sua adsorção na membrana plasmática que, conseqüentemente, sofre invaginações. As vesículas carregadas com a nanopartícula fundem-se com os endossomas e lisossomas, que estão dispersos dentro do citosol (Kolosnjaj-Tabi et al., 2013). Após internalização celular, as células com as nanopartículas são sujeitas a uma força magnética que promove a levitação das células contra a gravidade, promovendo o contacto entre as células e levando à agregação celular (Ryu et al., 2019). Este método também é amplamente utilizado e tem vantagens como a rapidez da formação dos esferoides (normalmente demora apenas cerca de 16 h para os esferoides se formarem), o facto de criar estruturas sem a utilização de um substrato com uma proteína artificial e ainda não requerer nenhum meio de cultura especial ou uma concentração mínima de soro (Haisler et al., 2013). Os esferoides formados por este método apresentam estruturas diferentes, contudo, nem sempre é possível criar o esferoide pretendido, ficando muitas vezes agregados de células dispersos.

Tendo em conta estes 2 métodos distintos e as suas limitações, foi utilizada uma estratégia, descrita seguidamente, que permitiu a formação correta dos esferoides, a sua manipulação, manutenção e durabilidade.

O processo iniciou-se com a preparação de um frasco de 25 cm<sup>2</sup> com uma concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. Após aproximadamente 24 h (tempo necessário para as células ficarem aderentes), foram adicionados 60 µL das nanopartículas (*NanoShuttle*<sup>TM</sup>) que se ligam electrostaticamente à membrana plasmática. As células foram depois incubadas durante 24h para incorporarem as nanopartículas.

Decorridas as 24h, as células foram destacadas e contadas pelo método de exclusão de azul tripano, de modo a preparar uma suspensão celular de  $2 \times 10^6$

células/mL. Seguidamente, com recurso ao método *hanging drop*, formaram-se gotas de 100  $\mu$ L de PBS na tampa de uma placa de baixa aderência de 24 poços (Figura 13), com o objetivo de funcionar como “câmara de hidratação”, mantendo uma atmosfera húmida.



Figura 13: Gotas de PBS formadas na tampa de uma placa de 24 poços de baixa aderência.

De seguida, formatam-se gotas de 10  $\mu$ L da suspensão celular no fundo da placa, colocando uma gota por poço. A placa foi, de seguida, invertida e colocada sobre a tampa, com as gotas de PBS (Figura 14).



Figura 14: Placa de 24 poços de baixa aderência invertida, com gotas da suspensão celular formadas no fundo da placa.

As células foram, então, incubadas durante 48 h a 37°C , permitindo a formação natural dos esferoides. Após 24 h, os esferoides puderam ser vistos macroscopicamente (Figura 15). Este dia foi considerado o dia 0.

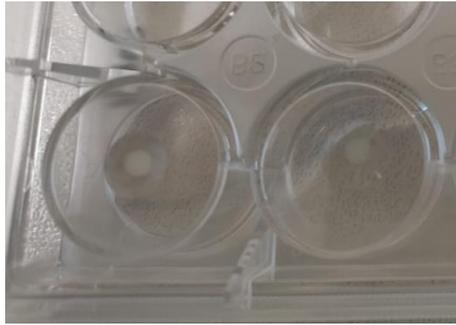


Figura 15: Esferoides visíveis macroscopicamente.

Depois de os esferoides estarem formados, o PBS foi aspirado e a placa de 24 poços de baixa aderência foi colocada sobre uma placa magnética de concentração (Figura 16). A placa magnética vai atrair as células com as nanopartículas e, momentaneamente, os esferoides vão ficar agregados no fundo da placa. Isto vai permitir a colocação do meio de cultura sem desintegrar os esferoides. Foram adicionados 500  $\mu$ L de meio de cultura a cada poço e, de seguida, a placa magnética foi retirada. Os esferoides ficaram, então, suspensos no meio de cultura celular.

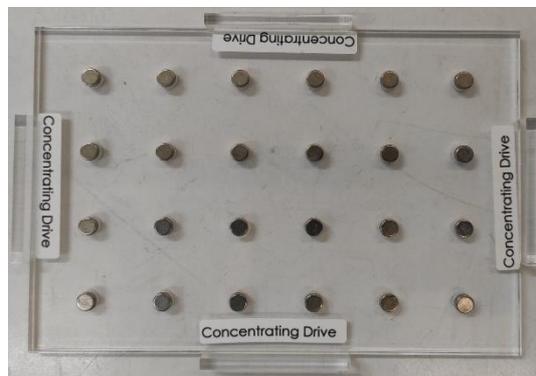


Figura 16: Placa magnética de concentração.

Para realizar algumas experiências foi utilizada uma *MagPen* (Figura 17), uma pequena “caneta” de plástico com um ímã dentro, para retirar o esferoide intacto do poço. Como as células têm nanopartículas incorporadas, o esferoide liga-se à caneta magnética e pode ser transferido para outra placa, para uma lâmina ou para um *ependorf*, retirando o ímã aquando da transferência.



Figura 17: *MagPen*.

Os esferoides permanecem intactos durante aproximadamente 10 dias e as nanopartículas magnéticas têm demonstrado não afetar a proliferação celular e o metabolismo nem induzir uma resposta inflamatória (Haisler et al., 2013; Tavares, 2019).

Na Figura 18 está representado um esquema de todo o processo otimizado de formação dos esferoides.

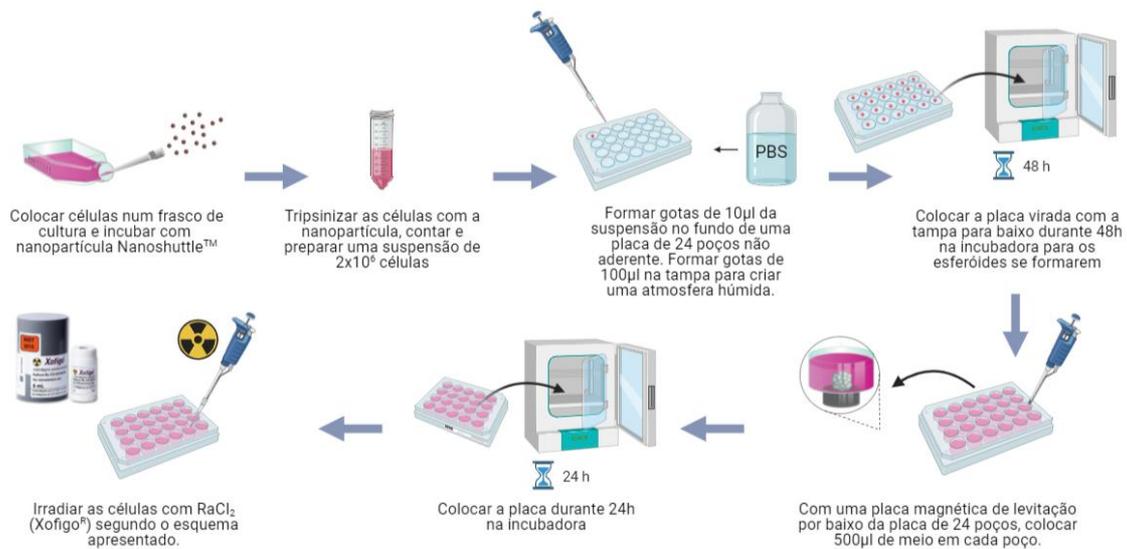


Figura 18: Esquema de todo o procedimento realizado para a formação dos esferoides, recorrendo a uma junção dos métodos *Hanging Drop* e *Magnetic Levitation*.

### 3.3. Determinação da área dos esferoides

Após a irradiação, os esferoides foram mantidos numa incubadora a 37°C durante 8 dias. A cada 24 h, obtiveram-se imagens dos esferoides através do *software MotiC Images Plus 2.0 ML*, incorporado num microscópio ótico invertido (MotiC AE31), com ampliação 40X. A área dos esferoides foi delimitada e posteriormente calculada através do *software ImageJ* (Rasband, W.S., U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Nos casos em que se verificou a fragmentação dos esferoides, a área foi medida através da soma das áreas dos fragmentos resultantes.

### 3.4. Validação do cálculo de dose e irradiação das células com Rádio-223

O principal objetivo deste projeto foi avaliar os efeitos biológicos do rádio-223 nas células de cancro da próstata em modelos 3D. Para cada ensaio, as células, quer estivessem em cultura bidimensional ou em cultura 3D, foram submetidas a irradiação interna por exposição ao rádio-223, através da adição de uma atividade inicial ( $A_0$ ) conhecida. A dose absorvida, baseada na atividade inicial e no tempo de exposição, foi calculada através da Equação 2:

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

Equação 2: Equação do cálculo de dose do rádio-223.

onde  $D$  é a dose absorvida (Gy),  $A_0$  a atividade inicial da fonte radioativa (mCi),  $t$  o tempo de irradiação (s),  $M$  a massa da amostra submetida a irradiação (kg),  $T_i$  o período de semi-desintegração da porção  $i$  da cadeia de decaimento (s),  $\bar{E}_i$  a energia média por desintegração da porção  $i$  da cadeia de decaimento (eV) e  $\alpha_i$  a fração de energia do decaimento. Os valores de  $T_i$ , de  $\bar{E}_i$  e de  $\alpha_i$  estão tabelados e são específicos do radionuclídeo utilizado e da energia depositada (Marques, 2016).

O procedimento de irradiação consiste na adição de um volume de rádio-223, calculado com base na atividade pretendida. O volume é pipetado para os poços e, ao fim do tempo respetivo, o meio com atividade foi retirado e substituído por meio novo.

A Equação 2 foi desenvolvida para o cálculo da dose absorvida após irradiação de células individuais dispersas num volume específico de meio, considerando as variáveis de  $M$ ,  $t$ , e  $A_0$  aplicadas. Como as partículas  $\alpha$  têm um curto alcance, o volume de meio, correspondente à  $M$ , utilizado nas respetivas irradiações para as experiências em 2D foi reduzido e limitado ao estritamente necessário, sendo mantido sempre constante (200  $\mu\text{L}$ ) para todas as experiências. As condições  $A_0$  também permaneceram constantes, sendo apenas variável a condição  $t$ .

As culturas 3D introduziram algumas especificidades no método de irradiação. Como o esferoide teria de ficar suspenso no meio para ser irradiado, o volume teria de ser aumentado para o dobro, de modo que o volume utilizado permitisse que o esferoide ficasse imerso. Para além disso, como se pretendeu utilizar doses mais elevadas, teria de se variar tanto a  $A_0$  como o  $t$ . Assim, para irradiar culturas 3D, iria ser necessário alterar as condições de irradiação inicialmente definidas para culturas bidimensionais.

Para a Equação 2 poder ser utilizada na irradiação em modelos 3D, foi necessário validar a sua aplicabilidade nestes modelos e avaliar se a resposta biológica seria semelhante, variando mais do que uma dimensão na fórmula.

Para o cálculo de dose, a  $A_0$  e o  $t$  são inversamente proporcionais. Isto significa que se um dos parâmetros for incrementado, o outro parâmetro terá de ser reduzido, com o fim de se obter a mesma dose. Assim, a estratégia utilizada para validar a Equação 2 foi verificar se a proporcionalidade inversa se manteria, aumentando o volume do meio para 500  $\mu\text{L}$ . Assim, doses semelhantes (variando os parâmetros  $t$  e  $A_0$ ) teriam de produzir respostas biológicas semelhantes.

Numa primeira fase, para avaliar a resposta biológica, utilizou-se o ensaio SRB, que permitiu medir o conteúdo proteico celular das células irradiadas. O protocolo utilizado encontra-se no tópico 3.4.1 desta dissertação. A irradiação foi efetuada com doses de 0 mGy, de 4 mGy, de 10 mGy e de 20 mGy e criaram-se duas abordagens. Na primeira condição fixou-se o  $t$  em 8 min e variou-se a  $A_0$ , enquanto na segunda condição fixou-se a  $A_0$  da fonte em 0,8  $\mu\text{Ci}$  e fez-se variar o  $t$ . As doses, as atividades iniciais e o tempo de irradiação estão expressos na tabela 1.

Tabela 1: Atividade inicial e tempo de irradiação para irradiar um volume de 500  $\mu\text{L}$  de meio de suspensão celular, para as respectivas doses, segundo as duas abordagens utilizadas: na 1ª abordagem é fixado o  $t$  em 8 min e na 2ª abordagem é fixada a  $A_0$  em 0,8  $\mu\text{Ci}$ .

	<i>Dose (mGy)</i>	$A_0$ ( $\mu\text{Ci}$ )	Tempo (min)
1ª abordagem	4	0,38	8
	10	1	8
	20	2	8
2ª abordagem	4	0,8	3,1
	10	0,8	10,5
	20	0,8	25

De seguida, foi efetuada, também, a validação da Equação 2 com irradiação de células em esferoides. Para isso, utilizaram-se as duas abordagens previamente descritas e variáveis da Tabela 1, no mesmo volume, com a diferença de as células estarem numa estrutura 3D, em vez de suspensão celular. O processo de irradiação nas culturas celulares 3D foi efetuado com a placa magnética de concentração para os esferoides não se desintegrarem.

Para avaliar a resposta biológica da radiação nos modelos 3D, não se pôde recorrer ao ensaio SRB, dadas as características deste método. Assim, utilizou-se um ensaio baseado em sal de tetrazólio, o XTT, que avalia a atividade metabólica celular e permite aferir, indiretamente, a proliferação celular, cujo procedimento pode ser encontrado no tópico 3.4.2 desta dissertação.

Após validação, de modo a avaliar os efeitos do Rádio-223 nos esferoides de CaP, procedeu-se à irradiação dos esferoides de PC3 com doses mais elevadas, em específico de 0 mGy, de 10 mGy, de 20 mGy, de 30 mGy e de 40 mGy, e posterior análise da atividade metabólica celular pelo ensaio XTT. Neste ensaio utilizou-se apenas uma condição com as doses,  $t$  e  $A_0$  expressos na Tabela 2.

Tabela 2: Atividade inicial e tempo de irradiação para irradiar um volume de 500  $\mu\text{L}$  de meio com células em esferoides, para as respetivas doses.

Dose (mGy)	$A_0$ ( $\mu\text{Ci}$ )	Tempo (min)
10	0,5	20
20	0,8	25
30	1	31
40	1,2	35

Com base nos resultados obtidos no ensaio XTT, optou-se por selecionar a dose mais alta em estudo para a realização dos ensaios seguintes.

Para avaliar os efeitos biológicos em relação à proliferação celular, sobrevivência celular, viabilidade celular e morte celular recorreu-se à imunocitoquímica (tópico 3.9), ao ensaio clonogénico (tópico 3.8), à microscopia de fluorescência com marcação tripla com AnV/IP/DAPI (tópico 3.10) e coloração de *May-Grünwald Giemsa* (tópico 3.7), respetivamente.

Todos os ensaios foram realizados 8 dias após a irradiação dos esferoides. Na figura 19 está representada uma linha temporal, desde a formação da gota de células em *hanging drop* até à realização dos ensaios descritos seguidamente. O dia 0 foi considerado o dia de formação do esferoide, onde este já é visível macroscopicamente.

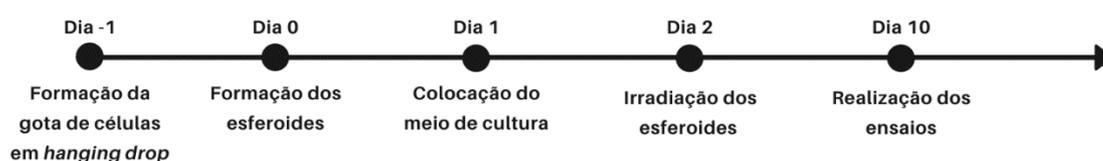


Figura 19: Linha temporal do processo de formação dos esferoides, respetiva irradiação e realização dos ensaios. No dia -1, o processo iniciou-se com a formação das gotas de células em *hanging drop*, no dia 0 verificou-se a formação dos esferoides, no dia 1 foi adicionado o meio de cultura e no dia 2 procedeu-se à irradiação dos esferoides, mantendo-os em cultura durante 8 dias. No dia 10, foram realizados os ensaios para avaliar os efeitos radiobiológicos do rádio-223.

### **3.5. Análise do conteúdo proteico pelo ensaio de SRB**

O ensaio de SRB constitui um marcador de citotoxicidade muito sensível. A SRB é um corante fluorescente que se liga às proteínas em condições ácidas e que, posteriormente, pode ser extraído sob condições básicas. O corante fixado, medido fotometricamente após solubilização, correlaciona-se com o conteúdo proteico. Devido às ligações serem estequiométricas, a quantidade de corante extraída das células é diretamente proporcional à densidade celular, que pode ser extrapolada para medir a proliferação celular (Orellana & Kasinski, 2016; Tavares, 2019).

O ensaio de SRB foi realizado apenas em placas de 24 poços com uma concentração de 50 000 células por poço. O protocolo começa pelo descartar do meio de cultura seguido pela lavagem dos poços com PBS frio, para desacelerar os processos metabólicos e impedir que as células não sofram danos durante a realização do ensaio. A fixação das células nos poços foi feita adicionando uma solução gelada de 1:100 de ácido acético em metanol e colocando, de seguida, a placa no frio durante 45 min. Após a fixação das células, o ácido acético em metanol foi descartado e a placa seca à temperatura ambiente. Após a secagem, foram adicionados 300 µL de SRB (0,4%) a cada poço e as placas foram incubadas no escuro durante 30 min. Seguidamente, retirou-se o excesso de solução de SRB, efetuando-se lavagens com água de modo a remover todo o corante em excesso. Após secagem, o SRB fixado foi dissolvido em 200 µL de Tris-NaOH (10 mM e pH 10) e, posteriormente, foram medidas as absorvâncias a 540 nm, com um filtro de referência de 690 nm, num espectrofotómetro (Perkin Elmer Enspire 2300). Os resultados foram analisados e expressos pela percentagem de inibição da proliferação das células irradiadas, normalizados aos controlos.

### **3.6. Análise da atividade metabólica pelo ensaio XTT**

O ensaio XTT é usado para medir a atividade metabólica celular como um indicador indireto de viabilidade e de proliferação celulares e, conseqüentemente, citotoxicidade. Este ensaio colorimétrico é baseado na redução de XTT, um sal de tetrazólio amarelo carregado negativamente, pelo NADH (dinucleótido de nicotinamida e adenina), produzido na mitocôndria. A redução pelas células metabolicamente ativas vai originar

cristais de formazano de cor laranja. Esse corante formado é solúvel em soluções aquosas e pode ser quantificado através de um espectrofotómetro (McGaw et al., 2014; Paull et al., 1988).

Esta redução extracelular foi realizada pelo transporte de elétrões da cadeia respiratória mitocondrial de uma célula viável, mediada pelo aceitador de elétrões PMS (*N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate - Phenazine methosulfate*) (Kuhn et al., 2003; Louis, 2019). O PMS é um aceitador de elétrões que ajuda a realçar a redução do XTT. Como o PMS reduzido é facilmente oxidado pelo oxigénio, serve de mediador da reação e permite a redução do XTT fora do citoplasma, pois não é permeável à membrana celular (Berridge et al., 2005). A reação do PMS com o XTT está representada na Figura 20.

O ensaio XTT é compatível com as culturas 3D devido ao facto de não ser necessário que as células estejam aderentes para a realização do mesmo (Huyck et al., 2012).

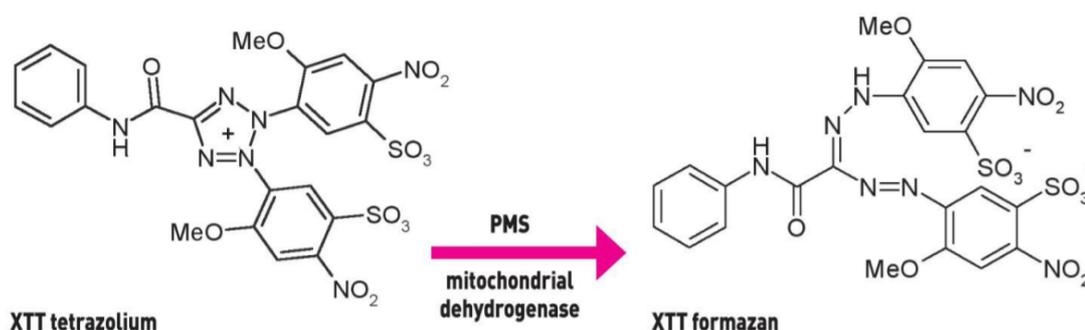


Figura 20: Reação do XTT com o PMS (ITW Reagents, 2021)

Os esferoides foram dissociados em células dispersas, de modo a proceder ao protocolo do ensaio de XTT.

O protocolo do ensaio de XTT iniciou-se com a preparação de uma solução homogénea de reação de XTT e PMS na proporção 50:1, a partir de soluções *stock* previamente preparadas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , e protegidas da luz. As soluções *stock* de XTT, dissolvido em meio de cultura RPMI, foram preparadas na concentração de 1 mg/mL e o PMS, dissolvido em PBS, na concentração de 1,25 mM.

De seguida, foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de solução de reação a cada poço da placa, contendo cada poço um esferoide em 500  $\mu\text{L}$  de meio. Depois, incubou-se a placa,

protegida da luz, a 37°C durante, aproximadamente, 6 a 8 horas, até redução do composto para a cor laranja. Por fim, a absorvância foi medida num espectrofotómetro com um comprimento de onda de 450 nm (Perkin Elmer Enspire 2300).

### **3.7. Estudos de morfologia pelo método de coloração May-Grünwald-Giemsa**

O método de coloração *May-Grünwald-Giemsa* (MGG) é usado para estudar a morfologia celular. O corante *May-Grünwald* contém corantes básicos, como o azul de metileno alcalino e um corante ácido, a eosina. Os corantes básicos carregam cargas positivas, corando os núcleos, devido às cargas negativas dos grupos fosfato das moléculas de ADN e de ARN (Microxpress, n.d.). A eosina cora as áreas básicas no interior das células, tais como, as proteínas de ligação ao ADN (von Knebel Doeberitz & Wentzensen, 2008). A coloração de *Giemsa* torna o efeito da coloração azul-celeste mais proeminente, colorindo todos os componentes celulares (Microxpress, n.d.).

Para realizar a coloração, os esferoides foram dissociados e centrifugados a 2500 rpm, durante 5 min. Em seguida, descartou-se o sobrenadante, o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de PBS e, novamente, centrifugado a 2500 rpm, durante 5 min. Depois da centrifugação, descartou-se novamente o sobrenadante e ressuspenso-se o *pellet* em 50 µL de FBS. De seguida, foi colocada uma gota da suspensão celular com aproximadamente 80 000 células numa lâmina de vidro (Normax 1.5470117C) e foi realizado um esfregaço. O esfregaço foi deixado a secar à temperatura ambiente por, pelo menos, 30 min e, decorrido esse tempo, as células foram fixadas em metanol durante 5 min. Após a fixação, as lâminas foram deixadas secar novamente e, depois de secas, foi feita a coloração das lâminas. Para a coloração, as lâminas foram mergulhadas em primeiro lugar na solução de *May-Grünwald* (Merck 1424) durante 4 min e, subsequentemente, numa solução de *Giemsa* (Merck 9204) a 5%, diluída em PBS (pH=6,8), durante 15 min. Por fim, a lâmina foi lavada com PBS para retirar o excesso de corante e deixada a secar ao ar. As lâminas foram visualizadas e avaliadas num microscópio ótico *Axioskop 2* (Zeiss, Germany), equipado com uma câmara *Axiocam 1Cc3* (Zeiss, Germany). Foram obtidas fotografias representativas e analisadas usando o *software AxioVision* (Zeiss, Germany) para *Windows*.

### 3.8. Ensaio clonogénico

O ensaio clonogénico é um ensaio para avaliação da sobrevivência celular *in vitro* com base na capacidade de uma única célula originar uma colónia de células, ou seja, um conjunto de, pelo menos, 50 células. Este ensaio testa, essencialmente, a capacidade de cada célula da população ser capaz de sofrer divisão “ilimitada” e é considerado o “*gold standard*” para determinar a morte reprodutiva celular, após o tratamento com radiação ionizante (Franken et al., 2006).

A capacidade de as células constituintes dos esferoides sobreviverem a longo prazo foi avaliada 20 dias após a irradiação dos esferoides. Na linha do tempo da Figura 21 estão especificados os tempos decorridos entre a formação dos esferoides e a realização do ensaio clonogénico.



Figura 21: Linha do tempo desde a formação da gota em *hanging drop* até à realização do ensaio clonogénico. No dia -1, o processo iniciou-se com a formação das gotas de células em *hanging drop*, no dia 0 verificou-se a formação dos esferoides, no dia 1 foi adicionado o meio de cultura e no dia 2 procedeu-se à irradiação dos esferoides, mantendo-os depois em cultura durante 8 dias. No dia 10, as células provenientes destes esferoides foram semeadas para a realização do ensaio clonogénico, o qual terminou no para dia 22.

Para tal, procedeu-se à dissociação enzimática dos esferoides no dia 10 e realizou-se a contagem do número total de células por esferoide. Em seguida, semearam-se 1500 células, provenientes de cada esferoide, por poço, em placas de 6 poços aderentes (Sarstedt), juntamente com 3 mL de meio de cultura. As células foram incubadas nas condições ótimas de crescimento durante 10 dias, fazendo a renovação do meio de cultura a cada 3 dias. Após esse tempo, as células foram coradas com o objetivo de possibilitar a contagem das colónias formadas. Para isso, removeu-se o meio de cultura e procedeu-se à lavagem das colónias com 3 mL de PBS, por poço, repetindo novamente a lavagem. De seguida, fixaram-se as colónias adicionando 2 mL de metanol, durante 30 min. Passado esse tempo, descartou-se o metanol, deixaram-

se secar as placas à temperatura ambiente e adicionaram-se 2 mL de uma solução de violeta de cristal a 0,5% em metanol, deixando as placas em repouso durante 10 min. Por fim, aspirou-se o corante em excesso e lavaram-se suavemente as placas por imersão em água tépida. Após secagem completa das placas, procedeu-se à contagem das colónias.

O ensaio clonogénico permite calcular a eficiência da placa (EP) e o fator de sobrevivência celular (FS), de acordo com as Equações 3 e 4, respetivamente (Marques, 2016).

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

Equação 3: Cálculo da eficiência da placa.

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

Equação 4: Cálculo do fator de sobrevivência.

### 3.9. Estudos de expressão de Ki-67 por imunocitoquímica

A imunocitoquímica (ICC) é uma técnica para deteção e visualização de proteínas, ou outros antigénios, em células, usando anticorpos que reconhecem especificamente o alvo de interesse. Esta técnica foi realizada para caracterizar qualitativamente a expressão de Ki-67 nos esferoides de PC3 (*Immunocytochemistry - The Human Protein Atlas*, 2020).

A deteção do antigénio foi feita com um sistema indireto de multímeros livres de biotina, conjugados com peroxidase, num procedimento realizado à temperatura de 36°C.

A inibição da peroxidase endógena foi feita com uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%, diluída em PBS, denominada Inibidor de Peroxidase *OptiView*, por 10 min, seguida pela deteção dos diferentes anticorpos primários com uma mistura de anticorpos secundários

de cabra IgG e IgM anti-rato e IgM anti-coelho (OptiView HQ Universal Linker, Ventana Medical Systems, EUA), conjugados com um hapteno não endógeno, 3-hidroxi-2-quinoxalina (HQ), por 12 min. Após a lavagem das lâminas com PBS, foi colocado o sistema de detecção indireta do multímetro VENTANA DP 200 v1.1 (Ventana Medical Systems, Tucson, USA), livre de biotina e conjugado com peroxidase, por 8 min. Subsequentemente, as lâminas foram montadas e observadas no microscópio ótico Olympus U-D30 (Olympus, Japão), equipado com uma câmara Olympus SC30 (Olympus, Japão). O anticorpo usado e as suas características podem ser encontrados na Tabela 3.

Tabela 3: Anticorpo usado na imunocitoquímica e respetivas características (clone, tempo de incubação, diluição e fornecedor).

Anticorpo	Clone	Tempo de incubação (min)	Diluição	Fornecedor
Ki-67	SP6	20	1:1000	Zytomed Systems, Berlin, Germany

### 3.10. Caracterização da estrutura e viabilidade dos esferoides por microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência é um tipo de microscopia ótica que permite caracterizar o tamanho, morfologia e organização interna do esferoide (Costa et al., 2016). Para além disso, permite também determinar a distribuição de células vivas e mortas no esferoide (Tavares, 2019). A técnica baseia-se no fenómeno de que as moléculas fluorescentes absorvem luz num comprimento de onda e emitem noutra, mais longo (Rosengren & Oscarsson, 2009).

O objetivo do protocolo foi, então, analisar a viabilidade celular através da marcação tripla com Anexina V/Iodeto de Propídio/DAPI.

A anexina V (AnV) é uma proteína anticoagulante que se liga aos fosfolípidos aniônicos, como a fosfatidilserina. Durante a apoptose, ocorre a translocação de

fosfatidilserina para a camada externa da membrana celular e, assim, as células apoptóticas podem ser identificadas através da marcação com AnV. Por outro lado, o iodeto de propídio (IP) é um marcador com a capacidade de se ligar ao ADN da célula. Apesar disso, este marcador não pode passar a bicamada lipídica, sendo apenas capaz de se ligar ao ADN quando a membrana é destruída, o que pode ser verificado quando as células estão em apoptose tardia ou em necrose (Tavares, 2019). O DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) é um fluoróforo específico de ácido nucleico com grande afinidade para o ADN (Estandarte et al., 2016). O DAPI cora seletivamente os núcleos celulares, resultando em imagens fluorescentes brilhantes do núcleo, sem fluorescência detetável do citoplasma. Assim, é usado para identificar e quantificar o ADN (Mora et al., 2020).

O primeiro passo do protocolo consistiu em lavar os esferoides duas vezes com PBS. Após as lavagens, foram adicionados 200  $\mu$ L de tampão de ligação (Immunostep, BB10X). Depois, os esferoides foram submersos numa solução com 2,5  $\mu$ L de AnV (Immunostep, ANXVF-200T) e 1  $\mu$ L de IP (KIT Immunotech, República Checa) e depois incubados durante 15 min no escuro à temperatura ambiente. O passo seguinte consistiu em fixar as células com uma solução de PFA a 4% e incubar mais uma vez no escuro, à temperatura ambiente, durante 10 min. Depois de efetuar estes passos, os esferoides foram cuidadosamente transferidos dos poços para as lâminas com a ajuda da *MagPen*, onde foram montados com o reagente ProLong® Gold Antifade com DAPI (Invitrogen™, P36931) e as lâminas deixadas a secar protegidas da luz. No dia seguinte, as lâminas foram seladas, posteriormente observadas num microscópio de fluorescência Leica DM 4000 B e analisadas no programa Fiji - ImageJ.

### 3.11. Análise estatística

Todos os gráficos, cálculos e análises estatísticas foram realizados com o *software* GraphPad Prism versão 9.2.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para testar a distribuição normal dos dados, aplicou-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para os dados que seguiam uma distribuição normal foram utilizados testes paramétricos. O teste paramétrico ANOVA de dois fatores, com o teste de *Sidak* para as comparações múltiplas, foi utilizado para a comparação de médias entre diferentes grupos de variáveis. Este teste foi usado nos ensaios SRB e XTT, efetuados

com as duas abordagens no capítulo da validação do modelo de irradiação. O teste ANOVA de um fator, com o teste de *Tukey* para comparações múltiplas, foi utilizado para comparar a média entre grupos independentes. Este teste foi usado no ensaio XTT com doses até 40 mGy e em todas as análises da área dos esferoides ao longo do tempo. Os resultados são expressos pela média e desvio-padrão (DP) quando  $n < 12$  e pela média e erro-padrão (EP) quando  $n > 12$ . O valor de  $p$  menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foi considerado estatisticamente significativo.



## 4. Resultados<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Os resultados apresentados ao longo deste capítulo foram obtidos em coautoria com a Mestre Inês Alexandra Marques.



Os resultados obtidos através das técnicas apresentadas nos Materiais e Métodos encontram-se descritos neste capítulo.

## 4.1. Desenvolvimento e Caracterização dos esferoides

O modelo celular 3D de esferoides foi criado e otimizado, recorrendo aos métodos de levitação magnética e *hanging drop*. Assim, uma parte fundamental antes de avaliar os efeitos da radiação, foi avaliar a formação dos esferoides e caracterizá-los. Esta caracterização incluiu a avaliação do seu crescimento e estrutura ao longo dos dias.

Considerou-se o dia 0 o início da formação do esferoide, ou seja, o dia em que as células foram semeadas como gotas. O esferoide foi visível macroscopicamente logo após 24 h da sua formação. Assim, após 48 h e após ter sido colocado o meio, foi possível visualizar o esferoide ao microscópio. A área e estrutura dos esferoides foi avaliada ao longo de 8 dias, recorrendo a um microscópio invertido, cujas imagens representativas da evolução do tamanho e forma estão apresentadas nas Figuras 22-25.

Como é evidenciado na Figura 23, os esferoides de células PC3 apresentam uma forma constantes e exibem desvios-padrão muito reduzidos. Dois dias após a sua formação alcançaram uma área de  $1,55 \pm 0,02 \text{ mm}^2$ , seguindo-se um crescimento significativo ( $p < 0,0001$ ) no dia seguinte, para  $1,8 \pm 0,06 \text{ mm}^2$ . Após o terceiro dia, mantiveram a sua área aproximadamente constante. A área dos esferoides de células PC3 começou a diminuir após 6 dias da sua formação, atingindo ao 9º dia uma área menor do que no 2º dia de formação. Nas imagens representativas da Figura 22 é possível observar que os esferoides mantêm a sua estrutura, formato e mantêm-se intactos durante o tempo avaliado.

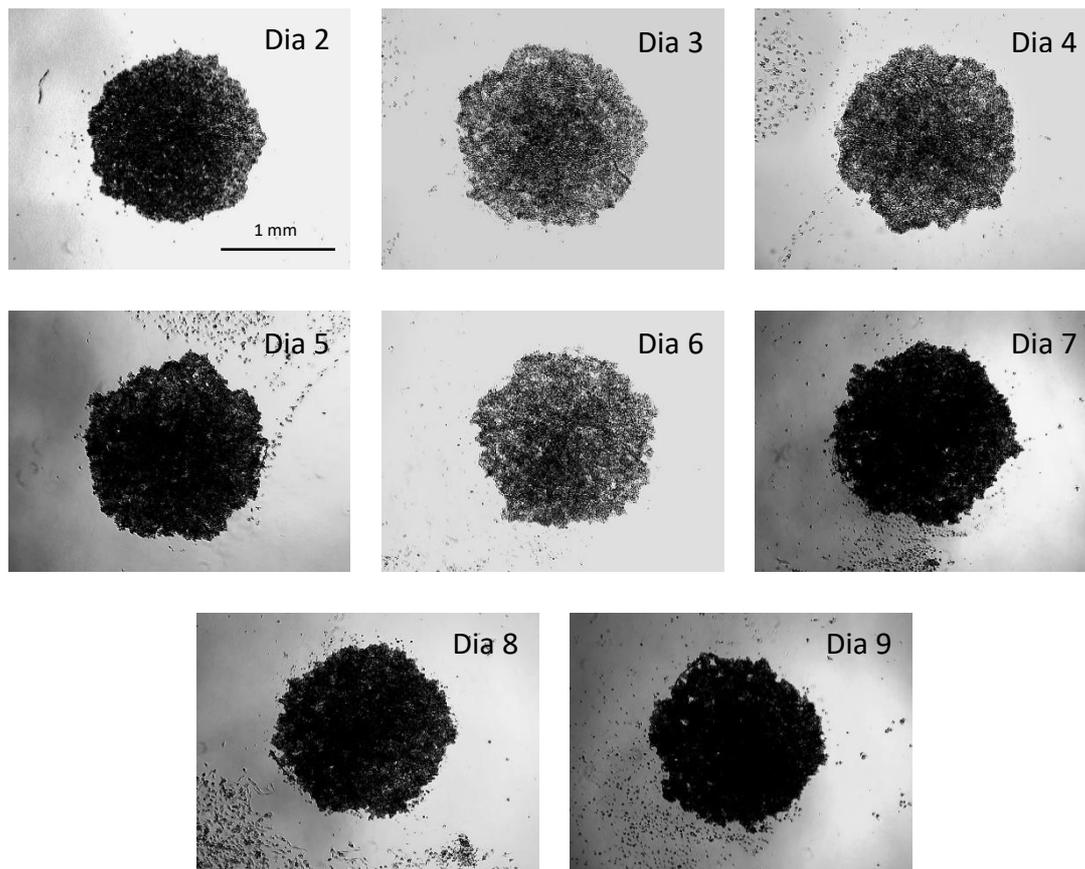


Figura 22: Imagens representativas da evolução dos esferoides de células PC3, em termos de forma e tamanho, durante 9 dias. As imagens foram obtidas recorrendo a um microscópio invertido com uma ampliação de 40X, com apresentação da escala correspondente a 1 mm.

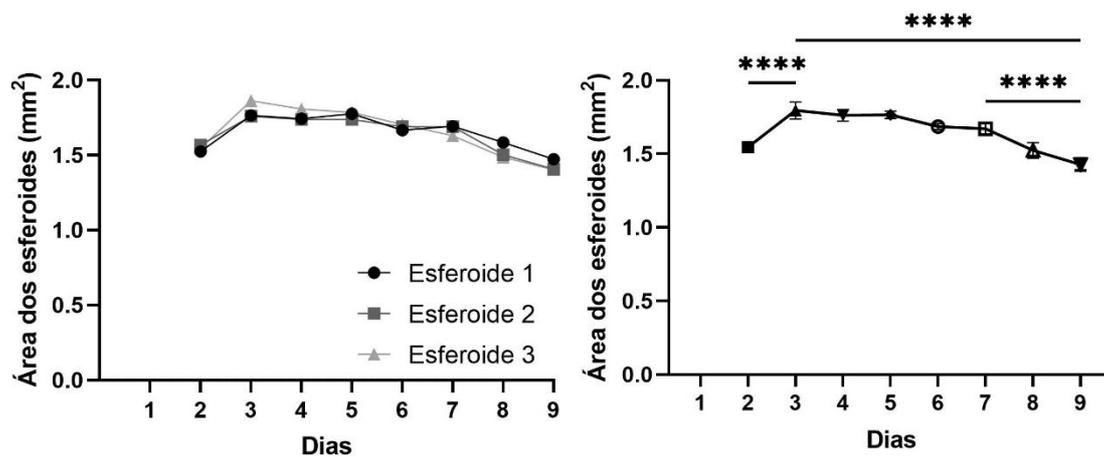


Figura 23: Curva de evolução da área dos esferoides de células PC3 ao longo do tempo. À esquerda estão representadas as curvas da área de cada esferoide e à direita está representada a curva com a média dos 3 esferoides. Os resultados são expressos pela média e desvio-padrão (DP), com n=3. ANOVA de 1 fator (\*\*\*\* p<0,0001).

Os esferoides de células LNCaP exibem um comportamento distinto dos esferoides de células PC3. Na Figura 24 é possível observar imagens representativas da evolução da área e forma dos esferoides de células LNCaP, ao longo do tempo.

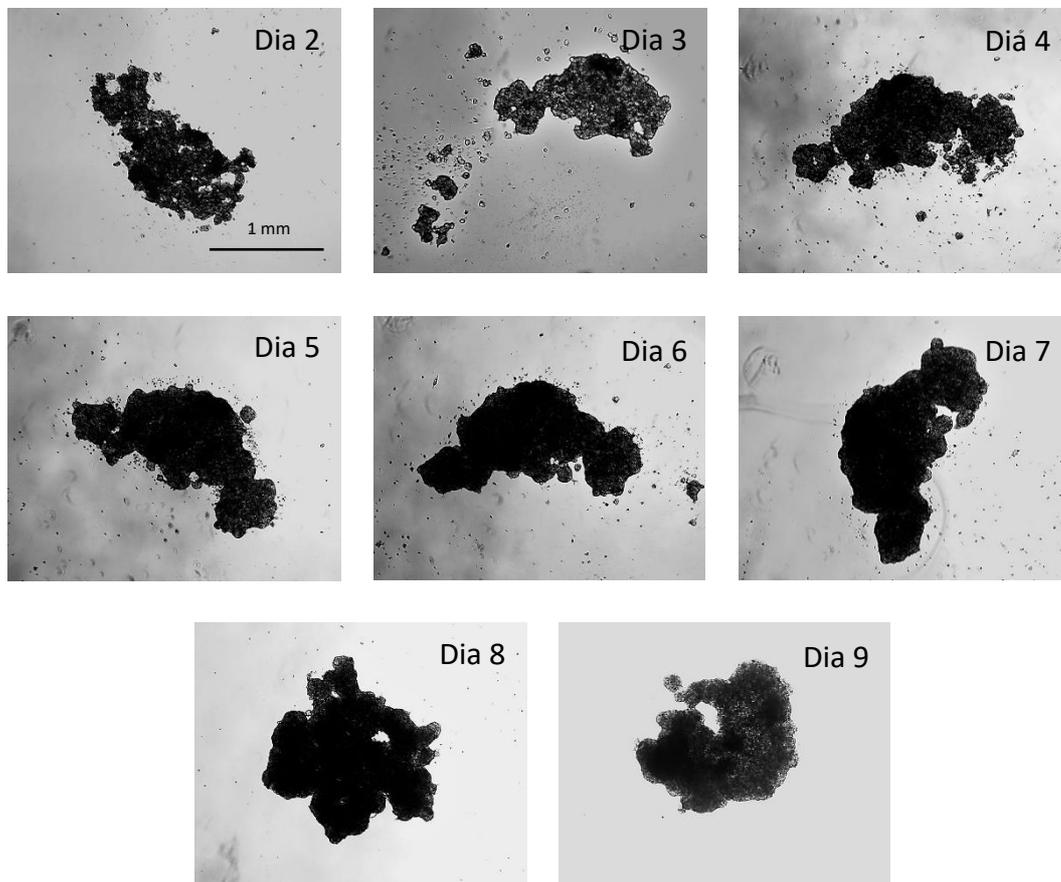


Figura 24: Imagens representativas da *evolução* dos esferoides de células LNCaP, em termos de forma e tamanho, durante 9 dias. As imagens foram *obtidas* recorrendo a um microscópio invertido com uma ampliação de 40X, com apresentação da escala correspondente a 1 mm.

A Figura 24 demonstra que os esferoides de células LNCaP não exibem forma constante, como verificado nos esferoides das células PC3. Cada esferoide de células LNCaP é único, pois adquiriu uma área inicial que variou e uma forma própria. Os esferoides de células LNCaP necessitaram de mais tempo para se formar completamente, comparando com os esferoides de células PC3, não ficando compactos imediatamente ao 2º dia de formação. Como se pode constatar na Figura 25, entre o 2º e o 3º dia da sua formação, o comportamento foi variável, sendo que aumentou a sua

área, como no esferoide 2, ou diminuir como nos esferoides 1 e 3. Entre os dias 3 e 8 todos os esferoides exibiram um comportamento de crescimento. Todos os esferoides obtiveram uma maior área ao 9º dia, comparando com o 2º dia de formação, atingindo uma área média de  $1,18 \pm 0,20 \text{ mm}^2$ .

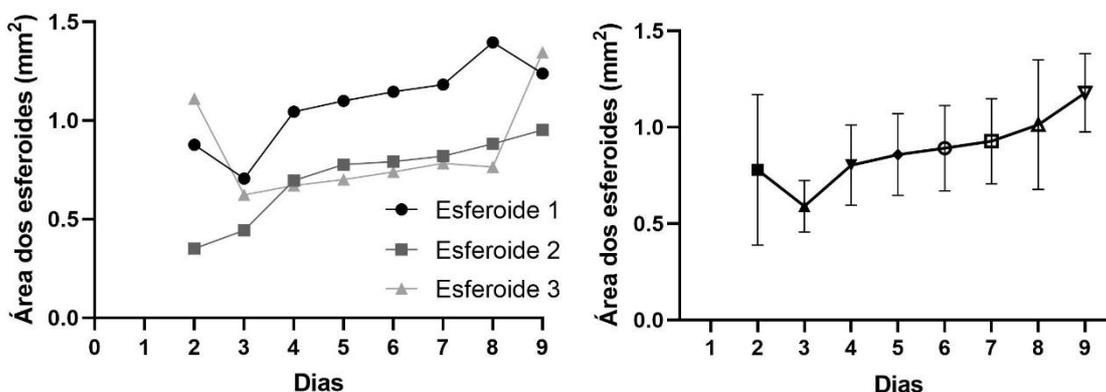


Figura 25: Curva de evolução dos esferoides de células LNCaP ao longo do tempo, tendo em conta as suas áreas. À esquerda estão representadas as curvas da área de cada esferoide e à direita está representada a curva com a média dos 3 esferoides. Os resultados são expressos pela média e desvio-padrão (DP), com  $n=3$ . ANOVA de 1 fator.

Após desenvolvimento e caracterização dos esferoides, procedeu-se à validação do modelo de irradiação para culturas celulares 3D. As experiências seguintes foram apenas realizadas com esferoides de células PC3.

## 4.2. Validação do modelo de irradiação para culturas celulares 3D

O processo de irradiação e o cálculo da dose já tinham sido previamente otimizados e utilizados para a realização de ensaios de radiobiologia em culturas celulares tradicionais bidimensionais, no qual se mantinha constante para as várias doses ou a atividade inicial ( $A_0$ ), ou o tempo de exposição ( $t$ ). A irradiação de modelos celulares tridimensionais (esferoides), devido ao aumento das doses a utilizar, tornou necessário variar ambos os parâmetros de  $A_0$  e  $t$ , para o mesmo ensaio, o que poderia introduzir

variabilidade no estudo. Assim, foi necessário efetuar a adaptação do método de irradiação utilizado nas culturas em 2D para o utilizado para irradiação dos esferoides, validando o cálculo de dose para estes últimos. Para este fim, tal como descrito nos materiais e métodos, utilizaram-se duas abordagens para irradiar as células com doses de 0 mGy, de 4 mGy, de 10 mGy ou de 20 mGy, sendo que na primeira abordagem se fixou o  $t$  em 8 minutos e se variou a  $A_0$ , enquanto na segunda abordagem se fixou a  $A_0$  da fonte em  $0,8 \mu\text{Ci}$  e se fez variar o  $t$ . Para os estudos bidimensionais com a linha celular PC3, as células foram, assim, irradiadas com rádio-223 segundo as duas abordagens descritas acima, e após 8 dias o conteúdo proteico celular foi avaliado através da técnica de SRB. Os resultados de citotoxicidade obtidos através do ensaio de SRB estão representados na Figura 26.

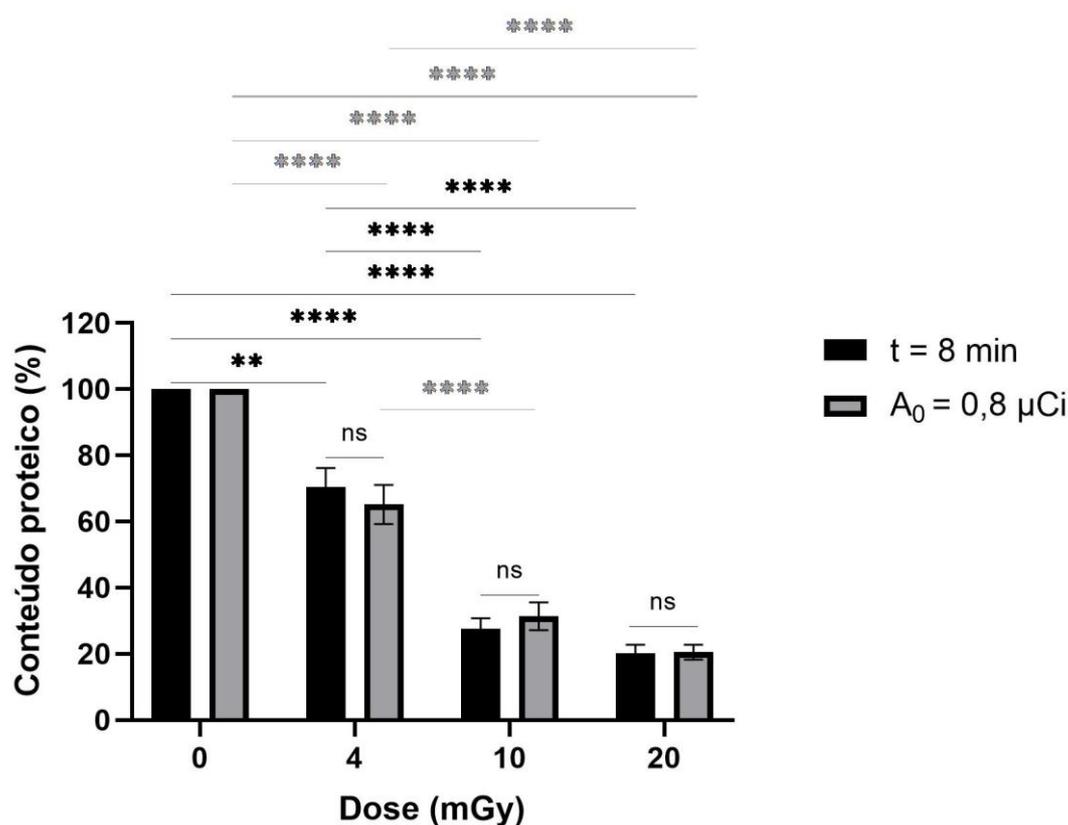


Figura 26: Avaliação do conteúdo proteico celular pelo ensaio SRB nas culturas bidimensionais, realizado 8 dias após a irradiação com 0, 4, 10 e 20 mGy de rádio-223, seguindo duas abordagens: a preto,  $t=8$  min (fixando o  $t$  em 8 minutos e fazendo variar a  $A_0$  para obter a respetiva dose) e a cinzento,  $A_0=0,8 \mu\text{Ci}$  (fixando a  $A_0$  em  $0,8 \mu\text{Ci}$  e fazendo variar o  $t$  para obter a respetiva dose). Os resultados estão normalizados ao controlo, expressos como média e erro-padrão (EP) de, pelo menos, 10 experiências independentes realizadas em triplicado, ANOVA de dois fatores (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Os resultados obtidos demonstraram uma diminuição estatisticamente significativa do conteúdo proteico com o aumento da dose até 10 mGy. Não existem diferenças estatisticamente significativas entre as duas abordagens de irradiação, para todas as doses avaliadas. Assim, a irradiação das células PC3 com 4 mGy, 10 mGy, 20 mGy de rádio-223, para um  $t=8$  min, diminuiu o conteúdo proteico celular para  $70,4\pm 5,7\%$ , para  $27,6\pm 3,0\%$  e para  $20,3\pm 2,5\%$ , respetivamente. A irradiação das células PC3 com 4 mGy, 10 mGy, 20 mGy de rádio-223, para uma  $A_0=0,8 \mu\text{Ci}$ , diminuiu o conteúdo proteico celular para  $65,1\pm 5,8\%$ , para  $31,3\pm 4,2\%$  e para  $20,5\pm 2,2\%$ , respetivamente.

Com o objetivo de verificar se os mesmos efeitos se reproduziam com as culturas celulares 3D, os esferoides foram irradiados com as mesmas doses e mesmas abordagens e os efeitos foram avaliados através da proliferação celular, medida pelo ensaio XTT.

A proliferação celular foi medida indiretamente através da avaliação da atividade metabólica celular, 8 dias após a irradiação dos esferoides com doses de 0 mGy, de 4 mGy, de 10 mGy e de 20 mGy.

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 27 e demonstraram uma diminuição estatisticamente significativa da atividade metabólica celular com o aumento da dose até 20 mGy. Não existem diferenças estatisticamente significativas entre as duas abordagens de irradiação, para todas as doses avaliadas. Assim, a irradiação das células PC3 com 4 mGy, 10 mGy, e 20 mGy de rádio-223, para um  $t=8$  min, diminuiu a atividade metabólica celular para  $77,9\pm 5,7\%$ , para  $76,8\pm 4,3\%$  e para  $80,9\pm 9,8\%$ , respetivamente. A irradiação das células PC3 com 4 mGy, 10 mGy, e 20 mGy de rádio-223, para uma  $A_0=0,8 \mu\text{Ci}$ , diminuiu a atividade metabólica celular para  $80,6\pm 8,3\%$ , para  $82,7\pm 2,8\%$  e para  $87,5\pm 5,1\%$ , respetivamente.

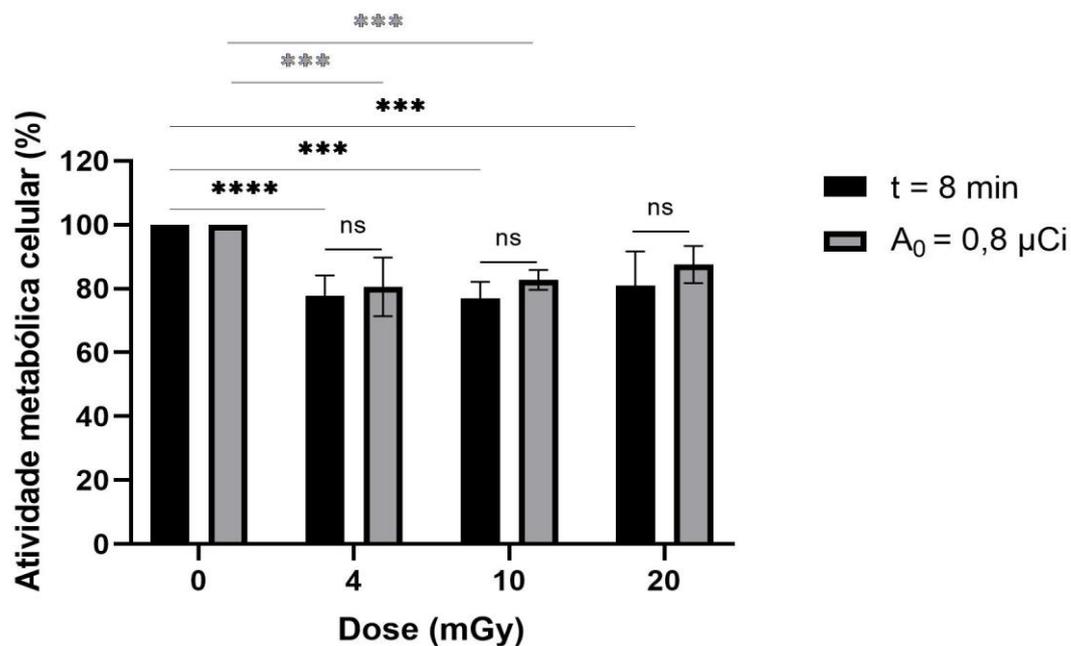


Figura 27: Avaliação da atividade metabólica celular pelo ensaio XTT nos esferoides, realizado 8 dias após a irradiação com rádio-223 com doses de 0, 4, 10 e 20 mGy, segundo as duas abordagens: a preto,  $t=8$  min (fixando o tempo em 8 minutos e fazendo variar a atividade inicial para obter a respetiva dose) e a cinzento,  $A_0=0,8$   $\mu\text{Ci}$  (fixando a atividade inicial em  $0,8$   $\mu\text{Ci}$  e fazendo variar o tempo para obter a respetiva dose). Os resultados estão normalizados ao controlo, expressos como média e desvio-padrão (DP) e com pelo menos 3 experiências independentes realizadas em duplicado. ANOVA de dois fatores (\*\*\*\*  $p<0,0001$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ).

### 4.3. Efeitos radiobiológicos do Rádio-223 em esferoides PC3

Após a validação do modelo de irradiação para culturas celulares 3D, procedeu-se à avaliação dos efeitos radiobiológicos do rádio-223. Assim, várias experiências foram conduzidas com os esferoides de células PC3, nomeadamente a avaliação do efeito do rádio-223 na forma e na área dos esferoides, na proliferação celular com recurso ao ensaio XTT e à imunohistoquímica com o marcador Ki-67, na morfologia celular pela coloração *May-Grünwald-Giemsa*, na sobrevivência celular pelo ensaio clonogénico, assim como na viabilidade e no perfil de morte celulares pela marcação com AnV/IP/DAPI.

### 4.3.1. Estrutura do esferoide

Os esferoides foram irradiados com uma dose de 40 mGy de rádio-223 e foram obtidas imagens do esferoide imediatamente após a irradiação (dia 2), nos 4 dias seguintes e no 7º dia após a irradiação (dia 9). As imagens representativas apresentadas na Figura 28 evidenciam a evolução do esferoide ao longo dos dias referidos.

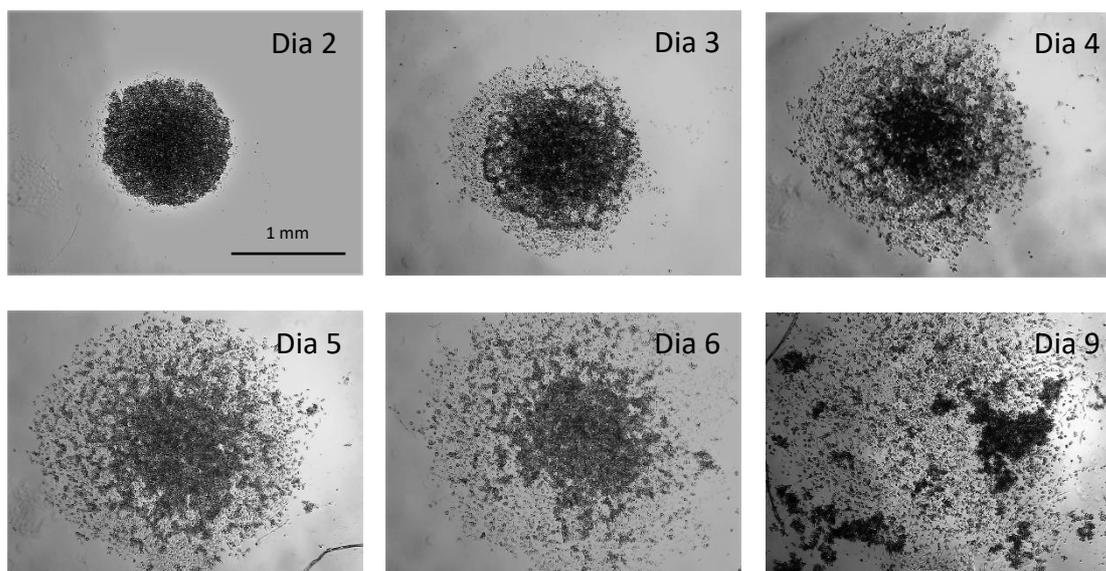


Figura 28: Imagens representativas da forma e crescimento dos esferoides de células PC3 após irradiação com 40 mGy de rádio-223. As imagens foram obtidas imediatamente após a irradiação (dia 2) e ao longo dos dias 3, 4, 5, 6 e 9, depois da irradiação. As imagens foram recolhidas recorrendo a um microscópio invertido com uma ampliação de 40X, com apresentação da escala correspondente a 1 mm.

A Figura 28 evidencia a desintegração dos esferoides de células PC3 como consequência da irradiação com rádio-223. Ao longo dos dias verificou-se o aumento gradual da desintegração dos esferoides, até se verificarem apenas pequenos agregados de células e células dispersas, como é visível na imagem do dia 9 da Figura 28. A Figura 29 representa a evolução da área do esferoide.

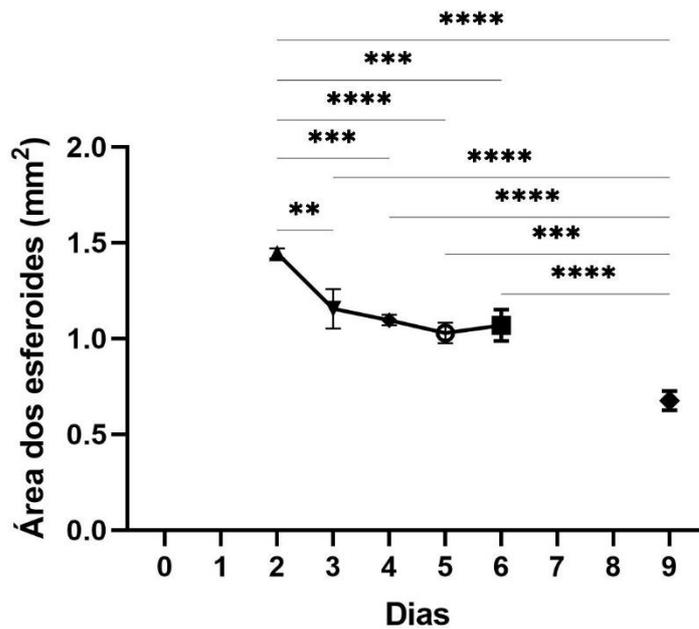


Figura 29: Curva de evolução da área dos esferoides de células PC3, durante 7 dias após irradiação com 40 mGy de rádio-223. Os resultados são expressos pela média e desvio-padrão (DP), com  $n=3$ . ANOVA de 1 fator (\*\*\*\*  $p<0,0001$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ; \*\*  $p<0,01$ ).

Os resultados evidenciados na Figura 29, mostram que a área dos esferoides – aqui definidos como a parte intacta, ou seja, o núcleo (*core*) deste - vai diminuindo ao longo do tempo. Após 24 h da irradiação (dia 3), a sua área diminuiu  $30\pm 4,8\%$  ( $p<0,0001$ ), em comparação com a área do mesmo ao dia 2. No 7º dia após a irradiação (dia 9), verificou-se que o esferoide se fragmentou em pequenos agregados de células, sendo que neste dia já não é possível observar um núcleo, mas sim agregados dispersos. Assim, a área calculada no dia 9 é a soma das áreas desses pequenos agregados de células, correspondente a  $50\pm 4,5\%$  ( $p<0,0001$ ) da área inicial do esferoide.

A Figura 30 apresenta a comparação entre as curvas de evolução dos esferoides controlo e irradiados com 40 mGy de rádio-223.

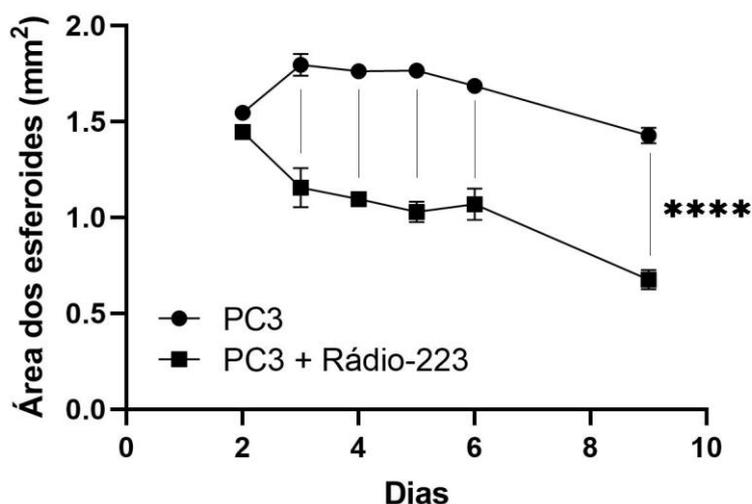


Figura 30: Curvas de evolução da área dos esferoide de células PC3, durante 7 dias após irradiação: controlo e irradiados com 40 mGy de rádio-223. Os resultados são expressos pela média e desvio-padrão (DP), com  $n=3$ . O dia 0 representa o dia da formação do esferoide. ANOVA de 1 fator (\*\*\*\*  $p<0,0001$ ).

A área dos esferoide controlo aumentou para  $1,80\pm 0,05\text{ mm}^2$  no dia 3 em comparação com o dia 2, onde este media  $1,54\pm 0,02\text{ mm}^2$ . Em contraste, no dia 3, os esferoide irradiados com 40 mGy diminuíram a sua área para  $1,15\pm 0,10\text{ mm}^2$ , em comparação com a área de  $1,44\pm 0,02\text{ mm}^2$  verificada no dia 2. Assim, os esferoide controlo apresentaram uma área significativamente maior ( $p<0,0001$ ) no dia 3 que os esferoide irradiados com 40 mGy. No dia 9, a diferença entre as áreas dos esferoide manteve-se significativa ( $p<0,0001$ ), sendo que os esferoide controlo apresentaram uma área de  $1,40\pm 0,04\text{ mm}^2$  e os esferoide irradiados uma área de  $0,67\pm 0,05\text{ mm}^2$ .

#### 4.3.2. Proliferação celular

A exposição à radiação ionizante pode afetar a proliferação celular, o que permite a utilização deste indicador para avaliar os efeitos radiobiológicos do rádio-223.

Deste modo, para estudar os efeitos da irradiação nas células que compõem o esferoide foram realizados os ensaios de XTT e de imunohistoquímica com o marcador Ki-67. Os resultados relativos à avaliação da proliferação celular, medida indiretamente pelo ensaio de XTT, estão apresentados na Figura 31.

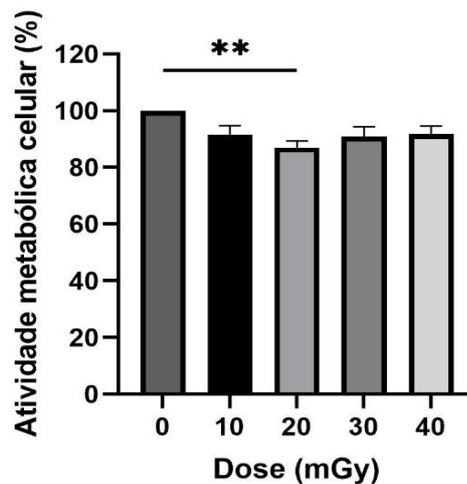


Figura 31: Avaliação da atividade metabólica celular pelo ensaio XTT em esferoides de células PC3, realizado 8 dias após a irradiação com rádio-223, com doses de 0, 10, 20, 30 e 40 mGy. Os resultados estão normalizados ao controlo, expressos como média e erro-padrão (EP), com pelo menos 4 experiências independentes realizadas em quadruplicado. ANOVA de 2 fatores (\*\*  $p < 0,01$ ).

Em geral, verificou-se uma tendência para a diminuição da atividade metabólica em comparação com o controlo não irradiado, contudo, não se verificaram diferenças em função do aumento da dose até 40 mGy. Esta diminuição da percentagem de atividade metabólica foi estatisticamente significativa para a dose de 20 mGy, sendo que quando o esferoide foi exposto a 20 mGy de rádio-223 ocorreu uma diminuição significativa para  $87,0 \pm 2,3\%$  ( $p < 0,01$  em comparação com o controlo). Para as doses de 30 mGy e de 40 mGy, verificou-se que a atividade metabólica diminuiu para  $91,0 \pm 3,3\%$  e  $91,7 \pm 3,3\%$ .

Para caracterizar qualitativamente a expressão de um marcador de proliferação celular, o Ki-67, foi realizada imunohistoquímica. A Figura 32 apresenta imagens representativas da marcação com Ki-67 de esferoides controlo e de esferoides irradiados com 40 mGy de rádio-223, 8 dias após tratamento. A coloração a azul é hematoxilina para visualização do núcleo e a coloração a castanho é o marcador.

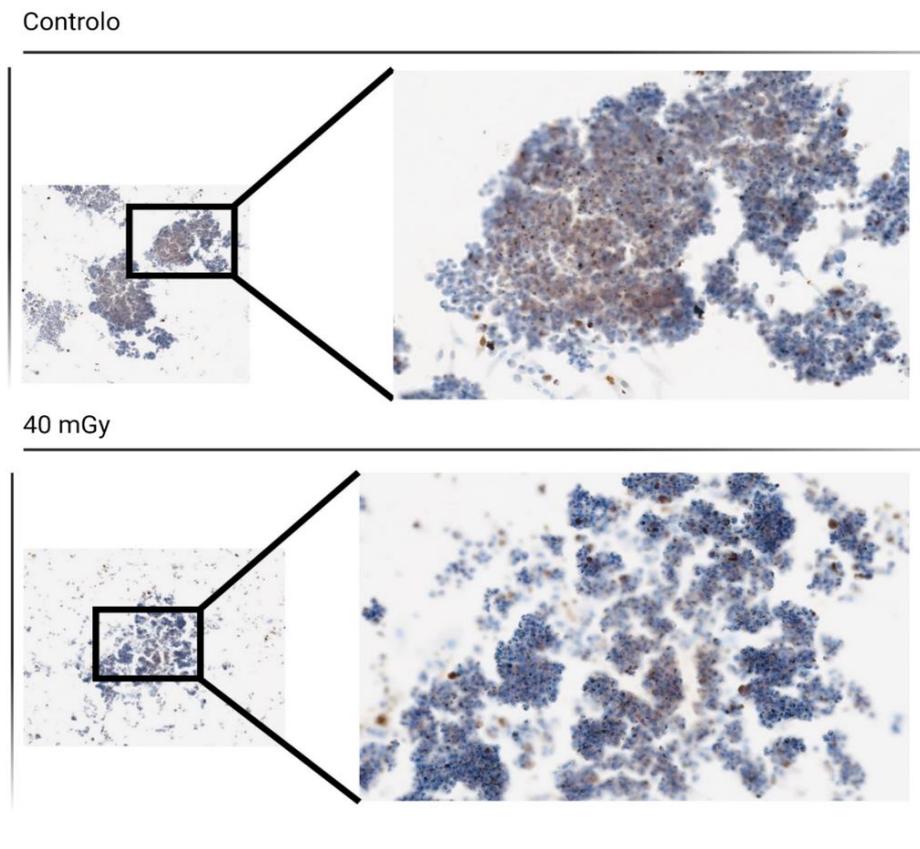


Figura 32: Imunohistoquímica em esferoides, com marcação com Ki-67. A imagem a) corresponde à marcação no esferoide controlo e a imagem b) à marcação no esferoide irradiado com uma dose de 40 mGy de rádio-223. A coloração a azul é hematoxilina para visualização do núcleo e a coloração a castanho é o marcador. As imagens foram recolhidas recorrendo a um microscópio ótico com ampliação 20X e 100X.

Comparando qualitativamente os esferoides controlo com os esferoides irradiados (Figura 32), é visível uma diminuição da expressão de Ki-67. Para além disso, pode-se observar que o esferoide irradiado se encontra mais desintegrado que o esferoide controlo. O esferoide controlo exhibe, ainda, uma marcação mais intensa no centro do esferoide pois, devido à maior compactação, o número de células é maior.

### 4.3.3. Morfologia celular

Para avaliar os efeitos do rádio-223 na morfologia celular, foi realizada, também, a caracterização morfológica das células que constituem os esferoides. A caracterização

incluiu quer os esferoides controlo como os esferoides irradiados com 40 mGy de rádio-223, recorrendo à coloração por *May-Grünwald-Giemsa*. Na Figura 33 podem ser observadas 4 imagens representativas de cada condição.

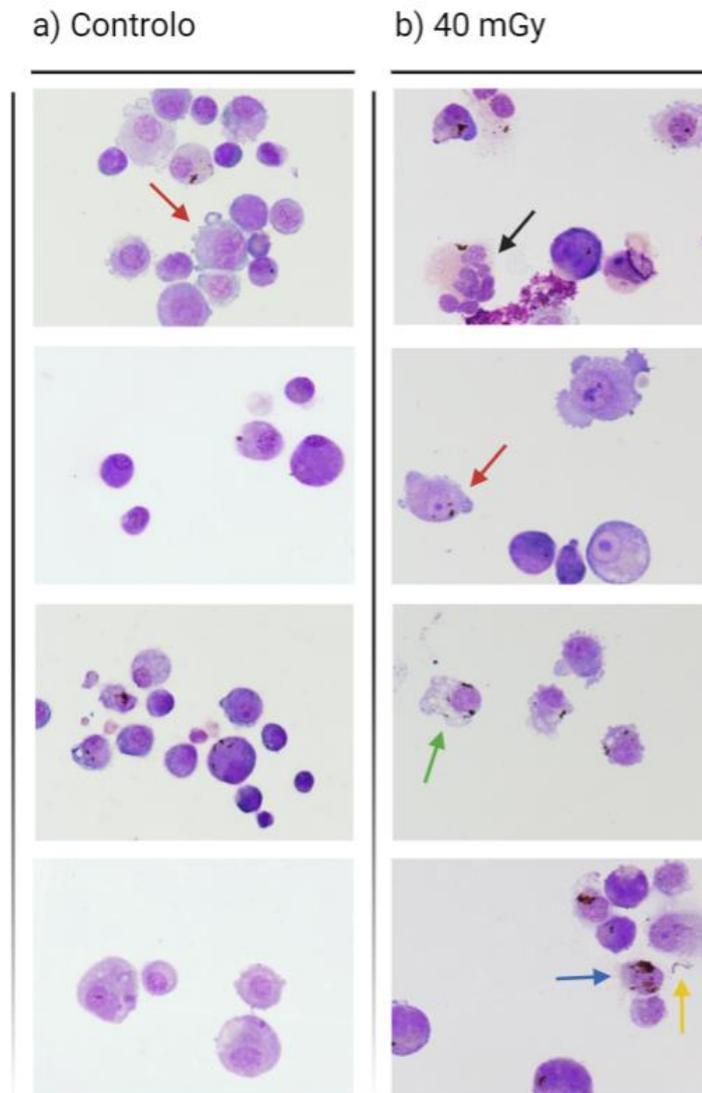


Figura 33: Imagens representativas de características morfológicas das células de esferoides PC3, com coloração por *May-Grünwald-Giemsa*. O conjunto de imagens a) corresponde a células de esferoides controlo não irradiados e o conjunto de imagens b) corresponde a células de esferoides após a irradiação com 40 mGy de rádio-223. As setas indicam evidências morfológicas compatíveis com a morte celular do tipo apoptose e necrose. A seta azul corresponde a fragmentação do núcleo, a seta verde corresponde a vacuolização citoplasmática, a seta vermelha a *blebbing*, a seta preta a células multinucleadas e a célula amarela a extravasamento do citoplasma. As imagens foram obtidas recorrendo a um microscópio ótico com uma ampliação de 400X.

Observa-se que as células irradiadas apresentam mais evidências morfológicas compatíveis com a morte celular do que as células controle, que são mais arredondadas. As células controle apresentam uma membrana íntegra, sem evidências de fragmentação nuclear, compatível com células viáveis. Pontualmente, nas células controle, é possível observar algumas células com *blebbing*. Em contraste, nas células irradiadas é possível observar eventos compatíveis com apoptose, como o *blebbing*, fragmentação do núcleo e células multinucleadas, mas também é possível observar células em necrose, com vacuolização citoplasmática e extravasamento do citoplasma.

### 4.3.4. Sobrevivência celular

Para avaliar a sobrevivência celular, foi realizado o ensaio mais amplamente utilizado para estudar a sobrevivência celular em resposta à irradiação, o ensaio clonogénico. Para a realização deste ensaio, utilizaram-se células de esferoides cultivados após irradiação. Em concordância com as experiências anteriores, foi utilizada apenas a dose de 40 mGy.

A eficiência da placa foi calculada para cada uma das experiências realizadas, sendo o resultado, para  $n=3$ , de  $10,2 \pm 0,5\%$ . O fator de sobrevivência não foi calculado pois não ocorreu formação de colónias em nenhuma das experiências realizadas. A Figura 34 mostra uma imagem representativa de uma placa do ensaio clonogénico, onde é possível observar as colónias formadas para os poços controle e nenhuma colónia formada para os poços onde se semearam células expostas ao rádio-223. De modo semelhante, não se observou formação de colónias em nenhuma das outras duas placas referentes às restantes experiências independentes.

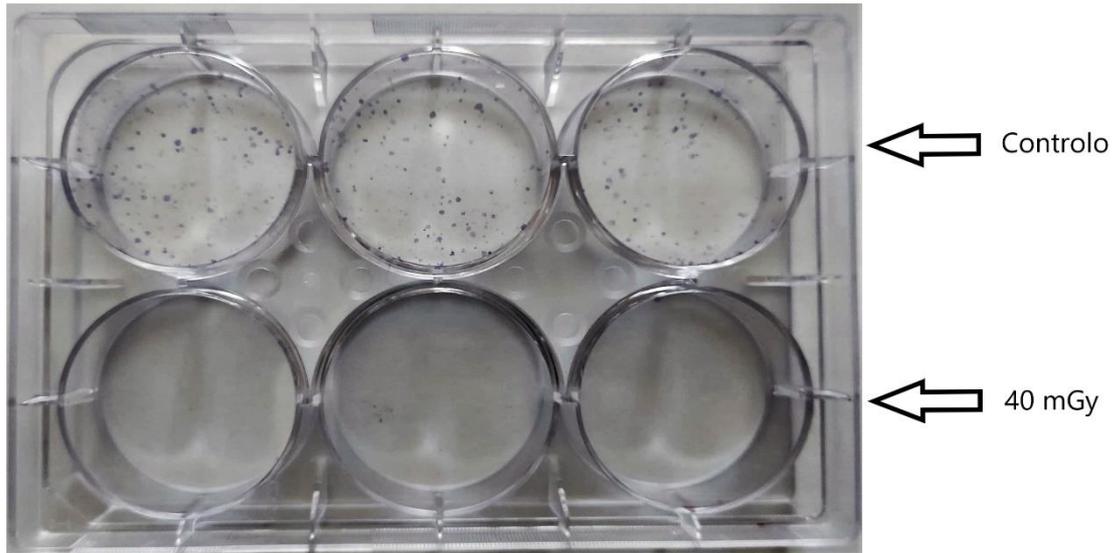


Figura 34: Imagem representativa de uma placa onde foi realizado ensaio clonogénico. Os 3 poços de cima correspondem ao controlo e os 3 poços de baixo correspondem aos poços de células irradiadas com 40 mGy de rádio-223.

#### 4.3.5. Viabilidade e morte celular

Por último, a viabilidade celular e as vias de morte celular foram avaliadas qualitativamente por microscopia de fluorescência, através da marcação tripla com Anexina V, Iodeto de Propídio e DAPI (AnV/IP/DAPI). A Figura 35 apresenta imagens representativas obtidas para a condição controlo e para a condição de irradiação com 40 mGy de rádio-223, sendo que a coloração azul representa a marcação com DAPI e a coloração verde representa a marcação com Anexina V. Não se obteve qualquer marcação com Iodeto de Propídio.

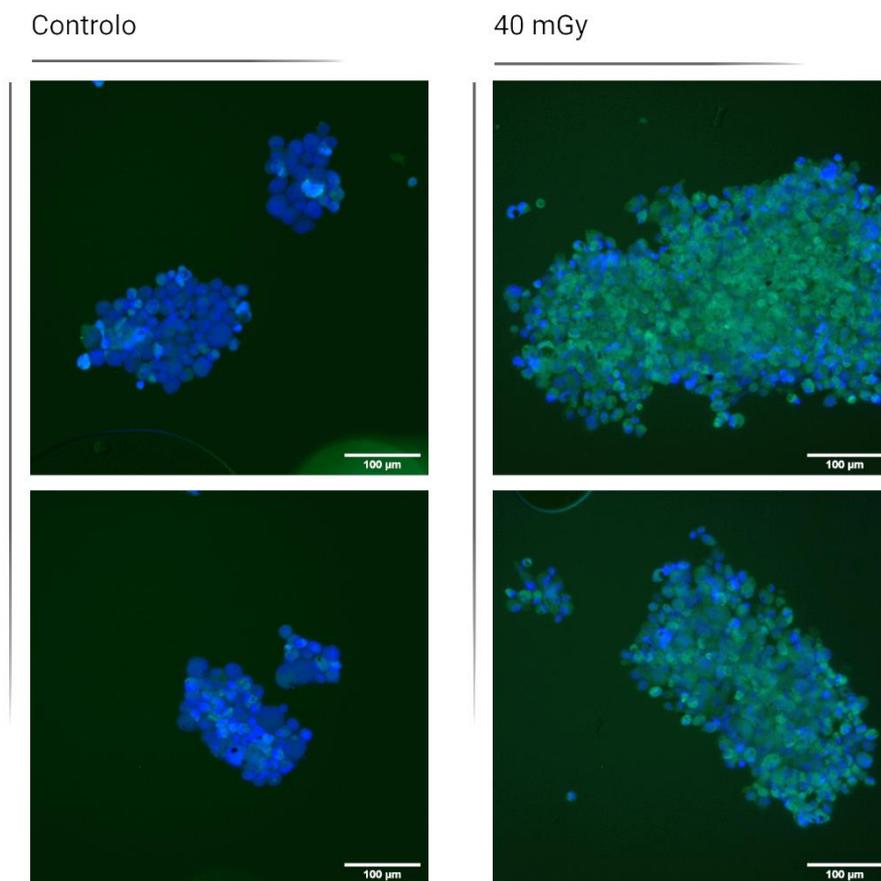


Figura 35: Imagens representativas de esferoides de células PC3, marcados com Anexina V, Iodeto de Propídio e DAPI. As imagens representam uma fusão das duas técnicas e foram obtidas com recurso a um microscópio de fluorescência com ampliação 100X. A coloração azul representa a marcação com DAPI e a coloração verde representa a marcação com Anexina V. Não se obteve qualquer marcação com Iodeto de Propídio.

É possível observar partes intactas dos esferoides, quer na condição controlo quer na condição de irradiação. Em ambas as condições, observou-se a marcação com DAPI, a azul, que marca o ADN das células. Nos esferoides irradiados observou-se também a marcação com Anexina V, que está representada a verde. A Anexina V é um marcador de apoptose, logo, a imagem do esferoide irradiado sugere perda de viabilidade e indução de morte celular por apoptose. Observou-se, também, alguma marcação inespecífica.

## 5. Discussão



O CaP continua a ser uma das principais causas de morte em todo o mundo e torna-se urgente o estudo dos mecanismos subjacentes a esta patologia e o desenvolvimento de novas terapias. O CaP resistente à castração é considerado um estado incurável da doença, sendo que uma grande percentagem de doentes neste estado letal desenvolve metástases ósseas, alcançando o estágio designado por carcinoma da próstata metastático resistente à castração (mCRPC). Um estudo realizado com 1712 doentes entre 2003 e 2015 revelou que o tempo médio de sobrevivência após a evolução para CRPC para doentes, com e sem metástases, foi de 13,2 meses e 23,2 meses, respetivamente (Aly *et al.*, 2020).

As metástases ósseas causam dor intensa e eventos esqueléticos sintomáticos, como a compressão da medula espinhal e fraturas. No ambiente ósseo, os osteoblastos promovem o crescimento das células do CaP (Cha *et al.*, 2017). Assim, a atividade e proliferação dos osteoblastos aumenta, resultando na formação de metástases osteoblásticas, que são o alvo do rádio-223 (Cha *et al.*, 2017).

A absorção do dicloreto de rádio ( $^{223}\text{RaCl}_2$ ), após administração intravenosa, assemelha-se à absorção de cálcio, a nível ósseo. Assim, a sua biodistribuição ocorre para locais dentro do esqueleto que normalmente metabolizam o cálcio durante a remodelação do osso e, conseqüentemente, têm como alvo as metástases ósseas (Gallicchio *et al.*, 2019). Após um tratamento de seis administrações com 0,05 MBq/kg de  $^{223}\text{RaCl}_2$ , a dose de radiação  $\alpha$  absorvida no endóstio é de cerca de 16 Gy e a dose absorvida correspondente na medula óssea é de aproximadamente 1,5 Gy (Knut & Ajit, 2016).

O rádio-223 tem alta eficiência biológica devido à sua curta distância de penetração, minimizando os danos celulares no tecido saudável circundante. No entanto, o efeito relativo à eliminação do tumor está limitado a uma distância muito curta no osso. A morte celular devida ao efeito deste radioisótopo está relacionada com as quebras irreparáveis na cadeia dupla de ADN devido ao seu elevado LET - 100 keV/ $\mu\text{m}$  (Gallicchio *et al.*, 2019; Knut & Ajit, 2016).

O rádio-223 foi, então, o quinto fármaco a ser aprovado para mCRPC desde 2010 e é uma das terapias contra o mCRPC que estende a sobrevivência global, tendo como alvo exclusivamente as metástases ósseas (Cha *et al.*, 2017; Gross-Goupil *et al.*, 2020). Contudo, os efeitos do rádio-223 nas metástases ósseas ainda não estão completamente compreendidos. Num pequeno estudo (n = 14), com doentes que realizaram seis ciclos mensais de terapia com rádio-223 (50 kBq/kg de massa corporal), 83% dos doentes com mCRPC tiveram uma captação reduzida do rádio-223 pós-

tratamento em lesões com captação inicial elevada. 91% dos doentes desenvolveram novas metástases ou agravamento das mesmas, com uma grande proliferação, sugerindo um efeito reduzido em zonas do tumor que não estão cercadas por osteoblastos (Cha *et al.*, 2017; Nome *et al.*, 2015). Em outro estudo (n = 51), com doentes sob as mesmas condições do estudo anterior, a resposta óssea (número de lesões metastáticas) após 3 meses (após 3 ciclos) de tratamento foi melhor em 22% dos doentes, tendo estabilizado em 53% dos doentes e tendo sofrido agravamento em 25% dos doentes. Em relação à dor causada pelas metástases ósseas, 67% dos doentes apresentaram benefício clínico (Cha *et al.*, 2017; Keizman *et al.*, 2016).

Numa tentativa de perceber melhor os mecanismos subjacentes ao efeito antitumoral do rádio-223, um estudo recente conduzido no Instituto de Biofísica da FMUC pela nossa equipa, avaliou o perfil cinético e os efeitos do rádio-223 nas linhas celulares PC3 e LNCaP. Os resultados sugerem uma internalização do rádio-223 em ambas as linhas celulares, conduzindo a uma diminuição da sobrevivência e da proliferação celulares e a um aumento das lesões no ADN (Marques *et al.*, 2021). Este estudo foi realizado em culturas celulares bidimensionais (2D) como prova de conceito, para fazer face à escassez de estudos pré-clínicos disponíveis na literatura até à data. Contudo, posteriormente pretendeu-se avaliar o efeito do rádio-223 num modelo mais complexo que possa vir a ser representativo do microambiente do nicho metastático. Embora as culturas de células em 2D sejam muitas vezes suficientes para analisar as mudanças no comportamento celular em resposta à radiação, as conexões entre as células e entre as células e a MEC não são tidas em conta, não permitindo criar o ambiente de nicho metastático (Kapałczyńska *et al.*, 2018).

Assim, a cultura de células tumorais em esferoide serve como ferramenta predominante para investigar os reguladores do microambiente do tumor e a capacidade de resposta da terapêutica associada com gradientes metabólicos e proliferativos. Contudo, apesar do progresso tecnológico que simplificou significativamente a produção e análise de esferoides, a aparente complexidade da abordagem tridimensional atrasou a sua adoção em muitos laboratórios (Mittler *et al.*, 2017).

Desta forma, com este estudo, pretendeu-se criar e otimizar um modelo 3D de CaP e, depois de este estar estabelecido e caracterizado, irradiar os esferoides com rádio-223 para avaliar a sua citotoxicidade.

Os esferoides de CaP foram estabelecidos através da utilização de um protocolo otimizado a partir de duas metodologias amplamente utilizadas, a técnica de *hanging drop* e o modelo de levitação magnética. Estas duas técnicas combinam campos

magnéticos com gravidade, dois conceitos físicos que permitiram o desenvolvimento de um protocolo que se destacou pela sua eficácia. Através do protocolo desenvolvido, criaram-se esferoides com as condições necessárias para a sua manutenção, irradiação e transferência. O uso de nanopartículas facilita a fixação do esferoide e a manipulação do mesmo e impede que este se desintegre com facilidade. Paralelamente, o método de formação do esferoide em gota permite produzir rapidamente e com uma grande taxa de sucesso um esferoide compacto, passível de ser observado ao microscópio. Para além disso, o número de células utilizado no método *hanging drop* corresponde a 20% do número de células utilizado no método *magnetic levitation*, permitindo criar esferoides mais pequenos. A necessidade de criar esferoides pequenos sem zonas necróticas foi reportada anteriormente pela nossa equipa e é conseguida através deste método (Tavares, 2019).

Esse mesmo estudo reportou que as nanopartículas adicionadas às células não alteram a atividade metabólica nem a proliferação celular ao fim de 8 dias, comparando com o controlo (Tavares, 2019). Foi também demonstrado que a exposição ao campo magnético (30-500 Gauss) não tem efeito na proliferação celular e metabolismo (Haisler *et al.*, 2013). Assim, as nanopartículas são passíveis de ser utilizadas na otimização da técnica de formação dos esferoides, sem interferir com o metabolismo normal das células.

Em comparação com as células em cultura tradicional 2D, os esferoides têm uma vantagem importante, o seu tamanho maior. Assim, frequentemente, a citotoxicidade pode ser facilmente acompanhada ao longo do tempo, através da medição do tamanho e da forma dos esferoides (Mittler *et al.*, 2017).

Comparando a forma e a estrutura dos esferoides das linhas celulares PC3 e LNCaP, verificou-se que estas formam esferoides com um formato muito distinto. As células LNCaP, derivadas de uma metástase linfática de CaP, produziram esferoides estrelados irregulares, que se foram tornando mais compactos ao longo dos dias, tal como descrito noutro estudo (Eder *et al.*, 2016). Em contraste, as células PC3, derivadas de uma metástase óssea de CaP, formaram esferoides arredondados e compactos logo 48 h após semear as células. Estas diferenças podem ser derivadas do próprio formato das células, uma vez que as células PC3 apresentam uma forma arredondada e mais pequena, enquanto as células LNCaP têm um formato estrelado e maior. Para além disso, o estudo conduzido por Eder e pela sua equipa, mostrou que os esferoides de células LNCaP eram positivos para a E-caderina e negativos para a vimentina (Eder *et al.*, 2016). Estudos anteriores sugeriram que a acumulação de E-caderina na superfície

celular inibe a formação de esferoides morfologicamente compactos (Mayer *et al.*, 2001). A E-caderina funciona como uma proteína de adesão célula-célula e a perda da sua expressão facilita a dissociação das células do nicho tumoral, promovendo a formação da metástase (Putzke *et al.*, 2011). Relativamente à vimentina, a bibliografia reporta uma diminuição da sua expressão em esferoides estrelados irregulares, como os de células LNCaP (Gunay *et al.*, 2020). Os estudos publicados com esferoides de células PC3 não são concordantes quanto à compactação e formato dos esferoides. Dependendo da técnica utilizada para a sua formação, os esferoides PC3 podem permanecer sem compactação (Jäntti *et al.*, 2018) ou assumir um fenótipo compacto (Härmä *et al.*, 2010). Assim, a técnica otimizada neste estudo para a formação de esferoides pode ser uma mais-valia para futuros estudos com esferoides de células PC3.

Em relação à área dos esferoides, as duas linhas celulares exibiram um perfil distinto, também. Os resultados mostram que os esferoides de células PC3 aumentaram a sua área até ao 3º dia de cultura. Este crescimento poderá ser devido à proliferação celular normal que ocorre também em culturas bidimensionais e que foi previamente reportado pela nossa equipa (Tavares, 2019). Depois do 5º dia, os esferoides foram exibindo um decréscimo da sua área, que pode ser devido a processos de morte celular, como foi observado na microscopia. Os esferoides de células LNCaP exibiram um comportamento muito distinto entre si, começando pelo facto de a área obtida ao 2º dia de formação ser diferente para os vários esferoides estudados. Para além disso, a variação da área do 2º para o 3º dia e do 8º para o 9º dia também não foi constante, constatando aumentos e diminuições na área, consoante o esferoide. O único aspeto comum que se verificou em todos os esferoides estudados foi o facto de os esferoides manterem sempre um perfil de crescimento do 3º dia de formação até ao 7º dia. Uma hipótese possível para tal facto é a sua baixa compactação nos primeiros dias, que facilita a proliferação celular. À medida que um esferoide vai aumentando de tamanho, os níveis de nutrientes no centro vão diminuindo e, a certa altura, vão ser insuficientes para suportar a proliferação celular (Bull *et al.*, 2020), o que poderá ser uma justificação para a estagnação no seu crescimento ou mesmo para a sua diminuição. Tendo em conta os dados adquiridos, as experiências futuras deverão ser conduzidas no período de crescimento do esferoide, entre o 3º e o 7º dia. Caso as experiências sejam realizadas depois desse período, começar-se-á a verificar falta de nutrientes, que poderá conduzir a morte celular.

As células LNCaP não foram incluídas nas restantes etapas do estudo devido à dificuldade em estabelecer esferoides reprodutíveis.

O rádio-223 e os seus produtos de decaimento causam quebras de cadeia dupla no ADN, conduzindo a morte celular. O  $^{223}\text{RaCl}_2$  tem como alvo as áreas de grande remodelação óssea, como as metástases ósseas. Estudos farmacológicos demonstraram que o  $^{223}\text{RaCl}_2$  induziu citotoxicidade, com paragem no ciclo celular em linhas celulares tumorais de CaP e inibição da diferenciação dos osteoclastos e da atividade dos osteoblastos *in vitro* (Leighton, 2013). As lesões provocadas no ADN podem ser provocadas pela ionização direta da molécula de ADN – efeitos diretos – ou pela interação de espécies radicalares com o ADN ou outras biomoléculas essenciais para a célula – efeitos indiretos.

A irradiação dos esferoides foi realizada através da exposição do esferoide ao  $^{223}\text{RaCl}_2$ . Para efetuar a translação do modelo 2D para o 3D, foi necessário validar o cálculo de dose apresentado na Equação 2 para os modelos 3D. Na irradiação dos modelos 3D, a massa da amostra submetida a irradiação aumentou para mais do dobro e houve ainda a necessidade de ter tempos de exposição maiores e atividades diferentes, para atingir a dose pretendida. Assim, quisemos verificar se a variação da atividade inicial da fonte emissora ou do tempo de irradiação, para a mesma dose, produzia resultados biológicos semelhantes.

Para este estudo de validação, procedeu-se à irradiação de células PC3, no formato de cultura tradicional 2D, segundo duas abordagens. Na primeira abordagem fixou-se o  $t$  em 8 minutos e variou-se a  $A_0$ , enquanto na segunda abordagem fixou-se a  $A_0$  da fonte em  $0,8 \mu\text{Ci}$  e fez-se variar o  $t$ . Em seguida, avaliou-se o efeito da irradiação com o rádio-223 na proliferação celular, medida indiretamente através do ensaio SRB. O ensaio SRB baseia-se na análise do conteúdo proteico celular total e é independente de condições metabólicas da linha celular (Keta *et al.*, 2014). Verificou-se que, para cada dose – 0 mGy, 4 mGy, 10 mGy e 20 mGy, determinada através da Equação 2, mesmo variando a atividade inicial da fonte e o tempo de exposição, o efeito biológico observado era semelhante, sem diferenças estatisticamente significativas na proliferação celular entre as duas abordagens (Figura 26).

Para verificar se o mesmo efeito na dose (variando o  $A_0$  ou o  $t$ ) era obtido em modelos celulares 3D, avaliou-se também a proliferação celular nestes modelos. Desta vez, a proliferação celular foi medida através do ensaio XTT, devido às limitações do ensaio SRB para modelos 3D, pois o ensaio SRB pressupõe que as células estejam em

monocamada. Como o esferoide é uma estrutura tridimensional, optou-se por uma técnica que não tivesse como requisito a fixação deste.

Os resultados obtidos corroboraram o que tinha sido previamente verificado no ensaio SRB, em relação à diferença entre as duas abordagens, pois não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as duas abordagens, para a mesma dose (Figura 27). Concluiu-se, deste modo, que o cálculo de dose apresentado na *Equação 2* pode, então, ser utilizado nos modelos 3D de CaP.

Procedeu-se, então, à avaliação dos efeitos do rádio-223 nos esferoides. Os resultados obtidos nos ensaios anteriores, que foram realizados com o objetivo de validar o cálculo de dose do rádio-223, também revelam alguns aspetos relacionados com o efeito biológico do rádio-223 nas várias doses estudadas.

No ensaio XTT realizado na parte da validação, não se verificou uma diminuição da proliferação significativa com o progressivo aumento da dose. Assim, com o objetivo de tentar compreender os efeitos medidos pelo ensaio XTT, avaliou-se a atividade metabólica celular pelo mesmo ensaio com doses de 0 mGy, de 10 mGy, de 20 mGy, de 30 mGy e de 40 mGy. Os resultados obtidos não revelaram diferenças significativas entre as doses avaliadas nem uma diminuição significativa em relação ao controlo.

Uma desvantagem do ensaio XTT é o facto de não ser muito sensível para detetar o efeito de grandes doses absorvidas. Isto deve-se ao facto dos ensaios baseados em tetrazólio superestimarem as células viáveis para doses absorvidas que excedem, aproximadamente, os 8-10 Gy (Elgqvist *et al.*, 2016). Jayakumar e a sua equipa mostraram, em 2014, que as células PC3 apresentavam elevados níveis de ROS (do inglês, *reactive oxygen species*), tanto citosólicos como mitocondriais, quando expostas a uma dose de 4 Gy de radiação  $\gamma$ . Contudo, os ROS também estavam presentes no controlo. Seria expectável que a acumulação de ROS levasse a um aumento de lesões no ADN e a outras respostas celulares, incluindo paragem do ciclo celular, senescência e apoptose (Jayakumar *et al.*, 2014) e, conseqüentemente, a uma diminuição da proliferação celular. Contudo, a acumulação de ROS poderá ter resultado no aumento da redução de XTT e esta poderá ser uma das explicações para a atividade metabólica celular não reduzir significativamente, quando as células são expostas à radiação.

Outro dado importante para a interpretação dos resultados do ensaio XTT é que as células senescentes permanecem metabolicamente ativas. Como a senescência celular é um mecanismo importante, induzido pela radiação, para inibir o crescimento de células tumorais, e que se acredita que poderá ser um dos principais caminhos para a regressão dos tumores de cancro de próstata, poderá ser também uma das hipóteses para a

atividade metabólica estar aumentada nas doses mais elevadas (Elgqvist *et al.*, 2016; Eriksson & Stigbrand, 2010).

No futuro, para avaliar a proliferação celular em esferoides, deveria ser usado um ensaio não baseado em tetrazólio, como por exemplo o *CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay*, que mede ATP como indicador de viabilidade. Esta técnica é mais sensível que os métodos colorimétricos ou baseados em fluorescência, pois recorre à leitura por luminescência. Para além disso, este ensaio é específico para esferoides e o protocolo é simples e rápido, demorando apenas 30 minutos (Promega Global, 2021)

Conhecendo as particularidades e as limitações associadas ao XTT, tornou-se imprescindível a realização de técnicas complementares para avaliação do efeito do rádio-223 nos esferoides de células PC3. Com base nos resultados obtidos neste ensaio, optou-se por selecionar a dose mais alta em estudo para a realização dos ensaios seguintes.

Assim, foi necessário verificar se a diminuição ligeira de proliferação celular correspondia a uma subestimação do efeito associada à técnica ou se nas doses maiores haveria um mecanismo celular de resistência à radiação. Estudou-se, então, qualitativamente, a proliferação celular através da expressão de um marcador, o Ki-67.

O antigénio Ki-67 é um marcador de proliferação celular, sendo expresso em todas as fases do ciclo celular (G1, G2, S e mitose), exceto na fase de não crescimento (G0) (Fontana *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2015).

Ambos os esferoides representados na Figura 32 sofreram um processo de desintegração, pelo que não se visualizou uma zona que represente o núcleo do esferoide, mas sim frações do esferoide. A marcação homogénea e abundante da Figura 32a é representativa de uma condição controlo e de um esferoide de tamanho pequeno, sem zonas hipóxicas e/ou necróticas. Num estudo efetuado por Laurent *et al.*, é sugerida uma resposta dependente do tamanho dos esferoides e foi demonstrado que os esferoides mais pequenos exibem um padrão homogéneo de distribuição de células marcadas com Ki-67, enquanto nos esferoides maiores a marcação com Ki-67 foi restrita às camadas de células mais externas. (Laurent *et al.*, 2013) A ausência de marcação do Ki-67 na Figura 32b poderá ser devida à exposição do esferoide a uma dose de 40 mGy. A bibliografia reporta uma diminuição da expressão deste marcador em esferoides, como resposta à radiação  $\gamma$  (Pettersen *et al.*, 2016). De facto, tanto a desintegração do esferoide como a ausência de marcação de Ki-67, ambos visíveis na Figura 32b, sugerem morte celular. No entanto, a técnica também tem algumas limitações pois a imagem resultante é a sobreposição de várias fatias do esferoide.

O diâmetro dos esferoides é um dos principais parâmetros que afeta a distribuição de oxigênio e de nutrientes dentro do esferoide. Experiências efetuadas por Curcio *et al.* com esferoides de hepatócitos demonstraram que a concentração de oxigênio e a viabilidade das células diminui com o tamanho do esferoide (Curcio *et al.*, 2007). Mais tarde, os resultados obtidos por Grimes *et al.* mostraram que as zonas hipóxicas e necróticas se tornam maiores com o aumento do diâmetro do esferoide (Grimes *et al.*, 2014).

A perda da capacidade de sobrevivência celular pode ser quantificada pelo ensaio clonogénico que se baseia na capacidade de uma única célula sobreviver e originar uma colónia (Balcer-Kubiczek, 2012; Franken *et al.*, 2006). Os nossos resultados do ensaio clonogénico evidenciaram uma perda total de capacidade clonogénica a longo prazo pois as células irradiadas com 40 mGy não formaram qualquer colónia.

A morte celular pode acontecer em horas ou em dias após exposição à radiação, quando as células danificadas se tentam dividir. Uma célula que foi exposta à radiação pode estar aparentemente intacta, pode sintetizar proteína/ADN, e pode mesmo realizar vários ciclos de mitose. Contudo, se não pode realizar replicação sustentada e originar colónias a partir dela, então não sobreviveu (Podgorsak, 2005; Van Der Kogel, 2009). Assim, os resultados do ensaio clonogénico são importantes pois avaliam a morte celular a longo prazo, onde são visíveis os efeitos de sucessivas divisões com acumulação de erros.

Paralelamente ao ensaio clonogénico, no qual se verificou perda total da capacidade de sobrevivência, revelou-se importante avaliar o perfil de morte celular e as vias associadas a esta.

A morte celular também se manifesta com alterações microscópicas da morfologia (Galluzzi & Vitale, 2018), como a presença de mudanças no núcleo e na membrana celular. As células em apoptose exibem características como *blebbing* (projeções da membrana para o exterior), fragmentação do núcleo e células multinucleadas, enquanto as células em necrose perdem a integridade da membrana celular e sofrem vacuolização citoplasmática. Os resultados obtidos evidenciam um maior número de alterações morfológicas nas células sujeitas a uma dose de 40 mGy, comparando com as células controlo. Os resultados de um estudo recente realizado pela nossa equipa confirmam que a diminuição da proliferação das células de CaP quando sujeitas a radiação com rádio-223 está associada à presença de alterações morfológicas, características de morte celular por apoptose (Marques *et al.*, 2021). A apoptose representa uma via de morte celular altamente regulada onde a célula é autodestruída,

em resposta a um determinado estímulo (Sia *et al.*, 2020; Tavares, 2019). Em contraste, a necrose é uma forma de morte celular onde ocorre desintegração dos vários compartimentos da célula (Mattson & Bazan, 2012). É desencadeada por condições desfavoráveis, como mudanças extremas no pH, perda de energia e desequilíbrio de iões dentro da célula e no seu microambiente após a irradiação (Sia *et al.*, 2020).

As células mortas por apoptose são reconhecidas e absorvidas por fagócitos. Os fagócitos reconhecem essas células porque algumas mudanças ocorreram na sua membrana, como a exposição do fosfolípido fosfatidilserina (PS, do inglês *Phosphatidylserine*). A AnV, pertencente a uma família de proteínas com propriedades anticoagulantes, liga-se preferencialmente a fosfolípidos carregados negativamente, como a PS, na presença de  $Ca^{2+}$ . Esta proteína provou ser uma ferramenta útil para detetar células apoptóticas, pois a AnV liga-se à PS, exposta na membrana celular destas (Kiani *et al.*, 2015). Os resultados obtidos mostram um aumento significativo de células marcadas com AnV quando sujeitas a uma dose de 40 mGy. Os resultados deste ensaio sugerem, então, um aumento da morte nas células irradiadas, corroborando o observado no ensaio de morfologia.

O IP é um marcador fluorescente de morte celular que é excluído das células vivas com membranas intactas, mas penetra nas células mortas ou lesadas, ligando-se ao ADN e ao ARN. No ensaio de microscopia não foi observada nenhuma marcação por IP, nem nas células controlo nem nas irradiadas. A explicação mais plausível para a ausência de marcação é a ausência de células em necrose, contudo, no ensaio de morfologia foram visíveis células em necrose, embora em número reduzido. Assim, uma possível explicação para a ausência de marcação por IP é o facto de poder ter ocorrido falhas na técnica, como exposição a uma quantidade muito reduzida de marcador ou perda da capacidade de fluorescência.

Em resposta à radiação, os resultados mostraram um aumento de eventos como apoptose e necrose e uma perda total de capacidade clonogénica a longo prazo. Em suma, os vários ensaios de morfologia e de sobrevivência mostraram que, após serem expostas a uma dose de 40 mGy de rádio-223, as células perdem a capacidade total de sobrevivência após 8 dias.

Um evento comum a todos os ensaios realizados com uma dose de 40 mGy foi a progressiva desintegração dos esferoides ao longo dos dias. Esta característica verificou-se, pois as células da periferia vão-se separando do esferoide, ficando este cada vez mais pequeno e com menos células. As células da periferia são as células do esferoide mais expostas à radiação devido à sua maior superfície de contacto com o

meio e, conseqüentemente, mais expostas às interações das partículas  $\alpha$ . Estas células sofrem processos de morte celular, perdendo as interações célula-célula e célula-MEC. Em resposta à radiação, os esferoides retiveram uma estrutura densa com células que se iam destacando das camadas celulares externas, resultando numa perda de volume gradual de fora para dentro, como também foi descrito por Brüningk (Brüningk *et al.*, 2020). Esta característica dos esferoides irradiados condicionou as experiências seguintes pois, 8 dias após a irradiação, apenas eram visíveis alguns agregados de células. Para além disso, após 8 dias da colocação das nanopartículas, foi relatado que estas se separam das células e ficam retidas no meio de cultura (Haisler *et al.*, 2013). Sem as nanopartículas, o esferoide revela uma maior tendência para se desintegrar e existe uma maior dificuldade na sua transferência para outros suportes para a realização das diferentes técnicas.

De facto, apesar da desintegração ser uma consequência própria da irradiação dos esferoides e um resultado obtido neste estudo, revela-se também uma limitação para efetuar as técnicas que requeriam o esferoide íntegro. Assim, é necessário encontrar algumas estratégias para minimizar esse efeito. Estudos prévios mostraram que, 48h após a radiação, os efeitos citotóxicos não eram muito visíveis nem passíveis de serem quantitativamente determinados. Isto justifica-se pelo facto de os efeitos serem maioritariamente a longo prazo, como observado no ensaio clonogénico. Contudo, após 8 dias, os esferoides estavam desintegrados e a realização dos ensaios dificultou-se devido à perda das nanopartículas pelas células. Assim, é necessário um compromisso para determinar o tempo ideal para a realização dos ensaios. Tendo em conta a eliminação das nanopartículas após 8 dias, o período de crescimento/estagnação dos esferoides, a progressiva desintegração do esferoide ao longo do tempo e os efeitos da radiação a longo prazo, o ideal seria realizar os ensaios entre o 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dia, após irradiação.

Para contornar o problema da transferência dos esferoides e da sua desintegração, existe outra solução atualmente disponível, *Corning® spheroid microplate*. Esta microplaca permite realizar ensaios de fluorescência e de luminescência sem manipular ou transferir os esferoides. Para além disso, constitui uma ferramenta para a formação de esferoides uniformes em todos os poços com um protocolo simples e fácil de usar. A geometria do poço (redonda no fundo e com baixa aderência) auxilia a formação dos esferoides no centro do poço (Corning, n.d.).

## 6. Conclusão



O objetivo principal deste projeto foi o estudo dos efeitos do rádio-223 em modelos celulares tridimensionais e homotípicos de CaP. Para o atingir, realizou-se a otimização e a caracterização de modelos celulares tridimensionais homotípicos de CaP, nomeadamente esferoides constituídos por células LNCaP e esferoides constituídos por células PC3, representativos de diferentes tipos de metástases de cancro da próstata. De seguida, realizou-se a translação e validação do modelo de irradiação com rádio-223 para os modelos 3D. Por fim, avaliaram-se os efeitos radiobiológicos do rádio-223 nos modelos tridimensionais utilizando diversas técnicas de biologia celular e molecular.

O modelo estabelecido e otimizado, através da junção dos métodos *hanging drop* e *magnetic levitation*, permitiu criar esferoides de células PC3 compactos, reprodutíveis e duradouros, permitindo efetuar experiências a longo prazo com o rádio-223. Apesar de o protocolo permitir também a criação de esferoides de células LNCaP compactos e duradouros, estes obtiveram formas e tamanhos muito distintos entre si. Esta diferença de comportamento entre as duas linhas celulares pode ser devida à própria morfologia e tamanho das células, assim como das particularidades do ambiente metastático de onde cada linha celular é proveniente. Apesar de ter algumas limitações, o protocolo desenvolvido constitui uma mais-valia para estudos futuros, pois revelou-se um método eficaz, simples e rápido de obtenção de esferoides.

A equação para o cálculo de dose do rádio-223 foi validada para modelos celulares 3D pois a variação de mais do que um parâmetro na equação e nas condições de irradiação não induziram alterações estatisticamente significativas na resposta biológica obtida para as mesmas doses. Assim, este modelo de irradiação para culturas tridimensionais foi aplicado para estudar os efeitos radiobiológicos do rádio-223 nos esferoides homotípicos de células PC3.

Os efeitos do rádio na proliferação celular dos esferoides PC3 são controversos, pois apesar de a análise da atividade metabólica mostrar que não ocorreu uma diminuição proporcional ao aumento da dose até 40 mGy, verificou-se uma diminuição significativa do marcador de proliferação Ki-67 nas células dos esferoides, após a irradiação com a mesma dose. O resultado da atividade metabólica poderá estar a ser condicionado pela produção de ROS, diminuindo a sensibilidade da técnica.

Verificou-se, também, que a irradiação dos esferoides com a dose de 40 mGy provocou uma progressiva desintegração do esferoide ao longo do tempo, diminuindo a sua área. Esta diminuição revelou um efeito de morte das células da periferia do esferoide e também uma diminuição da proliferação das células que o compõem. A desintegração gradual da periferia para o núcleo sugere que o esferoide não é exposto

à radiação de forma uniforme, sendo que as células da periferia são as primeiras a sofrer interação e, conseqüentemente, os efeitos de morte celular. Contudo, apesar de serem estas células as primeiras a sofrer danos, verifica-se que as células em geral perdem a capacidade de sobrevivência a longo prazo, como comprovado também no ensaio clonogênico. Foi também verificado um aumento de eventos celulares de morte por apoptose e por necrose nas células irradiadas com 40 mGy.

Estes resultados sugerem que as células perdem a sua capacidade total de sobrevivência ao fim de 8 dias, comprovando o efeito citotóxico do rádio-223, mesmo quando as células se encontram numa estrutura 3D. No futuro, estas experiências devem ser replicadas com mais doses e tempos de incubação após irradiação.

Como perspectivas futuras deste projeto, será necessário arranjar uma estratégia que colmate as lacunas experimentais associadas à desintegração do esferoide e eliminação das nanopartículas. Uma estratégia possível é a alteração da data de início das experiências para o 4º ou 5º dia após a irradiação, ou a adoção de uma tecnologia que não necessite da transferência do esferoide e que minimize a sua desintegração. Será, ainda, pertinente aproximar este modelo ao microambiente tumoral do nicho metastático. O próximo passo poderá ser o desenvolvimento de um modelo heterotípico no qual se inclua a linha celular de CaP e outra linha celular representativa do ambiente metastático. A linha celular PC3 poderia ser cultivada com uma linha celular de osteoblastos ou de células endoteliais e a linha celular LNCaP com linfócitos, aumentando a complexidade do modelo celular.

O CaP metastático, e principalmente o mCRPC, continua a exibir um prognóstico muito desfavorável, mas o conhecimento dos seus mecanismos constitui uma das maiores armas disponíveis. Os progressivos estudos efetuados, passo a passo, permitem uma melhor compreensão desta doença e possibilitam o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Embora a terapia com rádio-223 permita um aumento da sobrevivência global e uma melhoria da qualidade de vida, são necessários mais desenvolvimentos para aprofundar as suas potencialidades e maximizar a sua aplicabilidade no tratamento do CaP.

## 7. Referências Bibliográficas



- Abraham, E. (2020). *Spheroids, Organoids Replacing Standard Cultures for Cell-Based Assays*. <https://www.genengnews.com/topics/drug-discovery/spheroids-organoids-replacing-standard-cultures-for-cell-based-assays/>
- Abrantes, A.M. (2013). *Hipoxia Tumoral-Metabonómica e Imagem. Estudo Experimental*. <http://hdl.handle.net/10316/23528%5Cn>
- Abrantes, Ana Margarida, Pires, A. S., Monteiro, L., Teixeira, R., Neves, A. R., Tavares, N. T., Marques, I. A., & Botelho, M. F. (2020). Tumour functional imaging by PET. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(6), 165717. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2020.165717>
- Adhyam, M., & Gupta, A. K. (2012). A Review on the Clinical Utility of PSA in Cancer Prostate. *Indian Journal of Surgical Oncology*, 3(2), 120–129. <https://doi.org/10.1007/s13193-012-0142-6>
- Aly, M., Leval, A., Schain, F., Liwing, J., Lawson, J., Vágó, E., Nordström, T., Andersson, T. M.-L., Sjöland, E., Wang, C., Eloranta, S., & Akre, O. (2020). Survival in patients diagnosed with castration-resistant prostate cancer: a population-based observational study in Sweden. *Scandinavian Journal of Urology*, 54(2), 115–121. <https://doi.org/10.1080/21681805.2020.1739139>
- Aron, N. R. (2017). *The 'Radium Girls' literally glowed from their work—and then it started killing them | by Nina Renata Aron | Timeline*. <https://timeline.com/radium-girls-kate-moore-2bc5746f9a6b>
- ATCC. (2021a). *LNCaP clone FGC*. 1–3.
- ATCC. (2021b). *PC-3*. 1–6.
- Bagi, C. M. (2005). Targeting of therapeutic agents to bone to treat metastatic cancer. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 57, Issue 7, pp. 995–1010). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.12.014>
- Balcer-Kubiczek, E. K. (2012). Apoptosis in radiation therapy: a double-edged sword. *Experimental Oncology*, 34(3), 277–285. <https://exp-oncology.com.ua/article/3516>
- Bandukwala, N. (2021). *Radical Prostatectomy: Purpose, Procedure, Types, Risks, Recovery*. <https://www.webmd.com/prostate-cancer/guide/prostate-cancer-radical->

prostatectomy

- Becquerel, H. (1896). Sur les radiations invisibles émises par les sels d'uranium. *L'Académie Des Sciences*, 1689–1699.
- Berridge, M. V, Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology*, 11. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
- Beyzadeoglu, M., Ozyigit, G., & Ebruli, C. (2010). Basic radiation oncology. In *Basic Radiation Oncology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-11666-7>
- Bolus, N. E. (2001). Basic Review of Radiation Biology and Terminology. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 67–73.
- Bonollo, F., Thalmann, G. N., Julio, M. K., & Karkampouna, S. (2020). The Role of Cancer-Associated Fibroblasts in Prostate Cancer Tumorigenesis. *Cancers 2020*, Vol. 12, Page 1887, 12(7), 1887. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12071887>
- Borley, N., & Feneley, M. R. (2009). Prostate cancer: Diagnosis and staging. In *Asian Journal of Andrology* (Vol. 11, Issue 1, pp. 74–80). Wolters Kluwer -- Medknow Publications. <https://doi.org/10.1038/aja.2008.19>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brito, A. E., & Etchebehere, E. (2020). Radium-223 as an Approved Modality for Treatment of Bone Metastases. *Seminars in Nuclear Medicine*, 50(2), 177–192. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2019.11.005>
- Brüningk, S. C., Rivens, I., Box, C., Oelfke, U., & ter Haar, G. (2020). 3D tumour spheroids for the prediction of the effects of radiation and hyperthermia treatments. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58569-4>
- Bull, J. A., Mech, F., Quaiser, T., Waters, S. L., & Byrne, H. M. (2020). Mathematical modelling reveals cellular dynamics within tumour spheroids. *PLOS Computational Biology*, 16(8), e1007961.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1007961>

- Calais da Silva, F. (2013). *Recomendações clínicas no tratamento do Carcinoma da Próstata*. 1ª ed. ISBN 354977/13.
- Carvalho, F. P. (2011). As descobertas científicas de Marie Curie e o seu legado à ciência e à humanidade. *CAPTAR, Ciência e Ambiente Para Todos*, 3, 1–11.
- Cha, T. L., Wu, T. T. L., Vogelzang, N. J., Huang, C. Y., Huang, S. P., Lin, C. C., Ou, Y. C., Pang, S. T., Shen, D. H. Y., Wu, W. J., & Chang, W. Y. H. (2017). Optimal usage of radium-223 in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Journal of the Formosan Medical Association*, 116(11), 825–836.  
<https://doi.org/10.1016/J.JFMA.2017.04.005>
- Clarke, N. W., Hart, C. A., & Brown, M. D. (2009). Molecular mechanisms of metastasis in prostate cancer. In *Asian Journal of Andrology* (Vol. 11, Issue 1, pp. 57–67). Wolters Kluwer -- Medknow Publications. <https://doi.org/10.1038/aja.2008.29>
- Corning. (n.d.). *Spheroid Microplates | Microplates | Corning*. Retrieved October 17, 2021, from <https://www.corning.com/cala/pt/products/life-sciences/products/microplates/spheroid-microplates.html>
- Costa, E. C., Moreira, A. F., Melo-diogo, D. De, Gaspar, V. M., Carvalho, M. P., & Correia, I. J. (2016). 3D tumor spheroids : an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1427–1441.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002>
- Curcio, E., Salerno, S., Barbieri, G., De Bartolo, L., Drioli, E., & Bader, A. (2007). Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials*, 28(36), 5487–5497.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.08.033>
- Currie, P., Currie, M., & Bemont, G. (1898). *Sur une nouvelle substance fortement radio-active contenue dans la pechblendé*. 127, 1215–1217.
- Curtis, B. (1998). Radium Girls - Dialing Up Trouble. *ChemMatters*
- Danlos, H., & Bloch, P. (1901). Note sur le traitement du lupus erythemateux par des applications du radium. *Ann Dermatol and Syphilog, Note sur le traitement du*

*lupus erythemateux par des applications du radium*, 986–988.

- Deckbar, D., Jeggo, P. A., & Lobrich, M. (2011). Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 46(4), 271. <https://doi.org/10.3109/10409238.2011.575764>
- Denis, L., Morton, M. S., & Griffiths, K. (1999). Diet and its preventive role in prostatic disease. *European Urology*, 35(5–6), 377–387. <https://doi.org/10.1159/000019912>
- Deshayes, E., Roumiguie, M., Thibault, C., Beuzeboc, P., Cachin, F., Hennequin, C., Huglo, D., Rozet, F., Kassab-Chahmi, D., Rebillard, X., & Houédé, N. (2017). Radium 223 dichloride for prostate cancer treatment. In *Drug Design, Development and Therapy* (Vol. 11, pp. 2643–2651). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S122417>
- Domińska, K., Ochędalski, T., Kowalska, K., Matysiak-Burzyńska, Z. E., Płuciennik, E., & Piastowska-Ciesielska, A. W. (2016). Interaction between angiotensin II and relaxin 2 in the progress of growth and spread of prostate cancer cells. *International Journal of Oncology*, 48(6), 2619–2628. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3458>
- Dondossola, E., Casarin, S., Paindelli, C., De-Juan-Pardo, E. M., Hutmacher, D. W., Logothetis, C. J., & Friedl, P. (2019). Radium 223-Mediated zonal cytotoxicity of prostate cancer in Bone. *Journal of the National Cancer Institute*, 111(10), 1042–1050. <https://doi.org/10.1093/jnci/djz007>
- Dörr, W. (2015). Radiobiology of tissue reactions: *SAGE*, 44, 58–68. <https://doi.org/10.1177/0146645314560686>
- Dunn, M. W., & Kazer, M. W. (2011). *Prostate cancer overview*. 27(4), 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2011.07.002>
- Eder, T., Weber, A., Neuwirt, H., Grünbacher, G., Ploner, C., Klocker, H., Sampson, N., & Eder, I. E. (2016). Cancer-Associated Fibroblasts Modify the Response of Prostate Cancer Cells to Androgen and Anti-Androgens in Three-Dimensional Spheroid Culture. *International Journal of Molecular Sciences 2016, Vol. 17, Page 1458*, 17(9), 1458. <https://doi.org/10.3390/IJMS17091458>

- Elgazzar, A. H., & Kazem, N. (2015). Biological effects of ionizing radiation. *The Pathophysiologic Basis of Nuclear Medicine*, 715–726.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-06112-2\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-319-06112-2_21)
- Elgqvist, J., Timmermand, O. V. ilhelmsso., Larsson, E., & Strand, S. E. (2016). Radiosensitivity of Prostate Cancer Cell Lines for Irradiation from Beta Particle-emitting Radionuclide <sup>177</sup>Lu Compared to Alpha Particles and Gamma Rays. *Anticancer Research*, 36(1), 103–109.
- EMA, E. M. A. (2010). *ANNEX I SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS*.  
[www.bayer.ca](http://www.bayer.ca)
- Emsley, J. (2012). *Radium - Element information, properties and uses | Periodic Table*. 2012. <https://www.rsc.org/periodic-table/element/88/radium>
- Epstein, J. I., Egevad, L., Amin, M. B., Delahunt, B., Srigley, J. R., & Humphrey, P. A. (2016). The 2014 international society of urological pathology (ISUP) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology*, 40(2), 244–252.  
<https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000530>
- Eriksson, D., & Stigbrand, T. (2010). *Radiation-induced cell death mechanisms*.  
<https://doi.org/10.1007/s13277-010-0042-8>
- Estandarte, A. K., Botchway, S., Lynch, C., Yusuf, M., & Robinson, I. (2016). The use of DAPI fluorescence lifetime imaging for investigating chromatin condensation in human chromosomes. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–12.  
<https://doi.org/10.1038/srep31417>
- Fontana, F., Raimondi, M., Marzagalli, M., Sommariva, M., Gagliano, N., & Limonta, P. (2020). Three-dimensional cell cultures as an in vitro tool for prostate cancer modeling and drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21186806>
- Fontana, F., Raimondi, M., Marzagalli, M., Sommariva, M., Limonta, P., & Gagliano, N. (2019). Epithelial-To-Mesenchymal Transition Markers and CD44 Isoforms Are Differently Expressed in 2D and 3D Cell Cultures of Prostate Cancer Cells. *Cells*, 8(2), 143. <https://doi.org/10.3390/CELLS8020143>

- Forshier, S. (2009). Essentials of radiation biology and protection. In *Delmar*.
- Foty, R. (2011). A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *20(MII)*, 4–7. <https://doi.org/10.3791/2720>
- Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & Bree, C. van. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols 2006 1:5*, 1(5), 2315–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>
- Fröman, N. (1996). *Marie and Pierre Curie and the discovery of polonium and radium*. <https://www.nobelprize.org/prizes/themes/marie-and-pierre-curie-and-the-discovery-of-polonium-and-radium/>
- Gallicchio, R., Mastrangelo, P. A., Nardelli, A., Mainenti, P. P., Colasurdo, A. P., Landriscina, M., Guglielmi, G., & Storto, G. (2019). Radium-223 for the treatment of bone metastases in castration-resistant prostate cancer: when and why. *Tumori*, 105(5), 367–377. <https://doi.org/10.1177/0300891619851376>
- Galluzzi, L., & Vitale, I. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25, 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Gleason, D. F., Mellinger, G. T., & Arding, L. J. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *Journal of Urology*, 111(1), 58–64. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)59889-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)59889-4)
- Globocan. (2020). *World*. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>
- Grimes, D. R., Kelly, C., Bloch, K., & Partridge, M. (2014). A method for estimating the oxygen consumption rate in multicellular tumour spheroids. *Journal of the Royal Society Interface*, 11(92). <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.1124>
- Gross-Goupil, M., Thurin, N. H., Rouyer, M., Jové, J., Haaser, T., Rebillard, X., Soulie, M., Pouvourville, G. de, Pierrès, M., Capone, C., Lamarque, S., Bignon, E., Droz-Perroteau, C., Moore, N., & Blin, P. (2020). Survival outcome in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer according to first-line treatment.

[https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15\\_suppl.5570](https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.5570), 38(15\_suppl), 5570–5570.  
[https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15\\_SUPPL.5570](https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_SUPPL.5570)

Guerrieri, A. N., Montesi, M., Sprio, S., Laranga, R., Mercatali, L., Tampieri, A., Donati, D. M., & Lucarelli, E. (2020). Innovative Options for Bone Metastasis Treatment: An Extensive Analysis on Biomaterials-Based Strategies for Orthopedic Surgeons. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8.  
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.589964>

Gunay, G., Kirit, H. A., Kamatar, A., Baghdasaryan, O., Hamsici, S., & Acar, H. (2020). The effects of size and shape of the ovarian cancer spheroids on the drug resistance and migration. *Gynecologic Oncology*, 159(2), 563–572.  
<https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2020.09.002>

Gunderman, R. B., & Gonda, A. S. (2015). Radium Girls. *Radiology*, 274(2).

Haisler, W. L., Timm, D. M., Gage, J. A., Tseng, H., Killian, T. C., & Souza, G. R. (2013). Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nature Protocols*, 8(10), 1940–1949. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.125>

Hall, E. J. (1985). Radiation biology. *Cancer*, 55(9 S), 2051–2057.  
[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19850501\)55:9+<2051::AID-CNCR2820551404>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19850501)55:9+<2051::AID-CNCR2820551404>3.0.CO;2-Y)

Hanusa, T. P. (2019). *Radium | Description, Properties, Symbol, Uses, & Facts | Britannica*. <https://www.britannica.com/science/radium>

Härmä, V., Virtanen, J., Mäkelä, R., Happonen, A., Mpindi, J.-P., Knuutila, M., Kohonen, P., Lötjönen, J., Kallioniemi, O., & Nees, M. (2010). A Comprehensive Panel of Three-Dimensional Models for Studies of Prostate Cancer Growth, Invasion and Drug Responses. *PLoS ONE*, 5(5), 10431.  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010431>

Hornig, G. W., & Greene, C. (2010). Neurosurgical conditions. *Ashcraft's Pediatric Surgery*, 235–246. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6127-4.00019-7>

Hubenak, J. R., Zhang, Q., Branch, C. D., & Kronowitz, S. J. (2014). Mechanisms of injury to normal tissue after radiotherapy: a review. *Plastic and Reconstructive*

- Surgery*, 133(1), 49e. <https://doi.org/10.1097/01.PRS.0000440818.23647.0B>
- Huggins, C., & Hodges, C. V. (2002). Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *The Journal of Urology*, 168(1), 9–12. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)64820-3](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)64820-3)
- Huyck, L., Ampe, C., & Troys, M. Van. (2012). The XTT Cell Proliferation Assay Applied to Cell Layers Embedded in Three-Dimensional Matrix. *Assay and Drug Development Technologies*, 10(4), 382. <https://doi.org/10.1089/ADT.2011.391>
- Immunocytochemistry - The Human Protein Atlas*. (2020). <https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunocytochemistry>
- Ingle, S. P., Ramona, I., & Suresh. (2013). The efficiency of the serum prostate specific antigen levels in diagnosing prostatic enlargements. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(1), 82–84. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2012/4926.2676>
- Isabel, M., & Li, D. R. (2018). *Three-dimensional cell culture : nearing the gap between in vitro and in vivo models*. 6(1), 72–83.
- Ittmann, M. (2018). *Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. Paner 2010*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030346>
- ITW Reagents, P. A. (2021). *Cell Proliferation Assay Kit XTT*. [https://www.itwreagents.com/download\\_file/info\\_point/IP-029/en/IP-029\\_en.pdf](https://www.itwreagents.com/download_file/info_point/IP-029/en/IP-029_en.pdf)
- Jääntti, M. H., Talman, V., Räsänen, K., Tarvainen, I., Koistinen, H., & Tuominen, R. K. (2018). Anticancer activity of the protein kinase C modulator HMI-1a3 in 2D and 3D cell culture models of androgen-responsive and androgen-unresponsive prostate cancer. *FEBS Open Bio*, 8(5), 817–828. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12419>
- Jayakumar, S., Kunwar, A., Sandur, S. K., Pandey, B. N., & Chaubey, R. C. (2014). Differential response of DU145 and PC3 prostate cancer cells to ionizing radiation: Role of reactive oxygen species, GSH and Nrf2 in radiosensitivity. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(1), 485–494.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.006>

Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 14(4), 910–919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>

Keizman, D., Peer, A., Neumann, A., Rosenbaum, E., Neiman, V., Gottfried, M., Kuchuk, I., Sarid, D., Gez, E., Mermershtain, W., & Rouvinov, K. (2016). Imaging response during therapy (tx) with radium-223 (Ra-223) for castrate resistant prostate cancer (CRPC) with bone metastases (BM). *https://doi.org/10.1200/Jco.2016.34.2\_suppl.282*, 34(2\_suppl), 282–282. [https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.2\\_SUPPL.282](https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.2_SUPPL.282)

Kelsey, C. A., Heintz, P. H., Chambers, G. D., Sandoval, D. J., Adolphi, N. L., & Paffett, K. S. (2014). *Radiation Biology of Medical Imaging*. Wiley Blackwell.

Keta, O., Todorović, D., Popović, N., Korićanac, L., Cuttone, G., Petrović, I., & Ristić-Fira, A. (2014). Radiosensitivity of human ovarian carcinoma and melanoma cells to  $\gamma$ -rays and protons. *Archives of Medical Science : AMS*, 10(3), 578. <https://doi.org/10.5114/AOMS.2014.43751>

Kiani, M. A., Tavakoli, M. B., Kheirollahi, M., Kiani, A., Kazemi, M., Haghjooy Javanmard, S., & Mohebat, L. (2015). *Annexin V FITC conjugated as a radiation toxicity indicator in lymphocytes following radiation overexposure in radiotherapy programs*. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.158025>

Kim, J. J., & Tannock, I. F. (2005). *REPOPULATION OF CANCER CELLS DURING THERAPY: AN IMPORTANT CAUSE OF TREATMENT FAILURE*. <https://doi.org/10.1038/nrc1650>

Knut, L., & Ajit, S. (2016). From palliative therapy to prolongation of survival: (223)RaCl<sub>2</sub> in the treatment of bone metastases. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 8(4), 294–304. <https://doi.org/10.1177/1758834016640494>

Koledova, Z. (2017). 3D cell culture: An introduction. *Methods in Molecular Biology*, 1612, 1–11. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7021-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7021-6_1)

- Kolosnjaj-Tabi, J., Wilhelm, C., Clément, O., & Gazeau, F. (2013). Cell labeling with magnetic nanoparticles: Opportunity for magnetic cell imaging and cell manipulation. *Journal of Nanobiotechnology* 2013 11:1, 11(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-S1-S7>
- Kuhn, D. M., Balkis, M., Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2003). Uses and Limitations of the XTT Assay in Studies of Candida Growth and Metabolism. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 506. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.506-508.2003>
- Kuřakowski, A. (2011). *The contribution of Marie Skłodowska-Curie to the development of modern oncology*. 1583–1586. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4712-1>
- Laurent, J., Frongia, C., Cazales, M., Mondesert, O., Ducommun, B., & Lobjois, V. (2013). Multicellular tumor spheroid models to explore cell cycle checkpoints in 3D. *BMC Cancer*, 13, 73. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-73>
- Leighton, J. K. (2013). *MEMORANDUM Xofigo (radium Ra 223 dichloride)*. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2013/203971Orig1s000PharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/203971Orig1s000PharmR.pdf)
- Leslie., A. M. S. W. (2020). Gleason Score. In *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*. Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9\\_6908](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9_6908)
- Leung, C. N., Canter, B. S., Rajon, D., Bäck, T. A., Christopher Fritton, J., Azzam, E. I., & Howell, R. W. (2020). Dose-dependent growth delay of breast cancer xenografts in the bone marrow of mice treated with 223Ra: The role of bystander effects and their potential for therapy. *Journal of Nuclear Medicine*, 61(1), 89–95. <https://doi.org/10.2967/jnumed.119.227835>
- Li, L. T., Jiang, G., Chen, Q., & Zheng, J. N. (2015). Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Molecular Medicine Reports*, 11(3), 1566–1572. <https://doi.org/10.3892/MMR.2014.2914>
- Libardi Do Amaral, C. (2017). Epithelial-mesenchymal transition in docetaxel-resistant prostate cancer. *EUROPEAN MEDICAL JOURNAL*.

- Lin, Rwei Zeng, Chou, L. F., Chien, C. C. M., & Chang, H. Y. (2006). Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: Roles of E-cadherin and  $\beta$ 1-integrin. *Cell and Tissue Research*, 324(3), 411–422. <https://doi.org/10.1007/S00441-005-0148-2>
- Lin, Rwei Zhen, & Chang, H. Y. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*, 3(9–10), 1172–1184. <https://doi.org/10.1002/biot.200700228>
- Litwin, M. S., & Tan, H. J. (2017). The diagnosis and treatment of prostate cancer: A review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 317(24), 2532–2542. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7248>
- Louis, S. (2019). *Gold Biotechnology Protocol XTT Cell Proliferation Assay*.
- Magee, P. J., & Rowland, I. R. (2004). Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *British Journal of Nutrition*, 91(4), 513–531. <https://doi.org/10.1079/bjn20031075>
- Maia, N. (2010). *Associação Portuguesa de Urologia*. [https://www.apurologia.pt/publico/frameset.htm?https://www.apurologia.pt/publico/biopsia\\_prostatica.htm](https://www.apurologia.pt/publico/frameset.htm?https://www.apurologia.pt/publico/biopsia_prostatica.htm)
- Marples, B., & Beaumont, P. (2014). *The Radiobiological Four “R”s of Hypofractionation*.
- Marques, I. (2016). *Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático*. 14–33. <http://hdl.handle.net/10316/36430>
- Marques, I. A., Neves, A. R., Abrantes, A. M., Pires, A. S., Tavares-da-Silva, E., Figueiredo, A., & Botelho, M. F. (2018). Targeted alpha therapy using Radium-223: From physics to biological effects. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 68, pp. 47–54). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.05.011>
- Marques, Inês A., Abrantes, A. M., Pires, A. S., Neves, A. R., Caramelo, F. J., Rodrigues, T., Matafome, P., Tavares-da-Silva, E., Gonçalves, A. C., Pereira, C. C., Teixeira, J. P., Seíça, R., Costa, G., Figueiredo, A., & Botelho, M. F. (2021). Kinetics of radium-223 and its effects on survival, proliferation and DNA damage in lymph-node and bone metastatic prostate cancer cell lines. *International*

- Journal of Radiation Biology*, 97(5), 714–726.  
<https://doi.org/10.1080/09553002.2021.1906462>
- Mattson, M. P., & Bazan, N. G. (2012). Apoptosis and Necrosis. *Basic Neurochemistry*, 663–676. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00037-7>
- Mayer, B., Klement, G., Kaneko, M., Man, S., Jothy, S., Rak, J., & Kerbel, R. S. (2001). Multicellular Gastric Cancer Spheroids Recapitulate Growth Pattern and Differentiation Phenotype of Human Gastric Carcinomas. *Gastroenterology*.  
<https://doi.org/10.1053/gast.2001.27989>
- McGaw, L. J., Elgorashi, E. E., & Eloff, J. N. (2014). Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*, 181–233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800018-2.00008-X>
- Microexpress. (n.d.). *May Grunwald-Giemsa (MGG) Stain*.
- Mittler, F., Obeïd, P., Rulina, A. V., Haguët, V., Gidrol, X., & Balakirev, M. Y. (2017). High-Content Monitoring of Drug Effects in a 3D Spheroid Model. *Frontiers in Oncology*, 0(DEC), 293. <https://doi.org/10.3389/FONC.2017.00293>
- Monteiro, P. G. (2006). *Terapêutica e Seguimento do Carcinoma da Próstata*.  
[www.apurologia.pt](http://www.apurologia.pt)
- Mora, A. K., Khan, S., Patro, B. S., & Nath, S. (2020). Is DAPI assay of cellular nucleic acid reliable in the presence of protein aggregates? *Chemical Communications*, 56(89), 13844–13847. <https://doi.org/10.1039/D0CC04108D>
- Morris, M. J., Corey, E., Guise, T. A., Gulley, J. L., Kevin Kelly, W., Quinn, D. I., Scholz, A., & Sgouros, G. (2019). Radium-223 mechanism of action: implications for use in treatment combinations. *Nature Reviews Urology*, 16(12), 745–756.  
<https://doi.org/10.1038/s41585-019-0251-x>
- National Cancer Institute. (2017). *Prostate Cancer — Cancer Stat Facts*.  
<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>
- Ng, W.-L., Huang, Q., Liu, X., Zimmerman, M., Li, F., & Li, C.-Y. (2013). *Molecular mechanisms involved in tumor repopulation after radiotherapy*.  
<https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.10.03>

- Nguyen, N. C., Shah, M., Appleman, L. J., Parikh, R., & Mountz, J. M. (2016). Radium-223 Therapy for Patients with Metastatic Castrate-Resistant Prostate Cancer: An Update on Literature with Case Presentation. In *International Journal of Molecular Imaging* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/2568031>
- Nome, R., Hernes, E., Bogsrud, T. V., Bjørø, T., & Fosså, S. D. (2015). Changes in prostate-specific antigen, markers of bone metabolism and bone scans after treatment with radium-223. *Http://Dx.Doi.Org/10.3109/21681805.2014.982169*, 49(3), 211–217. <https://doi.org/10.3109/21681805.2014.982169>
- Orellana, E. A., & Kasinski, A. L. (2016). *Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation*. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1984>
- Paull, K. D., Shoemaker, R. H., Boyd, M. R., Parsons, J. L., Risbood, P. A., Barbera, W. A., Sharma, M. N., Baker, D. C., Hand, E., Scudiero, D. A., Monks, A., Alley, M. C., & Grote, M. (1988). The synthesis of XTT: A new tetrazolium reagent that is bio-reducible to a water-soluble formazan. In *Journal of Heterocyclic Chemistry* (Vol. 25, Issue 3, pp. 911–914). <https://doi.org/10.1002/jhet.5570250340>
- Petterson, S. A., Jakobsen, I. P., Skov Jensen, S., Aaberg-Jessen, C., Halle, B., Nielsen, M., Halle, D. M., Johansen, J., & Kristensen, B. W. (2016). Short-term effects of radiation in glioblastoma spheroids. *Int J Clin Exp Pathol*, 9(2), 576–588. [www.ijcep.com/](http://www.ijcep.com/)
- Pickrell, J. A. (2009). Radiation and Health Effects. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, 381–392. <https://doi.org/10.1016/B978-012374484-5.00028-6>
- Podgorsak, E. B. (2005). Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students. In *Vienna : International Atomic Energy Agency*. <https://doi.org/10.1021/jf030837o>
- Pollak, M. (2012). The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: An update. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 12, Issue 3, pp. 159–169). *Nat Rev Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc3215>
- Porter, M. P., & Stanford, J. L. (2005). Obesity and the risk of prostate cancer. *Prostate*, 62(4), 316–321. <https://doi.org/10.1002/pros.20121>

- Promega Global. (2021). *CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay | 3D Cell Culture | Promega*. [https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter\\_glo-3d-cell-viability-assay/?catNum=G9681](https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_glo-3d-cell-viability-assay/?catNum=G9681)
- Prostate Cancer Foundation of Australia. (2020). *Prostate cancer A guide for newly-diagnosed men*.
- Putzke, A. P., Ventura, A. P., Bailey, A. M., Akture, C., Opoku-Ansah, J., Çeliktaş, M., Hwang, M. S., Darling, D. S., Coleman, I. M., Nelson, P. S., Nguyen, H. M., Corey, E., Tewari, M., Morrissey, C., Vessella, R. L., & Knudsen, B. S. (2011). Metastatic Progression of Prostate Cancer and E-Cadherin: Regulation by Zeb1 and Src Family Kinases. *The American Journal of Pathology*, *179*(1), 400–410. <https://doi.org/10.1016/J.AJP.2011.03.028>
- Ramon, J., & Denis, L. J. (2007). Prostate Cancer. In *York : Springer-Verlag Berlin Heidelberg*.
- Rawla, P. (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *World Journal of Oncology*, *10*(2), 63–89. <https://doi.org/10.14740/wjon1191>
- Roentgen, W. C. (1896). Über eine neue Art von Strahlen. *Springer Verlag*, 14–24. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-00956-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-00956-7_2)
- Rosengren, A., & Oscarsson, S. (2009). The influence of plasma proteins on bone cell adhesion. *Cellular Response to Biomaterials*, 538–559. <https://doi.org/10.1533/9781845695477.3.538>
- Ryu, N.-E., Lee, S.-H., & Park, H. (2019). Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, *8*(12). <https://doi.org/10.3390/CELLS8121620>
- Saad, F., & Hotte, S. J. (2010). Guidelines for the management of castrate-resistant prostate cancer. *Journal of the Canadian Urological Association*, *4*(6), 380–384. <https://doi.org/10.5489/cuaj.10167>
- Sant, S., & Johnston, P. A. (2017). The Production of 3D Tumor Spheroids for Cancer Drug Discovery. *Physiology & Behavior*, *176*(1), 139–148.

- <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2017.03.002>.The
- Santo, R. P. (2017). *Resposta Celular à Radioterapia*.  
<http://hdl.handle.net/10316/82863>
- Schmid, T. E., Multhoff, G., Pockley, A. G., Stroka, D., & Hossain, Z. (2012). *Non-targeted effects of photon and particle irradiation and the interaction with the immune system*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00080>
- Shen, M. M., & Abate-shen, C. (2010). *Molecular genetics of prostate cancer : new prospects for old challenges*. 212, 1967–2000.  
<https://doi.org/10.1101/gad.1965810>.GENES
- Sia, J., Szmyd, R., Hau, E., & Gee, H. E. (2020). Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Cancer Cell Death: A Primer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 0, 41. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.00041>
- Sonn, G. A., Aronson, W., & Litwin, M. S. (2005). Impact of diet on prostate cancer: A review. In *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* (Vol. 8, Issue 4, pp. 304–310). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500825>
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1), A3.B.1. <https://doi.org/10.1002/0471142735.IMA03BS111>
- Tavares, N. (2019). *Radium-223 in metastatic prostate cancer: effects on metastasis microenvironment*. <http://hdl.handle.net/10773/26898>
- ThermoFisher. (2020). *CELL CULTURE BASICS Handbook*.  
[www.invitrogen.com/cellculturebasics](http://www.invitrogen.com/cellculturebasics)
- Van Der Kogel, A. (2009). *Basic Clinical Radiobiology*.  
<http://www.hoddereducation.com>
- von Knebel Doeberitz, M., & Wentzensen, N. (2008). The Cell: Basic Structure and Function. *Comprehensive Cytopathology*, 3–22. <https://doi.org/10.1016/B978-141604208-2.10001-6>
- Wallis, C. J. D., & Klaassen, Z. (2019). *Radiopharmaceuticals in Prostate Cancer: Systemic “Bone-Seeking” Agents*. <https://www.urotoday.com/library->

resources/crpc-with-bone-metastases/121602-radiopharmaceuticals-in-prostate-cancer-systemic-bone-seeking-agents.html

Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J., & Depinho, R. A. (2018). Genetics and biology of prostate cancer. In *Genes and Development* (Vol. 32, Issues 17–18, pp. 1105–1140). Cold Spring Harbor Laboratory Press.  
<https://doi.org/10.1101/gad.315739.118>

Wissing, M. D., Van Leeuwen, F. W. B., Van Der Pluijm, G., & Gelderblom, H. (2013). Radium-223 chloride: Extending life in prostate cancer patients by treating bone metastases. *Clinical Cancer Research*, 19(21), 5822–5827.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1896>

Withers, H. R. (1975). *Cell Cycle Redistribution as a Factor in Multifraction Irradiation*.

Writer, S. (2020). *What Are Human Bones Made Of?*  
<https://www.reference.com/science/human-bones-made-4a1b1ecfa46d2545>

Xofigo | *European Medicines Agency*. (2018).  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/xofigo>

Yard, B. D., Gopal, P., Bannik, K., Siemeister, G., Hagemann, U. B., & Abazeed, M. E. (2019). Cellular and Genetic Determinants of the Sensitivity of Cancer to a - Particle Irradiation. *Cancer Research*, 79(21), 5640–5652.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0859>

Yashar, C. M. (2018). Basic principles in gynecologic radiotherapy. *Clinical Gynecologic Oncology*, 586-605.e3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40067-1.00023-1>

Zanoni, M., Cortesi, M., Zamagni, A., Arienti, C., Pignatta, S., & Tesei, A. (2020). *Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids*.  
<https://doi.org/10.1186/s13045-020-00931-0>

# Anexo I

Tabela do Sistema de Estadiamento do CaP com base nas categorias TNM.

T – Tumor Primário	
TX	Tumor primário não avaliável
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor clinicamente imperceptível, não palpável ou visível através de imagem
T1a	Tumor por achado histológico incidental em 5% ou menos do tecido ressecado
T1b	Tumor por achado histológico incidental mais do que 5% do tecido ressecado
T1c	Tumor identificado por biópsia com agulha (ex. devido a nível elevado de PSA)
T2	Tumor limitado à próstata
T2a	Tumor afeta metade de um lóbulo ou menos
T2b	Tumor afeta mais de metade de um lóbulo, mas não ambos os lóbulos
T2c	Tumor afeta ambos os lóbulos
T3	Tumor invade para lá da cápsula prostática
T3a	Extensão extracapsular (unilateral ou bilateral)
T3b	Tumor estende-se à(s) vesícula(s) seminal(is)
T4	Tumor fixa-se ou invade as estruturas adjacentes que não as vesículas seminais: colo vesical, esfíncter externo, reto, músculo levantador do ânus e/ou parede pélvica
N - Gânglios linfáticos regionais	
NX	Gânglios linfáticos regionais não avaliáveis
N0	Sem metástases nos gânglios linfáticos regionais
N1	Metástases nos gânglios linfáticos regionais
M - Metástases à distância	
MX	Metástases à distância não avaliáveis
M0	Sem metástases à distância
M1	Metástase à distância
M1a	Gânglio(s) linfático(s) não regional(is)
M1b	Osso(s)
M1c	Outra(s) localização(ões)

