



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Carolina Daniela Santos Fernandes

**EFEITOS DO RÁDIO-223 EM MODELOS
CELULARES DE CANCRO DA PRÓSTATA
METASTÁTICO**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Engenharia Biomédica,
com especialização em Imagem Médica e Radiação, orientada pela
Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e pela
Mestre Inês Alexandra Marques, apresentada à Faculdade de
Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra**

Setembro de 2022

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.

“Science is more than a body of knowledge. It is a way of thinking; a way of skeptically interrogating the universe with a fine understanding of human fallibility.”

Carl Sagan

Agradecimentos

Este projeto não teria sido possível sem a ajuda e colaboração de toda uma equipa multidisciplinar, à qual estou eternamente grata. Agradeço a todos o apoio, o empenho, o esforço e os conhecimentos que me transmitiram, permitindo a conclusão desta etapa.

Agradeço à Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e orientadora desta dissertação, por me ter acolhido no Instituto de Biofísica e pela disponibilidade para esclarecer qualquer dúvida. Agradeço pelo tempo despendido e por todas as críticas construtivas na correção deste documento, por todo o conhecimento transmitido e rigor científico.

À Mestre Inês Marques, coorientadora desta dissertação, por ter sido o meu pilar ao longo do desenvolvimento deste projeto. Agradeço a ajuda na integração no laboratório e a explicação das regras, das técnicas e protocolos. Agradeço pela constante disponibilidade para esclarecer todas as minhas dúvidas, pela partilha de conhecimentos e pelas críticas e conselhos que ajudaram a enriquecer esta dissertação. Acima de tudo, agradeço o empenho, o esforço, a paciência, a preocupação, as palavras amigas e a dedicação incansável à realização deste trabalho.

À Professora Doutora Ana Salomé dos Santos Pires Lourenço, Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pelo esclarecimento de diversas dúvidas e pela ajuda, simpatia e motivação em momentos mais difíceis.

À Professora Doutora Ana Margarida Abrantes e à Doutora Mafalda Laranjo, pela disponibilidade constante e por serem um exemplo de dedicação e empenho, valores que levarei para sempre comigo.

Aos Mestres Beatriz Serambeque, Ricardo Teixeira, Ana Rita Gomes e Eurico Pereira, por todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos, por toda a ajuda no laboratório e pela companhia nas horas de almoço, que ajudou a descontrair nos momentos de mais stresse.

Ao Serviço de Medicina Nuclear do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, dirigido pela Doutora Gracinda Costa, pela doação do radiofármaco dicloreto de rádio-223.

À Mestre Teresa Rodrigues, pela disponibilidade e ajuda na realização das técnicas de microscopia confocal.

A todos os professores que fizeram parte do meu percurso escolar e académico, em especial os que tive a honra de conhecer ao longo destes últimos cinco anos e que me transmitiram conhecimentos fundamentais para a elaboração deste projeto.

Aos grandes amigos que Coimbra me trouxe, Mariana, Joana Gamboias, Filipa, Diana, Joana Henriques, Maria, Alexandre e Denis. Obrigada por me acompanharem ao longo deste percurso, por estarem sempre lá para me ouvir, por me ajudarem a ultrapassar todos os obstáculos e por todos os

momentos inesquecíveis que passámos juntos e que levarei para sempre na memória e no coração. Agradeço por toda a amizade, carinho e conselhos.

À Mafalda e à Joana Margarido, que conheci este ano no laboratório, por todo o apoio, companhia, ajuda, conselhos e pela partilha de conhecimentos.

À Lúcia Fernandes, por ser a melhor madrinha e o meu grande apoio nestes últimos cinco anos. Agradeço pela amizade, pelo apoio incondicional, por todos os conselhos, pela preocupação, por ouvir todos os meus lamentos e choros, por acreditar sempre que eu era capaz de tudo e, principalmente, pelo orgulho que sempre demonstrou em mim. Obrigada por seres um exemplo de força e dedicação.

À Joana Marques, à Gabriela e à Francisca, por serem a melhor “família” que Coimbra me podia ter dado. Agradeço por todos os momentos espetaculares que passámos juntas, por me ajudarem a relaxar quando mais precisava e por todo o carinho e amizade.

Aos meus amigos de longa data, Carolina Nunes, Inês, João, Pinto, Carolina Paulo, Ariana, Beatriz e Emanuel, por tantos anos de amizade e por tantas aventuras. Obrigada por todo o apoio e por acreditarem sempre em mim. Sei que são amigos para a vida toda.

À Isilda e ao Pedro, por me acompanharem desde pequenina e estarem sempre presentes. Agradeço todas as palavras amigas, todos os conselhos e todo o carinho.

A toda a minha família, que mesmo longe sei que está sempre lá para me apoiar. Em especial, ao meu irmão José, por conseguir sempre alegrar-me, mesmo nos momentos mais tristes. Obrigada por seres o melhor irmão do mundo, por me ouvires e me dares os melhores conselhos e por seres um exemplo para mim.

Acima de tudo, agradeço aos meus pais, Rosa e António, por todo o amor e apoio incondicional, por serem os meus melhores amigos e o meu porto-seguro. Obrigada por estarem sempre prontos a ajudar-me em tudo, por me limparem tantas lágrimas e por nunca me deixarem desistir. Obrigada por serem um exemplo de determinação, coragem, resiliência e persistência. Sem vocês, nunca teria ultrapassado esta etapa, pelo que esta vitória é igualmente vossa. Um eterno obrigado, do fundo do coração!

Resumo

O cancro da próstata é o quinto cancro mais mortal e o segundo mais frequentemente diagnosticado no sexo masculino, a nível mundial. Desde 2006, a incidência de cancro da próstata sofreu um aumento global de 40%, em parte devido ao envelhecimento da população, já que a idade é um dos fatores de risco mais correlacionado com esta patologia. A terapia de privação de androgénios é um dos tratamentos *standard*, particularmente para o cancro da próstata avançado. No entanto, após um certo período, o tumor pode tornar-se resistente a esta terapêutica, progredindo para cancro da próstata resistente à castração. Uma grande percentagem dos doentes neste estágio da doença acaba por desenvolver metástases, sendo as mais frequentes as metástases ósseas, passando a designar-se cancro da próstata metastático resistente à castração. Esta fase mais avançada de cancro da próstata está associada a um prognóstico muito desfavorável, devido à escassez de opções de tratamento. Foi, assim, necessário desenvolver novas estratégias terapêuticas, tais como o uso do radiofármaco dicloreto de rádio-223 (Xofigo[®], Bayer Pharma), o primeiro emissor alfa aprovado para uso clínico. O rádio-223 atua como um análogo do cálcio, pelo que, após administração intravenosa, se vai depositar na superfície dos ossos e é particularmente absorvido em zonas de maior renovação óssea, características das metástases ósseas, onde substitui o cálcio e incorpora os complexos de hidroxiapatite. Contudo, os mecanismos moleculares e os alvos envolvidos no modo de ação do rádio-223 ainda não são totalmente conhecidos, o que é apontado como uma limitação na sua aplicabilidade clínica.

Assim, o principal objetivo deste projeto consistiu na avaliação dos efeitos radiobiológicos do rádio-223 em modelos celulares de cancro da próstata, com foco nas culturas 3D. Este tipo de culturas permite uma mimetização mais realista do microambiente tumoral *in vivo*. Para alcançar este objetivo, foi desenvolvido e otimizado um modelo celular 3D homotípico de cancro da próstata, usando a técnica de cultura de sobreposição líquida em placas de baixa aderência específicas para a formação de esferoides. De seguida, os efeitos do radiofármaco, ao nível da proliferação e da sobrevivência celular, foram estudados em duas linhas celulares de cancro da próstata metastático, após exposição de células PC3 e LNCaP, cultivadas em 2D, a diferentes atividades volúmicas (55-7 040 Bq/mL) e diferentes tempos de exposição. Os efeitos da exposição ao rádio-223 foram também avaliados em culturas 3D, mais especificamente em esferoides homotípicos de células PC3, ao nível da estrutura dos esferoides, da viabilidade, da morte e da morfologia celular.

De um modo geral, a irradiação das células PC3 e das células LNCaP, em cultura 2D, provocou uma diminuição da proliferação e da sobrevivência celular, acentuando-se com o aumento da atividade volúmica inicial de rádio-223 e com o aumento da duração da exposição a este radiofármaco. Para além disso, as células LNCaP apresentaram uma maior radiosensibilidade ao rádio-223, em comparação com as células PC3, o que poderá estar relacionado com as diferentes origens das duas linhas celulares.

O modelo celular 3D de cancro da próstata, otimizado ao longo deste projeto, permitiu a rápida obtenção de esferoides de células PC3 coesos, compactos e reproduzíveis, os quais se mantiveram em cultura sem se desintegrarem por vários dias, possibilitando a realização de ensaios de radiobiologia a longo prazo. Porém, a utilização da mesma metodologia com a linha celular LNCaP não permitiu formar esferoides consistentes, pois as células ficaram dispersas nos poços em pequenos agregados. A exposição dos esferoides de células PC3 ao rádio-223 levou à progressiva desintegração dos esferoides ao longo do tempo e, conseqüentemente, à diminuição do seu tamanho. A desintegração dos esferoides observou-se, principalmente, na região periférica e foi tanto maior quanto maior a atividade volúmica inicial de rádio-223 adicionada. Verificou-se, também, o decréscimo da viabilidade celular e o aumento da morte celular, especialmente por apoptose, com o aumento da atividade volúmica inicial de rádio-223. Corroborando estes resultados, observou-se um maior número de alterações morfológicas nas células dos esferoides irradiados, principalmente características de morte celular por apoptose.

Concluindo, os resultados obtidos mostraram que o rádio-223 teve um efeito citotóxico em ambos os modelos celulares de cancro da próstata (2D e 3D), nomeadamente a diminuição da proliferação, da sobrevivência e da viabilidade celular, associadas ao aumento da morte celular essencialmente por apoptose. Estes resultados reforçam a potencialidade do uso deste radiofármaco no tratamento de doentes em estágio avançado da doença, especialmente com cancro da próstata metastático resistente à castração. Comparando os efeitos do rádio-223 entre os modelos celulares 2D e 3D, observaram-se menos efeitos radiobiológicos nos esferoides de células PC3, para a mesma atividade volúmica, o que se traduz numa melhor reprodução do microambiente *in vivo*. Deste modo, o modelo celular 3D desenvolvido neste projeto poderá, no futuro, ser utilizado e adaptado para desenvolver estruturas celulares tridimensionais mais complexas e mais semelhantes ao nicho metastático do cancro da próstata, para assim compreender melhor o mecanismo de ação do rádio-223 e maximizar a sua aplicabilidade.

Palavras-chave: Cancro da próstata metastático resistente à castração; Terapia alfa dirigida; Rádio-223; Cultura celular 3D; Esferoides.

Abstract

Prostate cancer is the fifth deadliest cancer and the second most frequently diagnosed in males worldwide. Since 2006, the incidence of prostate cancer has increased overall by 40%, partly due to the ageing of the population, as age is one of the risk factors most correlated with this pathology. Androgen deprivation therapy is one of the standard treatments, particularly for advanced prostate cancer. However, after a certain period, the tumor may become resistant to this therapy, progressing to castration-resistant prostate cancer. A large percentage of patients at this stage of the disease develop metastases, the most frequent being bone metastases, reaching the worst stage of the disease, the metastatic castration-resistant prostate cancer. This more advanced stage of prostate cancer is associated with a very unfavorable prognosis due to the lack of treatment options. Therefore, it was necessary to develop new therapeutic strategies, such as the use of the radiopharmaceutical radium-223 dichloride (Xofigo[®], Bayer Pharma), the first alpha emitter approved for clinical use. Radium-223 acts as a calcium mimic, with natural deposition on the surface of the bones, particularly in areas of greater bone renewal, characteristic of bone metastases, where it substitutes for calcium in hydroxyapatite complexes. However, the molecular mechanisms and targets involved in the mode of action of radium-223 are not yet fully known, which is pointed out as a limitation in its clinical applicability.

Thus, the main goal of this project was to evaluate the radiobiological effects of radium-223 in cellular models of prostate cancer, focusing on 3D cultures. This type of cultures allows a more realistic mimetization of the *in vivo* tumor microenvironment. To achieve this goal, a homotypic 3D cellular model of prostate cancer was developed and optimized, using the liquid overlay technique on ultra-low attachment plates specific for the formation of spheroids. Then, the radiobiological effects of the radiopharmaceutical, at the level of cell proliferation and survival, were studied in two cell lines of metastatic prostate cancer, after exposure of PC3 and LNCaP cells, cultivated in 2D, to different volumic activities (55-7 040 Bq/mL) and different exposure times. The effects of radium-223 exposure were also evaluated in 3D cultures, more specifically in homotypic PC3 spheroids, at the level of the spheroids structure and morphology as well as regarding to cell viability and types of death.

In general, irradiation of PC3 and LNCaP cells in 2D culture induced a decrease in cell proliferation and survival, increasing with increasing initial volumic activity of radium-223 and duration of exposure to this radiopharmaceutical. Furthermore, LNCaP cells showed a higher radiosensitivity to radium-223 compared to PC3 cells, which may be related to the different origins of the two cell lines.

The 3D cell model of prostate cancer, optimized throughout this project, allowed the fast production of cohesive, compact, and reproducible PC3 spheroids, which remained in culture without disintegrating for several days, enabling long-term radiobiology assays. However, the use of the same methodology with the LNCaP cell line did not form consistent spheroids, because the cells were

dispersed in the wells in small aggregates. Exposure of PC3 spheroids to radium-223 led to their progressive disintegration over time and, consequently, to the decrease in their size. The disintegration of the spheroids was observed mainly in the peripheral region, increasing the greater the initial volumic activity of radium-223. There was also a decrease in cell viability and an increase in cell death, especially by apoptosis, with the increase of the initial volumic activity of radium-223. Corroborating these results, it was observed a higher number of morphological changes in cells from irradiated spheroids, mainly features of cell death by apoptosis.

In conclusion, the results showed that radium-223 had a cytotoxic effect in both cell models of prostate cancer (2D and 3D), in particular a decrease in proliferation, survival, and cell viability, associated with increased cell death mainly by apoptosis. These results reinforce the potential use of this radiopharmaceutical in the treatment of patients at an advanced stage of the disease, especially with metastatic castration-resistant prostate cancer. Comparing the effects of radium-223 between the 2D and 3D cell models, less radiobiological effects were observed in PC3 spheroids, for the same volumic activity, which means a better reproduction of the *in vivo* microenvironment. Thus, the 3D cell model developed in this project may be used and adapted to develop more complex three-dimensional cell structures, with more similarities to the metastatic niche of prostate cancer, in order to better understand the mechanism of action of radium-223 and maximize its applicability.

Keywords: Metastatic castration-resistant prostate cancer; Targeted alpha therapy; Radium-223; 3D cell culture; Spheroids.

Índice

Agradecimentos	VII
Resumo.....	IX
Abstract	XI
Índice de Figuras.....	XV
Índice de Tabelas.....	XIX
Índice de Equações.....	XIX
Lista de Abreviaturas e Símbolos	XXI
1. Introdução.....	25
1.1. Radioatividade na medicina.....	29
1.1.1. Tipos de radiação	29
1.1.2. Aplicações médicas da radiação ionizante.....	31
1.1.2.1. Terapêutica	31
1.1.3. Terapia alfa dirigida: da física aos efeitos biológicos.....	33
1.1.4. Benefícios da terapia alfa dirigida: 5 R's da radiobiologia e as <i>hallmarks</i> do cancro.....	35
1.1.5. O rádio-223.....	37
1.2. Cancro da próstata	38
1.2.1. A próstata	38
1.2.2. Epidemiologia.....	40
1.2.2.1. Fatores de risco.....	41
1.2.3. Evolução do cancro da próstata.....	42
1.2.3.1. Importância dos recetores de androgénios.....	43
1.2.3.2. Resistência à castração	44
1.2.3.3. Cancro da próstata metastático resistente à castração	45
1.2.4. Diagnóstico.....	48
1.2.4.1. Estadiamento	50
1.2.5. Terapêutica.....	51
1.3. Rádio-223 no tratamento do CPMRC.....	53
1.3.1. Administração, farmacocinética e dosimetria	54
1.3.2. Mecanismo de ação do rádio-223.....	55
1.4. Culturas celulares tridimensionais (3D)	56
1.4.1. Evolução das culturas celulares: do 2D ao 3D.....	56

1.4.2.	Tipos de culturas celulares 3D.....	57
1.4.3.	Importância das culturas celulares 3D na representação do microambiente tumoral.....	59
1.4.4.	Culturas celulares 3D como modelos pré-clínicos do CaP.....	61
2.	Objetivos	63
3.	Materiais e Métodos	67
3.1.	Cultura celular	70
3.1.1.	Culturas celulares 2D de CaP.....	70
3.1.2.	Culturas celulares 3D de CaP.....	72
3.2.	Irradiação das culturas celulares de CaP com rádio-223	77
3.3.	Estudo dos efeitos radiobiológicos do rádio-223.....	79
3.3.3.	Em culturas celulares 2D de CaP	79
3.3.3.1.	Análise do conteúdo proteico celular através do ensaio de sulforodamina B.....	79
3.3.3.2.	Avaliação da sobrevivência celular através do ensaio clonogénico	80
3.3.4.	Em culturas celulares 3D de CaP	82
3.3.4.1.	Avaliação da estrutura dos esferoides.....	82
3.3.4.2.	Análise da viabilidade celular através do ensaio de viabilidade <i>CellTiter-Glo® 3D</i>	84
3.3.4.3.	Análise dos esferoides de CaP através de microscopia confocal	85
3.3.4.4.	Estudo da morfologia celular através do método de coloração <i>Giemsa</i> ...	86
3.4.	Análise estatística.....	87
4.	Resultados	89
4.1.	Estabelecimento de culturas celulares 3D de CaP	91
4.2.	Estudo dos efeitos radiobiológicos do rádio-223.....	95
4.2.1.	Em culturas celulares 2D de CaP	95
4.2.1.1.	Conteúdo proteico celular	95
4.2.1.2.	Sobrevivência celular	100
4.2.2.	Em culturas celulares 3D de CaP	102
4.2.2.1.	Estrutura dos esferoides	102
4.2.2.2.	Viabilidade celular.....	110
4.2.2.3.	Morfologia celular.....	114
5.	Discussão	117
6.	Conclusão e Perspetivas Futuras.....	133
7.	Bibliografia	139

Índice de Figuras

Figura 1: Radiografia da amostra de pecheblenda obtida por Becquerel, em 1 de março de 1896, representando a descoberta da radioatividade. Retirado de (Jönsson, 2021).....	27
Figura 2: Percurso das partículas alfa (a) e das partículas beta (b) ao atravessarem as células. Adaptado de (Naskar & Lahiri, 2021).....	33
Figura 3: Efeitos diretos (a) e indiretos (b) da radiação ionizante (RI). Adaptado de (Flowers <i>et al.</i> , 2015).....	35
Figura 4: Representação esquemática do decaimento do rádio-223, com as energias de cada partícula alfa emitida. Adaptado de (Abou <i>et al.</i> , 2015).....	37
Figura 5: Esquema do gerador $^{227}\text{Ac}/^{227}\text{Th}$	38
Figura 6: (A) Representação esquemática da localização da próstata (a vermelho) no sistema urogenital masculino. (B) Localização das quatro zonas da próstata. Retirado de (Sauer <i>et al.</i> , 2020)	39
Figura 7: Estimativa e comparação das taxas de incidência e mortalidade por tipo de cancro, no mundo e em Portugal, em 2020, no sexo masculino e para todas as idades. Adaptado de (GLOBOCAN, 2020a).....	40
Figura 8: Etapas da transformação maligna da próstata, começando pela neoplasia intraepitelial e podendo progredir até ao CaP metastático. Adaptado de (Barbeau, 2018)	42
Figura 9: Esquema representativo das etapas principais da cascata metastática. Retirado de (Hapach <i>et al.</i> , 2019).....	46
Figura 10: “Ciclo vicioso” das metástases ósseas. Retirado de (Furesi <i>et al.</i> , 2021).....	47
Figura 11: Evolução da escala de <i>Gleason</i> . a) Escala original, b) Escala atual, estabelecida pela <i>International Society of Urological Pathology</i> (ISUP), em 2014. Adaptado de (Paner <i>et al.</i> , 2019)	50
Figura 12: Terapias do CPMRC, aprovadas e em desenvolvimento, e respetivos alvos. Retirado de (Frieling <i>et al.</i> , 2015).....	53
Figura 13: Mecanismo de ação do rádio-223 nas metástases ósseas. Retirado de (Suominen <i>et al.</i> , 2019).....	56
Figura 14: Representação de culturas 2D, esferoides e organoides. Adaptado de (Sakalem <i>et al.</i> , 2021).....	58
Figura 15: Estrutura típica de um esferoide tumoral multicelular. Retirado de (B. Pinto <i>et al.</i> , 2020) 60	
Figura 16: Imagens de células PC3 (esquerda) e de células LNCaP (direita), adquiridas num microscópio ótico invertido, com uma ampliação de 100×.....	71
Figura 17: Gotas de PBS na tampa da placa de 24 poços não aderente.	73
Figura 18: Placa de 24 poços não aderente com uma gota de suspensão celular em cada poço, colocada sobre a tampa com as gotas de PBS.....	73
Figura 19: Esquema do processo de formação dos esferoides, com diferentes concentrações, através da técnica hanging drop. (Esquema criado no BioRender)	74
Figura 20: Placa de levitação colocada sobre a placa de 24 poços não aderente.	75
Figura 21: Placa magnética de concentração.....	76

Figura 22: Corning® 96-well Black/Clear Round Bottom ULA Spheroid Microplate.	76
Figura 23: Esquema da irradiação das células a) PC3 e b) LNCaP, em placas de 24 poços, para a realização do ensaio de SRB. (Esquema criado no BioRender)	78
Figura 24: Linha temporal do estabelecimento e irradiação de culturas 3D de CaP. O dia 0 corresponde à colocação de 200 µL de uma suspensão celular com 25 000 células/mL em cada poço de uma placa de 96 poços. No dia 1 foi possível visualizar os esferoides macroscopicamente. No dia 2 procedeu-se à sua irradiação com 7 atividades volúmicas de rádio-223. No dia 3 substituiu-se o meio e os esferoides foram mantidos numa incubadora a 37°C até ao dia 10, para a realização de ensaios e avaliação dos efeitos do rádio-223. (Esquema criado no BioRender)	79
Figura 25: Exemplo de delimitação de um esferoide (amarelo) no programa ImageJ e medição da respetiva área (verde) e perímetro (laranja), em mm.	82
Figura 26: Interface e fluxograma do software AnaSP. Foram retirados os parâmetros rodeados a vermelho.	83
Figura 27: Princípio do ensaio CellTiter-Glo® 3D. Retirado de (Promega, 2015).....	84
Figura 28: Interface do programa Zen 3.6 Blue Edition, com o exemplo de um dos esferoides obtidos e que foi marcado com DAPI (marcação azul). As imagens da galeria (verde) correspondem a vários planos do esferoide, a partir dos quais é possível obter a reconstrução 3D (laranja).....	86
Figura 29: Esquema e imagens representativas da evolução dos esferoides produzidos através da junção das técnicas de hanging drop e de levitação magnética, ao longo de 6 dias, com uma concentração inicial de 10 000 células/esferoide. O dia 1 corresponde a 24 horas depois da adição do meio aos poços. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio invertido com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 1 mm.....	91
Figura 30: Esquema e imagens representativas da evolução de esferoides de 5000 células PC3 produzidos na placa ULA da BIOFLOAT™, ao longo de 10 dias. O dia 1 corresponde a 24 horas depois de semear as células nos poços. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio invertido com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 1 mm.....	92
Figura 31: Esquema e imagens representativas da evolução de esferoides de 5000 células PC3 produzidos na placa ULA da Corning®, ao longo de 10 dias. O dia 1 corresponde a 24 horas depois de semear as células nos poços. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio invertido com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 1 mm.....	93
Figura 32: Imagens de vários planos de um esferoide de células PC3, mantido em cultura durante 10 dias e depois marcado com DAPI. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio confocal com uma ampliação de 200X. A escala apresentada nas imagens corresponde a 500 µm.....	94
Figura 33: Esquema e imagens representativas da evolução de esferoides de 5 000 células LNCaP produzidos na placa Corning®, ao longo de 3 dias. O dia 1 corresponde a 24 horas depois de semear as células nos poços. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio invertido com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 1 mm.....	95
Figura 34: Análise do conteúdo proteico celular das células PC3 através do ensaio de SRB, realizado 5 ou 7 dias após irradiação com atividades iniciais entre 0 e 7 040 Bq/mL. Os resultados estão agrupados pelos tempos de exposição ao rádio-223 de 4 (a), 24 (b) ou 48 (c) horas. Os resultados foram normalizados ao controlo não irradiado e são apresentados como a média±erro padrão da percentagem de conteúdo proteico de, pelo menos, 5 experiências independentes realizadas em triplicado. ANOVA de dois fatores e teste de Tukey (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,0001).	96

Figura 35: Análise do conteúdo proteico celular das células PC3 após irradiação com atividades iniciais entre 0 e 7040 Bq/mL, durante 4, 24 ou 48 horas. Os resultados estão agrupados segundo o tempo após a irradiação em que os efeitos foram avaliados, nomeadamente aos 5 dias (a) ou 7 dias (b). Os resultados foram normalizados ao controlo não irradiado e são apresentados como a média±erro padrão da percentagem de conteúdo proteico de, pelo menos, 5 experiências independentes realizadas em triplicado. ANOVA de dois fatores e teste de Tukey (*p<0,05; **p<0,01).	97
Figura 36: Análise do conteúdo proteico celular das células LNCaP através do ensaio de SRB, realizado 5 ou 7 dias após irradiação com as atividades iniciais de 0, 55, 3 520 ou 7 040 Bq/mL de rádio-223 durante 24 horas. Os resultados foram normalizados ao controlo não irradiado e são apresentados como a média±erro padrão da percentagem de conteúdo proteico de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em sextuplicado. ANOVA de dois fatores e teste de Tukey (**p<0,01, ****p<0,0001).	99
Figura 37: Sobrevivência celular da linha celular PC3, medida através do ensaio clonogénico, após irradiação com atividades iniciais entre 0 e 7 040 Bq/mL de rádio-223 durante 4 (a) ou 24 (b) horas. Os resultados são apresentados como a média±erro padrão do FS de 5 experiências independentes realizadas em duplicado. ANOVA de 1 fator e teste de Holm-Sidak (*p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001).	100
Figura 38: Comparação entre os resultados obtidos no ensaio clonogénico para as 4 horas (preto) e as 24 horas (cinzento) de irradiação. Os resultados são apresentados como a média±erro padrão do fator de sobrevivência celular (FS) de 5 experiências independentes realizadas em duplicado. ANOVA de 2 fatores e teste de Sidak (*p<0,05; ***p<0,001; ****p<0,0001).	101
Figura 39: Painel de evolução dos esferoides de células PC3, com imagens adquiridas nos dias 2, 4, 7 e 10, em que o dia 2 corresponde ao dia em que os esferoides foram irradiados com as atividades iniciais indicadas na figura (0-7 040 Bq/mL). Para obtenção destas imagens, recorreu-se a um microscópio ótico invertido, com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 1 mm, igual para todas as imagens.	103
Figura 40: Evolução da a) área, b) perímetro e c) circularidade dos esferoides de células PC3, durante os 10 dias em que foram mantidos em cultura. Os esferoides analisados foram expostos durante 24 horas a atividades iniciais de rádio-223 entre 0 e 7 040 Bq/mL. Os resultados são apresentados como a média±erro padrão de 4 experiências independentes realizadas em triplicado. A análise estatística corresponde à comparação entre os dias 1 e 10, para todas as condições de irradiação.....	105
Figura 41: Evolução da a) área, b) perímetro, c) diâmetro equivalente, d) circularidade, e) esfericidade e f) compacidade dos esferoides de células PC3, durante os 10 dias em que foram mantidos em cultura. Os esferoides analisados foram expostos durante 24 horas a atividades iniciais de rádio-223 entre 0 e 7 040 Bq/mL. Os resultados são apresentados como a média±erro padrão de 4 experiências independentes realizadas em triplicado. A análise estatística corresponde à comparação entre os dias 1 e 10, para todas as condições de irradiação.	108
Figura 42: Análise da viabilidade celular relativa (%) das células PC3 constituintes dos esferoides, obtida através do ensaio CellTiter-Glo® 3D, realizado 7 dias após irradiação com as atividades volúmicas iniciais entre 0 e 7 040 Bq/mL. Os resultados são apresentados como a média±erro padrão de 3 experiências independentes realizadas em triplicado. ANOVA de 1 fator e teste de Tukey (**p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).	110
Figura 43: Imagens representativas de planos Z de esferoides de células PC3, irradiados com 0, 55, 3520 e 7040 Bq/mL, marcados com AnV/IP 7 dias após irradiação. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio confocal com uma ampliação de 10X. A escala apresentada corresponde a 500 µm.....	112

Figura 44: Reconstrução 3D de esferoides de células PC3, irradiados com 0, 55, 3 520 e 7 040 Bq/mL e marcados com AnV/IP 7 dias após irradiação, a partir das imagens dos planos Z. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio confocal com uma ampliação de 10X. 113

Figura 45: Análise morfológica de células PC3 de esferoides, através da coloração por Giemsa, realizada 7 dias após irradiação com 0, 55, 880, 3 520 e 7 040 Bq/mL de rádio-223 durante 24 horas. São apresentadas 4 imagens representativas de cada condição. As setas correspondem a características morfológicas que podem indicar apoptose ou necrose. A seta amarela corresponde à condensação da cromatina. A seta azul corresponde a blebbings. A seta verde corresponde a células binucleadas. A seta vermelha corresponde a vacuolização citoplasmática. A seta laranja corresponde a fragmentação nuclear. A seta rosa corresponde ao extravasamento do citoplasma. A preto estão rodeados micronúcleos. Para obtenção destas imagens, recorreu-se a um microscópio ótico, com uma ampliação de 400X..... 115

Índice de Tabelas

Tabela 1: Dosimetria do $^{223}\text{RaCl}_2$ no corpo humano. Adaptado de (Pandit-Taskar <i>et al.</i> , 2014).	55
Tabela 2: Número de células semeadas por poço para o ensaio clonogénico, com base na atividade e no tempo de irradiação.	81
Tabela 3: Análise estatística da Figura 12, através do teste ANOVA de 2 fatores e respetivos valores-p, em termos da comparação entre os esferoides controlo e os irradiados com as várias atividades, no dia 10, ou seja, 7 dias após irradiação (*p<0,05; **p<0.001; ***p<0.0001). ...	106
Tabela 4: Análise estatística da Figura 13, através do teste ANOVA de 2 fatores e respetivos valores-p, em termos da comparação entre os esferoides controlo e os irradiados com as várias atividades, no dia 10, ou seja, 7 dias após irradiação (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).	109

Índice de Equações

Equação 1: Cálculo da concentração celular através do método de exclusão de azul tripano. .	72
Equação 2: Equação do cálculo do conteúdo proteico celular, com base nas absorvâncias medidas no espectrofotómetro.	80
Equação 3: Cálculo da eficiência da placa.	82
Equação 4: Cálculo do fator de sobrevivência celular.	82
Equação 5: Cálculo da circularidade dos esferoides. A área e o perímetro foram medidos com o <i>software ImageJ</i> (C. Pinto <i>et al.</i> , 2020).	83

Lista de Abreviaturas e Símbolos

¹¹C: Carbono-11

¹⁸F: Flúor-18

⁸⁹Sr: Estrôncio-89

¹⁵³Sm-EDTMP: Ácido etilenodiaminatetrametileno fosfónico marcado com samário-153

²²³Ra: Rádio-223

²²³RaCl₂: Dicloreto de rádio-223

²²⁷Ac: Actínio-227

²²⁷Th: Tório-227

2D: Duas dimensões

3D: Três dimensões

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADT: *Androgen deprivation therapy*

ALARA: *As Low As Reasonably Achievable*

ALSYMPCA: *ALpharadin in SYMPTomatic Prostate Cancer*

AnV: Anexina V

ARN: Ácido ribonucleico

ATCC: *American Type Culture Collection*

Bq: Becquerel

BRCA2: *Breast cancer 2*

CaP: Cancro da próstata

CPMRC: Cancro da próstata metastático resistente à castração

CPRC: Cancro da próstata resistente à castração

d: Dias

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DL₅₀: Dose letal média

EGF: *Epidermal growth factor*

EMA: *European Medicines Agency*

EP: Eficiência da placa

FBS: *Fetal bovine serum*

FDA: *Food and Drug Administration*

FS: Fator de sobrevivência

GnRH: *Gonadotropin-releasing hormone*

Gy: Gray

h: Horas

H₂O₂: Peróxido de hidrogénio

HBP: Hiperplasia Benigna Prostática

HOXB13: *Homeobox B13*

HSP: *Heat-shock proteins*

IDH: Índice de Desenvolvimento Humano

IGF-1: *Insulin-like growth-factor-1*

IP: Iodeto de propídio

kBq: Kilobecquerel

keV: Kilo eletrão-volt

KGF: *Keratinocyte growth factor*

LET: *Linear energy transfer*

LH: *Luteinizing hormone*

LHRH: *Luteinizing hormone-releasing hormone*

M-CSF: *Macrophage colony-stimulating factor*

OH•: Radical hidroxilo

PBS: *Phosphate buffered saline*

PET: *Positron Emission Tomography*

PSA: *Prostate specific antigen*

RANKL: *Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*

RM: Ressonância Magnética

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

ROS: *Reactive oxygen species*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SPECT: *Single-Photon Emission Computerized Tomography*

SRB: *Sulforodamina B*

SSCs: *Primitive skeletal stem cells*

Sv: *Sievert*

TC: *Tomografia Computorizada*

TNM: *Tumour-Node-Metastasis*

ULA: *Ultra-low attachment*

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

1. Introdução

A descoberta dos raios-X, em 1895, por Konrad Von Roentgen, constituiu um ponto de viragem no diagnóstico médico. Com esta descoberta tornou-se possível a avaliação precisa de órgãos internos que antes eram inacessíveis, sendo umas das primeiras aplicações dos raios-X a visualização de ossos, do trato gastrointestinal, das vias biliares e de vasos sanguíneos. Esta técnica permanece até à atualidade, tendo, no entanto, surgido métodos mais precisos e sofisticados, como a Tomografia Computorizada (TC) e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (Kulakowski, 2011; Mazon & Gerbaulet, 1999).

A descoberta deste novo tipo de radiação impulsionou a investigação na área da radiação e, em 1896, Henri Becquerel descreveu, pela primeira vez, a existência de uns raios invisíveis emitidos pelo urânio enquanto estudava as propriedades de fosforescência de cristais deste elemento. Esta descoberta começou com a exposição de uma amostra de pecheblenda, minério que contém cristais de urânio, à luz solar, durante várias horas, colocando-a, de seguida, sobre uma placa fotográfica protegida da luz por papel preto. Quando revelou a placa, reparou que esta estava escurecida, concluindo que a fosforescência da pecheblenda estaria provavelmente associada à emissão de radiação semelhante aos raios-X. No entanto, quando quis repetir esta experiência, o céu nublado obrigou-o a adiar a sua realização e arrumou a amostra numa gaveta junto a uma placa fotográfica. Passado alguns dias, acabou por revelar a placa e notou que esta se encontrava novamente escurecida, apesar da amostra de pecheblenda não ter sido exposta à luz solar (Figura 1). Assim, concluiu que o minério de urânio tinha a capacidade de emitir radiação espontânea, de natureza desconhecida e que não estava ligada à sua fosforescência, a qual designou por “raios urânicos” (F. P. Carvalho, 2011; Jönsson, 2021).

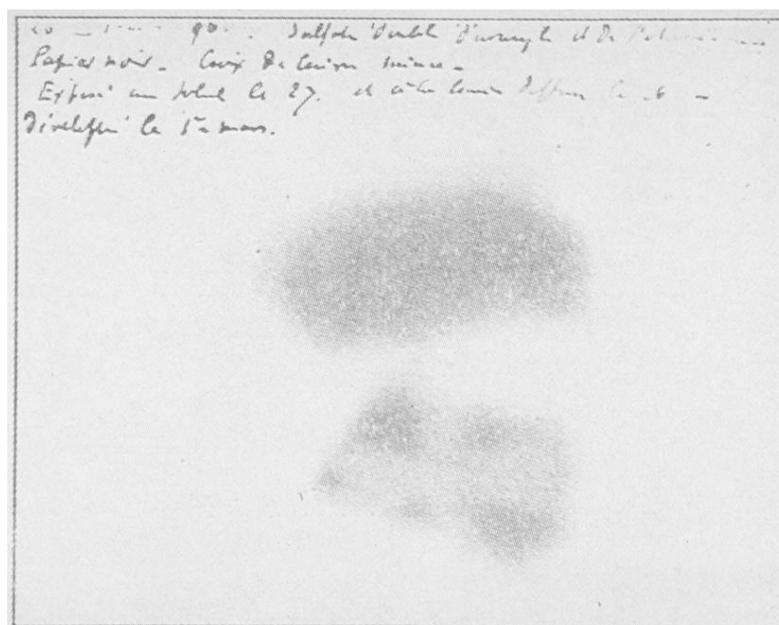


Figura 1: Radiografia da amostra de pecheblenda obtida por Becquerel, em 1 de março de 1896, representando a descoberta da radioatividade. Retirado de (Jönsson, 2021)

Esta descoberta deixou Marie e Pierre Curie curiosos e interessados nestes “raios urânicos”, posteriormente denominados de radioatividade, incentivando a investigação da origem deste fenômeno, assim como a descoberta de novas substâncias radioativas. Deste modo, começaram a trabalhar num laboratório em Paris onde, tal como Henri Becquerel, realizaram experiências com a pecheblenda (Mazon & Gerbaulet, 1999). Marie e Pierre Curie, ao realizarem várias medições com um eletrômetro, verificaram que a pecheblenda era cerca de 2,5 vezes mais radioativa do que o urânio metálico, o que indicava a presença de uma ou mais substâncias responsáveis por essa elevada radioatividade. Ao separarem o urânio da pecheblenda, repararam que a fração que continha o bismuto possuía uma elevada radioatividade, proveniente de uma substância radioativa ainda desconhecida. Em 1898, com o objetivo de identificar esta substância, procederam à sua separação química e depois, pela análise espectral, confirmou-se a existência de picos deste novo elemento, que denominaram por polônio. Nesse mesmo ano, após a descoberta do polônio, mediram ainda uma intensa radioatividade na fração do bário e a análise espectroscópica revelou picos que não correspondiam a nenhum elemento conhecido, o que significava a existência de outro elemento radioativo presente na pecheblenda, mais radioativo do que o urânio e o polônio, o qual denominaram por rádio. No seguimento desta descoberta, estes cientistas empenharam-se em tentar isolar o rádio na forma pura e determinar as suas propriedades físico-químicas. Em 1902, separaram uma pequena amostra de cloreto de rádio e determinaram a sua massa atômica e, em 1910, Marie Curie conseguiu isolar o rádio metálico puro. Naquela altura, o rádio era o elemento mais radioativo que se conhecia (F. P. Carvalho, 2011; Jönsson, 2021; Mazon & Gerbaulet, 1999).

A descoberta do rádio foi acolhida com grande entusiasmo e a sua utilização foi amplamente diversificada através da adição de rádio a vários produtos que prometiam o rejuvenescimento da pele e até a cura de algumas doenças como, por exemplo, cosméticos, sabões, fármacos, tónicos, pastas de dentes, água e outros alimentos. À data, sendo a radioatividade uma descoberta recente, não se conheciam os efeitos nocivos da radiação emitida pelo rádio, logo, as pessoas utilizavam estes produtos sem qualquer tipo de proteção. Decorrente da sua utilização generalizada, foram aparecendo queimaduras e irritações na pele, o que levou os cientistas a concluir que a radioatividade poderia ter graves consequências para o nosso organismo. Como o rádio brilhava espontaneamente no escuro, foi também usado em tintas para pintar mostradores de relógios e outros instrumentos, durante a Primeira Guerra Mundial. Para este trabalho, foram contratadas milhares de mulheres, as quais afilavam com os lábios a ponta do pincel, de modo a este ficar mais fino e aumentar a precisão da pintura, ingerindo diariamente rádio. Estas mulheres, que ficaram conhecidas como “*Radium Girls*”, foram as primeiras trabalhadoras americanas vítimas de envenenamento por exposição à radiação, desenvolvendo mais tarde doenças que, em alguns casos, levaram à morte. A história das “*Radium Girls*” teve um grande impacto no campo da física médica e levou ao desenvolvimento do conceito de dose, com o aparecimento de dosímetros para a medição quantitativa da exposição à radiação (Clark, 1987; Gunderman & Gonda, 2015; Mazon & Gerbaulet, 1999).

1.1. Radioatividade na medicina

Após a descoberta da radioatividade, alguns cientistas verificaram que ao transportarem um tubo com rádio nos seus casacos durante alguns dias levava ao aparecimento de queimaduras na pele, permitindo-lhes concluir que a exposição ou o contacto de substâncias radioativas com tecidos vivos tinha efeitos adversos, os quais dependiam da duração da exposição. Esta observação contribuiu para o estudo das propriedades biológicas das radiações, mais especificamente a sua capacidade de destruir as células, a qual foi explorada para o tratamento de certas doenças da pele e tumores (Goldsmith, 2020). O dermatologista Henri Danlos foi pioneiro na utilização do rádio em contexto clínico, tendo tratado com sucesso vários doentes com lúpus eritematoso e outras doenças dermatológicas. Relativamente ao tratamento do cancro, fontes de rádio de baixa atividade eram usadas em braquiterapia, começando por colocar o rádio diretamente na superfície dos tumores e, mais tarde, profundamente no tumor. Alguns dos primeiros cancros a serem tratados com este método foram o cancro da vagina, do colo do útero, da mama, da próstata, do esófago e do cérebro. Outra das técnicas desenvolvidas no início do século 20 foi a radioterapia externa, para a qual se utilizavam fontes de rádio de maior atividade. Apesar destas técnicas terem sido amplamente usadas durante décadas, eram bastante perigosas para os médicos que as realizavam, devido à falta de dosimetria adequada e risco de contacto direto com o material radioativo. À medida que o uso dos raios-X e do rádio aumentava, a comunidade científica foi-se apercebendo da necessidade de estabelecer regras de proteção, desenvolvendo métodos de deteção e otimização do uso da radiação (Bruland *et al.*, 2008; F. P. Carvalho, 2011; Jönsson, 2021; Kułakowski, 2011).

Ao longo dos anos, a investigação sobre os radioisótopos e as suas possíveis aplicações representaram um papel muito importante na evolução da radioquímica e do uso clínico da radiação, tanto no diagnóstico como na terapêutica médica (Bruland *et al.*, 2008).

1.1.1. Tipos de radiação

A radiação pode ser classificada como ionizante ou não ionizante. A radiação não ionizante não tem energia suficiente para ionizar átomos ou moléculas, sendo exemplos deste tipo de radiação as ondas de rádio, as microondas e a luz visível. Pelo contrário, a radiação ionizante é um tipo de radiação que, ao interagir com a matéria, forma iões, pois tem energia suficiente para remover eletrões dos átomos ou moléculas, sendo este processo designado ionização. Esta radiação é emitida durante o decaimento radioativo de átomos instáveis, os quais são denominados radionuclídeos. A radiação ionizante pode ser dividida em duas categorias principais, os fotões, nomeadamente os raios-X e os raios gama, e as partículas, em específico os protões, os neutrões, as partículas beta e as partículas alfa. Uma das principais diferenças entre os vários tipos de radiação ionizante é o tipo e a quantidade de energia que podem transportar. Quanto maior for a energia, mais profundamente a radiação consegue penetrar nos

materiais ou nos tecidos biológicos. Os radionuclídeos são identificados pelo tipo de radiação que emitem, a energia que a radiação transporta e o seu tempo de meia-vida. A radiação ionizante possui diversas aplicações benéficas, nomeadamente na medicina, na indústria, na agricultura e na investigação (American Cancer Society, 2014; World Health Organization, 2016).

Na radiobiologia, as emissões alfa, beta, gama e de raios-X, e a curto prazo os prótons, são as mais relevantes pois são as fontes mais utilizadas na medicina de diagnóstico ou terapêutica.

Começando pelas partículas alfa, estas têm dupla carga positiva e são constituídas por dois prótons e dois neutrões, tendo a mesma estrutura de um núcleo de hélio. São normalmente emitidas por núcleos radioativos pesados, como por exemplo núcleos de urânio, de actínio e de rádio. Apesar de serem muito energéticas, são pesadas e, por isso, deslocam-se a uma relativamente baixa velocidade, o que leva à perda de energia num curto percurso, bastando uma folha de papel ou a pele humana para travar estas partículas. Esta característica está relacionada com a transferência linear de energia (LET, do inglês *linear energy transfer*), que consiste na quantidade de energia que uma partícula ionizante transfere para um material por unidade de comprimento de percurso, expressa normalmente em keV/ μm (Donya *et al.*, 2014; Flowers *et al.*, 2015). Deste modo, as partículas alfa são consideradas radiação de elevada LET, na ordem dos 80-100 keV/ μm , o que significa que depositam uma grande quantidade de energia numa curta distância, pelo que são pouco penetrantes (Marques *et al.*, 2018).

As partículas beta, que podem ser eletrões (β^-) ou positrões (β^+), são partículas pequenas e que se movimentam com elevada velocidade. O decaimento por emissão β^- ocorre quando a razão neutrões/prótons é elevada, o que significa que há excesso de neutrões. Assim, um neutrão é convertido num próton com emissão de um eletrão de elevada energia e de um antineutrino. O decaimento β^+ ocorre quando a razão prótons/neutrões é elevada, havendo conversão de um próton num neutrão com emissão de um positrão e de um neutrino. Ao contrário das partículas alfa, as partículas beta são consideradas radiação de baixo LET, ou seja, depositam a sua energia ao longo de uma distância maior e, por isso, são mais penetrantes do que as partículas alfa (Donya *et al.*, 2014; Flowers *et al.*, 2015).

Os raios-X e os raios gama são ambas ondas eletromagnéticas que se distinguem através da sua frequência, ou seja, da sua energia. Relativamente ao poder de penetração, os raios-X são menos penetrantes do que os raios gama, devido à sua menor energia. Em contrapartida, os raios gama são altamente energéticos e, conseqüentemente, conseguem atravessar mais facilmente o corpo humano. Assim, para atenuar e proteger desta radiação são necessários elementos densos e de elevado número atómico, tais como o chumbo. No que se refere à capacidade de ionização dos raios gama, é 20 vezes menor do que a capacidade das partículas alfa (Donya *et al.*, 2014).

No dia-a-dia, estamos expostos a baixas doses de radiação ionizante proveniente de fontes naturais, nomeadamente de radionuclídeos presentes na água, no solo e na vegetação. Além das fontes naturais, existem também fontes de radiação desenvolvidas pelo Homem, tais como

a geração de energia nuclear e as aplicações na medicina, tanto para diagnóstico como para tratamento. Algumas das fontes médicas mais comuns são a radiologia convencional, a TC, os procedimentos de medicina nuclear e a radioterapia. (Donya *et al.*, 2014; World Health Organization, 2016).

1.1.2. Aplicações médicas da radiação ionizante

Nos últimos anos, o uso da radiação ionizante no diagnóstico e no tratamento de diversas patologias aumentou drasticamente. Apesar de ter várias vantagens, este aumento significa também uma maior exposição à radiação, levando ao aumento dos riscos para a saúde. Por este motivo, a exposição à radiação ionizante deve ser controlada e a relação risco/benefício deve estar sempre na base da tomada de decisões clínicas (Donya *et al.*, 2014). Os danos nos tecidos e nos órgãos provocados por este tipo de radiação dependem da dose absorvida, expressa em gray (Gy), assim como do tipo de radiação e da radiosensibilidade dos diferentes tecidos e órgãos e consequente dose efetiva, expressa em sievert (Sv). Como consequência dos danos, aparecem os efeitos biológicos, alguns dos quais só surgem quando as doses de radiação excedem certos valores, denominados dose limiar. Ultrapassada essa dose, surgem os efeitos agudos da radiação, tais como a vermelhidão na pele, a perda de cabelo, as queimaduras e as síndromes agudas da radiação. Quanto maior for a dose, mais graves são estes efeitos. Por outro lado, quando são administradas baixas doses de radiação durante um longo período de tempo, os riscos são menores, no imediato, pois há uma maior probabilidade de reparação dos danos. No entanto, existe um maior risco de desenvolver efeitos a longo prazo, como por exemplo cancro, os quais podem aparecer anos ou mesmo décadas mais tarde. A probabilidade destes efeitos ocorrerem é proporcional à dose de radiação (World Health Organization, 2016).

A radiação ionizante tem vindo a desempenhar um papel muito importante no desenvolvimento e no aperfeiçoamento do diagnóstico médico, estando envolvida em diversas técnicas de obtenção de imagens radiológicas, tais como a radiografia planar, a TC, a angiografia, a *Single-Photon Emission Computerized Tomography* (SPECT) e a *Positron Emission Tomography* (PET) (P. Morris & Perkins, 2012). No entanto, tendo em conta os objetivos deste projeto, apenas será aprofundada a aplicação da radiação ionizante na terapêutica médica.

1.1.2.1. Terapêutica

A radiação ionizante é largamente utilizada como arma terapêutica, nomeadamente no âmbito do tratamento de doenças oncológicas, devido à capacidade em interagir com as células cancerígenas e de bloquear o seu crescimento e proliferação, acabando por provocar morte celular e a regressão do tumor. Assim, os principais objetivos do uso da radiação ionizante, no contexto terapêutico, são o tratamento de cancros num estágio inicial, a inibição da recorrência

dos tumores e o tratamento paliativo de sintomas causados por cancro em estádios avançados. A radiação ionizante pode ser aplicada na forma de radioterapia de fonte externa, de radioterapia de fonte interna, também designada por braquiterapia, ou através da administração de radiofármacos (American Cancer Society, 2014).

A radioterapia de fonte externa é a mais utilizada na prática clínica e, tal como o nome indica, a fonte de emissão de radiação é externa ao doente. O feixe de radiação é geralmente de raios-X ou de eletrões de alta energia, produzidos por aceleradores lineares, que apesar de ser focado no tumor, na maioria dos casos também afeta os tecidos saudáveis que atravessa durante o percurso do feixe (American Cancer Society, 2014; Tobias & Silverman, n.d.). Ao longo dos anos, foram desenvolvidas variantes da radioterapia externa, com diferentes métodos de administração da radiação, como por exemplo a radioterapia conformacional tridimensional, a radioterapia de intensidade modulada e a radioterapia estereotáxica (American Cancer Society, 2014; Minniti *et al.*, 2012).

A radioterapia de fonte interna, ou braquiterapia, baseia-se na colocação de fontes de radiação na zona do tumor ou na área circundante. A radiação apenas percorre distâncias curtas, pelo que há um menor risco de danos nos tecidos normais. Logo, é principalmente útil no caso de tumores que sejam acessíveis, que necessitem de doses elevadas ou que se encontrem perto de tecidos normais de elevada radiosensibilidade (American Cancer Society, 2014). Os principais tipos de braquiterapia são a braquiterapia intersticial e a braquiterapia intracavitária (Bortfeld & Jeraj, 2011).

Por fim, outra das terapias para o cancro com recurso à radiação ionizante é a administração de radiofármacos, que consistem em radionuclídeos ligados a moléculas específicas (moléculas simples, hormonas, anticorpos, entre outros). Dependendo do tipo de radiofármaco e das suas características, após a administração, este direciona-se para o local onde os tumores estão localizados, onde emite radiação capaz de destruir as células tumorais. Comparando com os exames de diagnóstico, são usadas doses de radiação mais elevadas com o intuito de induzir a morte nos tecidos tumorais (Moreira, 2020). Uma das aplicações mais importantes dos radiofármacos é a terapia dirigida, que consiste na introdução de um agente terapêutico (o radiofármaco) no organismo, o qual se vai localizar numa zona específica do tumor devido a especificidades fisiológicas ou bioquímicas, como, por exemplo, a afinidade por um recetor, uma enzima ou um antígeno. Os radiofármacos mais comumente utilizados na radioterapia dirigida são os emissores beta ou alfa (Goldsmith, 2020).

1.1.3. Terapia alfa dirigida: da física aos efeitos biológicos

No caso da terapia alfa dirigida, são usados radiofármacos emissores de partículas alfa, direcionados para uma determinada zona tumoral. Nos últimos anos, o uso clínico desta terapia tem assumido um papel cada vez mais importante, principalmente devido à potencial diminuição dos efeitos adversos da radiação nos tecidos normais (Marques *et al.*, 2018).

Quando a radiação ionizante é depositada no material biológico e interage com as células, provoca, em primeiro lugar, efeitos físico-químicos nos átomos ou moléculas das células, seguindo-se os efeitos biológicos que afetam as funções celulares (Kelsey *et al.*, 2014). Relativamente aos efeitos físicos, estes consistem nas várias excitações e ionizações provocadas pela deposição da energia transportada pela radiação. No caso das partículas carregadas, como as partículas alfa ou as partículas beta, à medida que atravessam os tecidos vão colidindo com os eletrões e os núcleos atômicos, depositando energia. Comparando com as partículas beta, as partículas alfa são muito mais pesadas e possuem o dobro da carga, o que faz com que não sejam tão facilmente desviadas do seu percurso e, conseqüentemente, descrevam uma trajetória aproximadamente reta, representada na Figura 2. A ionização específica das partículas carregadas é o número de pares de iões que se forma por unidade de comprimento de percurso. Como as partículas alfa são altamente energéticas (4 a 10 MeV), têm carga dupla e a sua velocidade é relativamente pequena, estão associadas a uma elevada ionização específica, sendo capazes de produzir milhares de pares de iões por milímetro, enquanto as partículas beta apenas produzem entre 50 e 100 pares de iões por milímetro, cujos percursos se apresentam na Figura 2 (Kelsey *et al.*, 2014; Marques, 2016; Moreira, 2020; Silva, 2021).

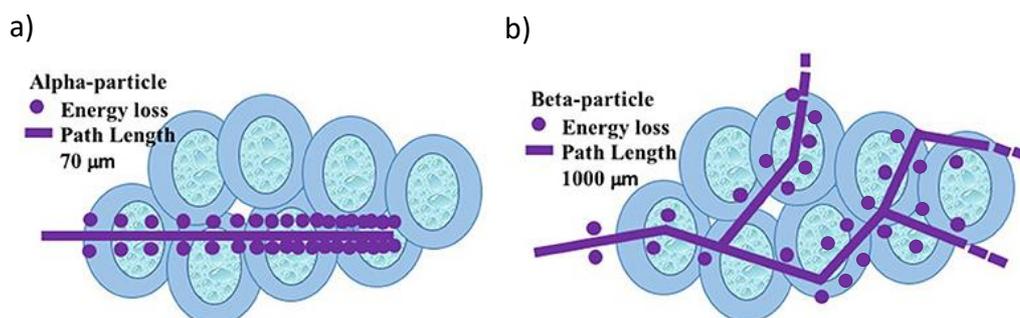


Figura 2: Percurso das partículas alfa (a) e das partículas beta (b) ao atravessarem as células. Adaptado de (Naskar & Lahiri, 2021)

Quando se abordam os efeitos biológicos da radiação ionizante, várias são as possibilidades de classificação. Uma delas é classificar os efeitos biológicos resultantes da exposição à radiação ionizante em diretos e indiretos. Os efeitos diretos ocorrem quando a radiação interage

diretamente com as moléculas biológicas constituintes das células, tais como o ADN, o ARN, as proteínas, os fosfolípidos membranares, entre outras. Esta interação direta resulta na ionização ou excitação destas moléculas e na quebra de algumas das suas ligações químicas, o que leva à alteração da sua estrutura e função, provocando danos biológicos nas células. O alvo mais crítico nas células é o ADN, visto que se as lesões nestas moléculas não forem reparadas podem resultar em mutações, alteração da função fisiológica e, eventualmente, em morte celular (Flowers *et al.*, 2015; Marques, 2016). A elevada LET das partículas alfa resulta numa ionização muito localizada que pode causar danos severos diretamente em estruturas celulares cruciais, como quebras na cadeia dupla de ADN, que levam ao bloqueio da divisão e da proliferação celular. Consequentemente, são ativados mecanismos de reparação de danos ou, se a célula for incapaz de os reparar, é induzida a morte celular. Além disso, como as partículas alfa perdem rapidamente a sua energia ao atravessar as células, apresentam um baixo alcance, cerca de 100 μm nos tecidos biológicos, minimizando os tecidos saudáveis afetados pela radiação. Estas propriedades resultam numa elevada eficácia biológica e citotoxicidade localizada muito agressiva, dotando as partículas alfa de um grande potencial anti-tumoral. Em contraste, as partículas beta, devido à baixa LET, possuem um maior alcance nos tecidos biológicos, logo, uma ionização e citotoxicidade menos localizadas e um efeito biológico menos destrutivo. Por conseguinte, existe uma maior probabilidade destas partículas provocarem danos nos tecidos saudáveis (Marques, 2016; Marques *et al.*, 2018; Pandit-Taskar *et al.*, 2014; Shore, 2015; Suominen *et al.*, 2019).

Apesar das partículas alfa serem frequentemente associadas a danos diretos, devido à elevada LET, estas também podem provocar efeitos indiretos. Estes efeitos estão relacionados com a interação da radiação com as moléculas de água, as moléculas mais abundantes nos organismos vivos, provocando a radiólise da água que, por sua vez, leva à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), principalmente iões altamente reativos e radicais livres. Um exemplo é o radical hidroxilo (OH^\bullet) que, como possui um eletrão desemparelhado, é extremamente reativo e vai interagir com os átomos e moléculas biológicas constituintes das células, causando lesões moleculares e interrompendo os processos fisiológicos. Outra das ROS produzida na radiólise da água é o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), responsável por grande parte das lesões indiretas da radiação provocadas pelo stresse oxidativo, podendo levar à morte celular (Flowers *et al.*, 2015; Kelsey *et al.*, 2014; Marques, 2016; Marques *et al.*, 2018). Na Figura 3 estão representados os efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante.

Existem mais de 100 radionuclídeos emissores de partículas alfa, mas quase todos decaem com períodos de semi-desintegração desadequados para poderem ser úteis na terapia dirigida. Atualmente, os cinco emissores alfa mais estudados, com possibilidades de uso clínico, são o ástato-211, o bismuto-212, o bismuto-213, o rádio-223 e o actínio-225. Estes radionuclídeos têm tempos de meia-vida entre 1 e 12 dias, o que, em conjunto com as propriedades das partículas alfa referidas anteriormente, os torna adequados para uso terapêutico (Bruland *et al.*, 2008; Jadvar & Quinn, 2013; Marques *et al.*, 2018).

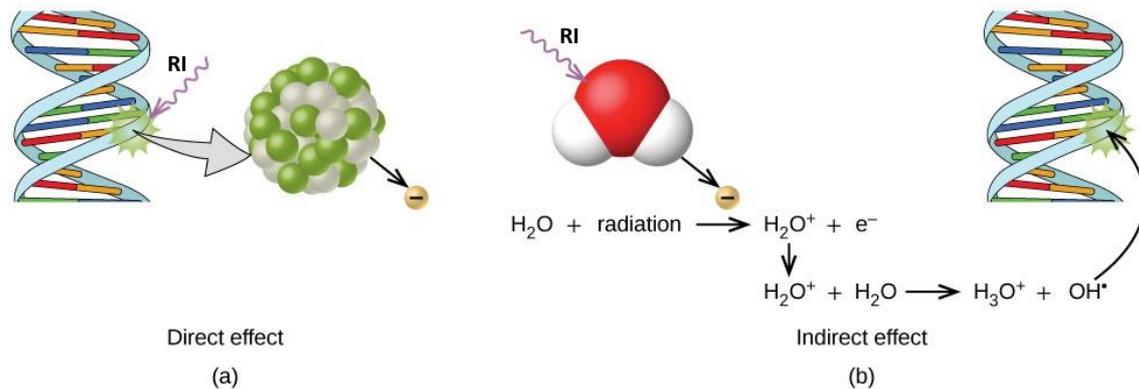


Figura 3: Efeitos diretos (a) e indiretos (b) da radiação ionizante (RI). Adaptado de (Flowers *et al.*, 2015)

O potencial da terapia alfa dirigida tem vindo a aumentar ao longo dos anos, principalmente no tratamento paliativo de metástases ósseas, derivadas de cancro da mama, da próstata, do pulmão ou mieloma, usando radionuclídeos emissores de partículas alfa e com afinidade para o osso (Moreira, 2020). Contudo, ainda há muito por descobrir sobre os efeitos anti-tumorais, a radiosensibilidade e a radiobiologia dos emissores alfa, assim como os mecanismos moleculares subjacentes ao seu mecanismo de ação. Já foi demonstrado que a inibição dos mecanismos de reparação das quebras da cadeia dupla de ADN leva a um aumento da vulnerabilidade das células tumorais a tratamentos com emissores alfa, sugerindo que o genoma dos tumores poderá regular a sua radiosensibilidade. Assim, uma melhor compreensão da relação entre a sensibilidade dos tumores às partículas alfa e as suas características celulares e genéticas permitirá estudar futuras aplicações desta radiação (Yard *et al.*, 2019).

1.1.4. Benefícios da terapia alfa dirigida: 5 R's da radiobiologia e as *hallmarks* do cancro

Os efeitos radiobiológicos resultantes da interação da radiação ionizante com as células tumorais são influenciados por fatores biológicos, normalmente designados 5 R's da radiobiologia: a reparação, a reoxigenação, a redistribuição, a repopulação e a radiosensibilidade. Os 5R's da radiobiologia podem ser correlacionados com as *hallmarks* do cancro, no sentido de melhorar a resposta terapêutica à terapia alfa dirigida (Marques *et al.*, 2018).

A reparação refere-se à capacidade que algumas células têm em reparar as quebras na cadeia dupla de ADN. Como as células tumorais se replicam indefinidamente e rapidamente, o processo de reparação dos danos é mais eficiente em tecidos normais do que em tecidos

tumorais, conferindo maior sensibilidade dos tecidos tumorais à radiação ionizante. Esta característica está relacionada com duas das *hallmarks* do cancro, a imortalidade replicativa e a resistência à morte celular. Desta forma, a terapia alfa dirigida permite melhor reparação das células nos tecidos normais enquanto tenta superar a replicação descontrolada das células tumorais. A capacidade de reparação das células é um dos motivos porque a dose de radiação se administra fracionada, pois permite que as células saudáveis tenham tempo para recuperar dos danos (Good & Harrington, 2013; Marques *et al.*, 2018).

Relativamente à reoxigenação, esta é uma característica importante para o aumento da eficácia da terapia alfa dirigida. O oxigénio é necessário para a formação das ROS durante a radiólise da água pelo que, na ausência de oxigénio, se formam menos ROS, o que leva a menos efeitos indiretos e danos celulares. Devido ao crescimento rápido dos tumores, estes desenvolvem zonas intratumorais não vascularizadas e pouco oxigenadas, resultando no desenvolvimento de células hipóxicas e que são, conseqüentemente, menos radiosensíveis. Por esta razão, as regiões de hipoxia dos tumores são consideradas uma das razões da falha da radioterapia no tratamento de certos cancros (Forshier, 2009; Silva, 2021). Assim, o facto de na terapia alfa dirigida a dose de radiação ser administrada em frações promove, primeiramente, a morte das células tumorais mais oxigenadas e permite a reparação dos vasos sanguíneos, que vão oxigenar as células tumorais hipóxicas, tornando-as mais sensíveis à radiação alfa (Marques *et al.*, 2018). Apesar da reoxigenação aumentar a eficácia desta terapia, como a radiação alfa provoca principalmente efeitos diretos, a presença de oxigénio não é imprescindível para a sua atuação, o que torna a terapia alfa dirigida adequada no tratamento de tumores hipóxicos (Pouget & Constanzo, 2021).

Após a irradiação, as células podem interromper o ciclo celular e ativar mecanismos de reparação. As células nas fases M e G2 são as mais radiosensíveis, enquanto as células na fase S são as mais riorresistentes e tendem a redistribuir-se para fases mais radiosensíveis. Ao longo do tempo, as células que vão sobrevivendo vão ficando cada vez mais sensíveis a doses posteriores, o que é vantajoso na terapia alfa dirigida pois a dose é, normalmente, fracionada ao longo do tempo. Deste modo, a redistribuição das células após irradiação desempenha um papel importante na morte das células tumorais, o que é explicado através de duas *hallmarks* do cancro, a sinalização proliferativa anormal e a resistência à morte celular (Forshier, 2009; Marques *et al.*, 2018; Silva, 2021).

A repopulação consiste no aumento da divisão celular, tanto das células normais como das células tumorais, após exposição prolongada à radiação. Esta característica é um obstáculo principalmente no tratamento dos tumores, pois significa um aumento da proliferação das células tumorais sobreviventes e, conseqüentemente, a diminuição da eficácia terapêutica da terapia alfa dirigida (Silva, 2021). Contudo, o aumento da repopulação pode resultar em sucessivas mitoses com danos no ADN que não foram reparados, tornando as células tumorais

mais radiosensíveis e aumentando o potencial anti-tumoral desta terapia (Good & Harrington, 2013).

Por fim, a radiosensibilidade foi o último R da radiobiologia a ser estabelecido com o objetivo de explicar as diferentes respostas observadas em vários tipos de células, a um determinado tratamento, assim como a diminuição da radiosensibilidade das células tumorais ao longo do tratamento. A explicação baseia-se na Lei de Bergonie e Tribondeau, que afirma que quanto mais indiferenciadas e maior a taxa de proliferação das células, mais radiosensíveis elas são (Forshier, 2009). Este R mais recente pode ser associado a diversas *hallmarks* do cancro, tais como a inflamação promovida pelo tumor, o impedimento da destruição pelo sistema imune e a sinalização proliferativa anormal, que se correlacionam entre eles para desencadear uma resposta sistémica à radiação alfa (Marques *et al.*, 2018).

1.1.5. O rádio-223

O rádio-223 é um radioisótopo com um tempo de meia-vida de 11,4 dias que foi descoberto em 1905 pelo químico T. Godlewski. O rádio-223 decai para isótopos-filho de tempos de meia-vida curtos até se formar o isótopo estável chumbo-207, libertando, no total, 28,2 MeV (Figura 4). Durante o decaimento, este radioisótopo emite, sobretudo, partículas alfa que representam 95,3 % de toda a energia envolvida no seu decaimento e possuem um intervalo de energia entre os 5,78 e os 7,53 MeV. Além das partículas alfa, são também emitidas partículas beta (3,6%), com energias entre 0,445 e 0,492 MeV, e radiação gama (1,1%), com um intervalo de energia de 0,01 a 1,27 MeV (Jadvar & Quinn, 2013; Marques *et al.*, 2021; Pandit-Taskar *et al.*, 2014).

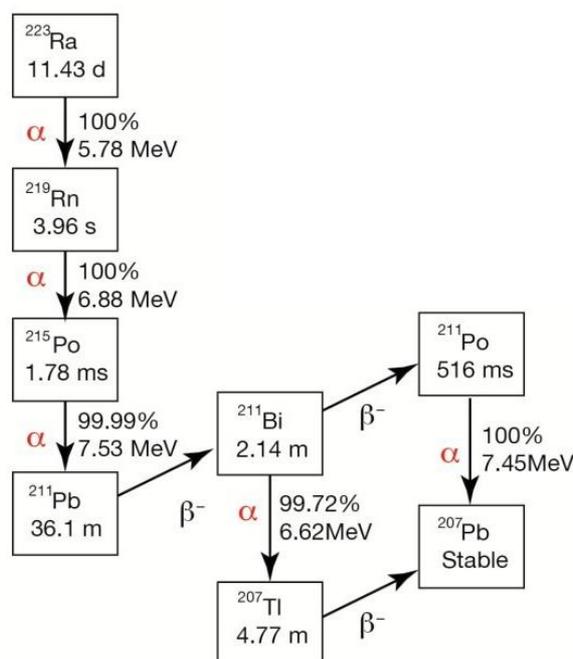


Figura 4: Representação esquemática do decaimento do rádio-223, com as energias de cada partícula alfa emitida. Adaptado de (Abou *et al.*, 2015)

O rádio-223 pode ser encontrado na natureza, no entanto é pouco comum. Apesar deste radioisótopo se formar naturalmente como produto de decaimento do urânio-235, presente na pecheblenda, ele é normalmente produzido artificialmente e em larga escala através do sistema gerador actínio-227 – tório-227 ($^{227}\text{Ac}/^{227}\text{Th}$) (Figura 5). O actínio-227 possui um tempo de meia-vida de 21,8 anos e decai para o tório-227, cujo tempo de meia-vida é de 18,7 dias. Por fim, o tório-227 decai para o rádio-223, pelo que este sistema $^{227}\text{Ac}/^{227}\text{Th}$ pode ser usado como um gerador de longa duração de rádio-223 (Bruland *et al.*, 2008; Jadvar & Quinn, 2013; Marques *et al.*, 2018).

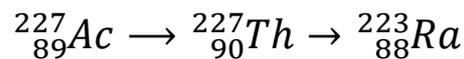


Figura 5: Esquema do gerador $^{227}\text{Ac}/^{227}\text{Th}$.

O rádio-223 é um elemento alcalino-terroso, pelo que apresenta propriedades químicas semelhantes ao cálcio. Deste modo, o rádio-223 comporta-se como um mímico do cálcio, sendo preferencialmente absorvido pelas células ósseas. Tirando partido desta característica que permite que o radiofármaco penetre na região cortical do osso, onde as metástases ósseas são comumente detetadas, e também do facto das partículas alfa depositarem uma grande quantidade de energia numa curta distância, o rádio-223 apresenta potencial no tratamento de cancro com metástases ósseas (Marques, 2016; Marques *et al.*, 2018; Moreira *et al.*, 2019). Este radioisótopo foi, na verdade, o primeiro emissor alfa aprovado para uso clínico, em específico para o tratamento de doentes de cancro da próstata metastático resistente à castração (CPMRC), com presença de metástases ósseas e sem metástases viscerais conhecidas (Henriques, 2018; M. Morris *et al.*, 2019; Shore, 2015; Yard *et al.*, 2019).

1.2. Cancro da próstata

1.2.1. A próstata

A próstata é um órgão músculo-glandular em forma de pirâmide invertida e constitui a maior glândula acessória do sistema genital masculino (Beyzadeoglu *et al.*, 2010; Marques, 2016; Tavares, 2019). A sua função primária é secretar um fluido branco alcalino que depois se junta ao esperma durante a ejaculação, contribuindo para a mobilidade, a nutrição e a manutenção da viabilidade dos espermatozoides. Está localizada na parte inferior da pélvis, imediatamente abaixo da bexiga e envolve o início da uretra (Aaron *et al.*, 2016; Dunn & Kazer, 2011; Tavares, 2019).

Em 1988, John E. McNeal propôs um modelo anatómico da próstata que ainda hoje é aceite e usado na prática clínica. Neste modelo, a próstata encontra-se dividida em quatro regiões, representadas na Figura 6: a zona periférica, a zona central, a zona de transição e a zona fibromuscular anterior ou estroma (Dunn & Kazer, 2011; Marques, 2016; Rebello *et al.*, 2021). As três primeiras correspondem a zonas glandulares e a zona fibromuscular anterior corresponde a uma zona não glandular. O epitélio glandular prostático é constituído por três tipos principais de células: as células secretoras, as células basais e as células neuroendócrinas (Ittmann, 2018).

A zona periférica é a maior região anatómica da próstata, representa mais de 70% do seu tecido glandular e é a que mais contribui para a função normal deste órgão. Esta zona é de origem endodérmica e está associada ao desenvolvimento de cerca de 75-80% dos cancros da próstata (Beyzadeoglu *et al.*, 2010; Rebello *et al.*, 2021; Sauer *et al.*, 2020). A zona central representa entre 20 e 25% da porção glandular da próstata e é atravessada pelos canais ejaculatórios. É uma região em forma de cone, com a porção mais larga na base da próstata e o ápex no colículo seminal a rodear os canais ejaculatórios. Apesar de não constituir o local de origem da maioria das doenças, pode estar envolvida secundariamente em processos de carcinogénese (Ittmann, 2018; Sauer *et al.*, 2020; Silva, 2021). A zona de transição representa apenas cerca de 5% da porção glandular da próstata e localiza-se perto da uretra prostática. É de origem mesodérmica e é composta por dois pequenos lóbulos. Uma das patologias mais frequentes na glândula prostática, e que surge normalmente na zona de transição, é a Hiperplasia Benigna Prostática (HBP), caracterizada por um aumento da proliferação e do volume da próstata. O cancro da próstata (CaP) também pode surgir nesta zona, constituindo cerca de 20% dos casos totais de CaP (Dunn & Kazer, 2011; Ittmann, 2018; Sauer *et al.*, 2020; Tavares, 2019). Por fim, a zona fibromuscular anterior é composta por tecido conjuntivo e por tecido muscular compacto e cobre toda a superfície anterior da próstata, ocupando cerca de um terço do volume total da próstata (Sauer *et al.*, 2020).

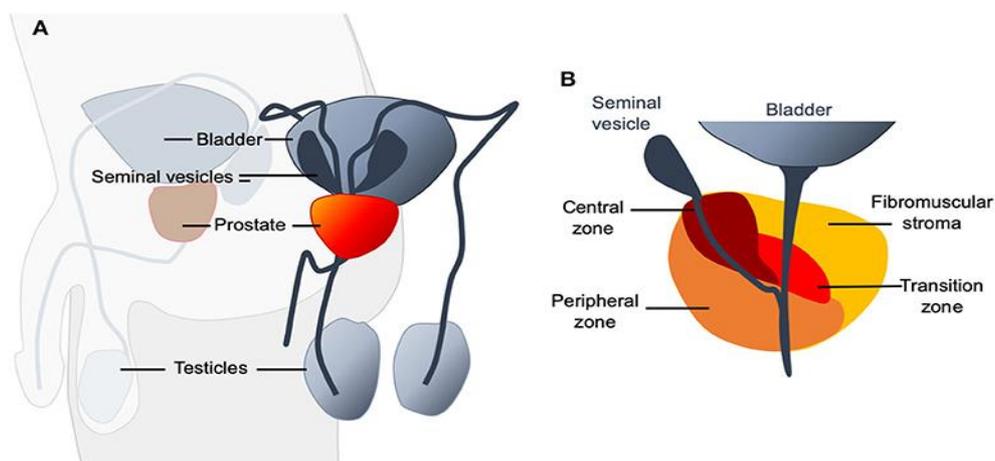


Figura 6: (A) Representação esquemática da localização da próstata (a vermelho) no sistema urogenital masculino. (B) Localização das quatro zonas da próstata. Retirado de (Sauer *et al.*, 2020)

Assim, a próstata humana pode estar associada a uma variedade de alterações, tanto no epitélio glandular como no estroma. Algumas das mais comuns são a atrofia do epitélio, a hiperplasia basocelular, a inflamação crónica e a HBP (Ittmann, 2018). No caso de patologias malignas, o CaP é das mais comuns e está também associado a modificações histológicas, tais como a rutura da organização epitelial e o aumento da produção do antigénio prostático específico (PSA, do inglês *prostate specific antigen*). No entanto, a evolução do epitélio normal até ao desenvolvimento do CaP não é imediata e segue um processo constituído por várias etapas, correspondentes aos estádios da doença (Rebello et al., 2021; Silva, 2021; Tavares, 2019).

1.2.2. Epidemiologia

O CaP afeta milhões de homens todos anos, sendo o segundo cancro masculino mais comum no mundo, como se pode observar na Figura 7. Tendo em conta os dados do *GLOBOCAN 2020*, houve 19 292 789 novos casos de cancro e 9 958 133 mortes por cancro, em 2020, em todo o mundo. Dos 19 292 789 novos casos, 1 414 259 correspondem aos casos de CaP diagnosticados nesse ano, o que equivale a 7,3% de todos os diagnósticos de cancro e a 14,1% dos diagnósticos de cancro masculino. Relativamente à mortalidade, morreram no total 375 304 homens de CaP, em 2020, o que equivale a 3,8% de todas as mortes por cancro. Assim, esta patologia constitui uma das principais causas de morte por cancro nos homens (GLOBOCAN, 2020c, 2020b; Rebello et al., 2021; Sung et al., 2021).

Em Portugal, o CaP é o tumor maligno com maior incidência e o quarto com maior taxa de mortalidade nos homens (Figura 7). De acordo com os últimos dados do *Global Cancer Observatory*, em Portugal diagnosticaram-se 6759 novos casos e registaram-se 1917 mortes por CaP, no ano de 2020 (Sung et al., 2021). Dados de 2021 permitem estimar uma incidência de 82 casos por 100 000 habitantes e uma mortalidade de 33 mortes por 100 000 habitantes.

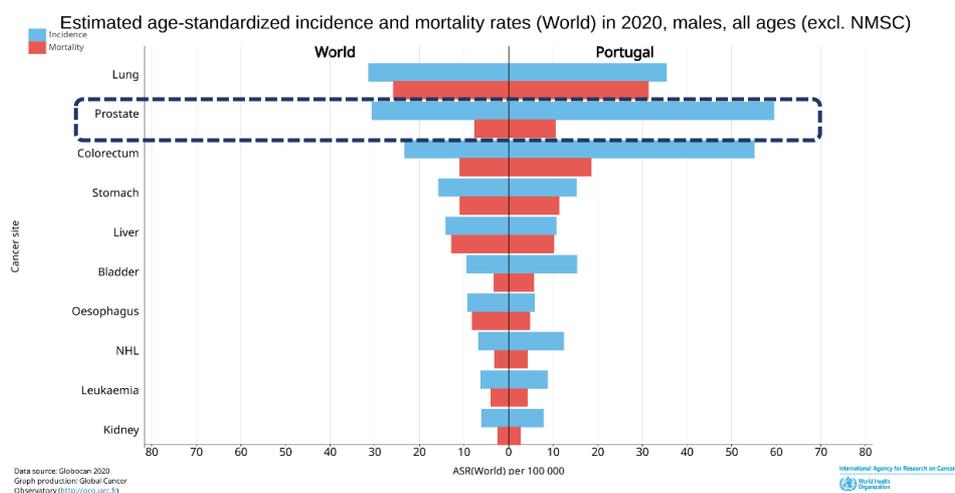


Figura 7: Estimativa e comparação das taxas de incidência e mortalidade por tipo de cancro, no mundo e em Portugal, em 2020, no sexo masculino e para todas as idades. Adaptado de (GLOBOCAN, 2020a)

A incidência mundial de CaP está correlacionada com o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) e varia de região para região, verificando-se, no geral, uma maior incidência nos países desenvolvidos e uma menor incidência nos países em desenvolvimento e sub-desenvolvidos. Uma das possíveis razões para estas diferenças entre regiões é a desigualdade nas técnicas e na frequência do diagnóstico precoce. Algumas das zonas com taxa de incidência de CaP elevada são a Austrália e Nova Zelândia, a América do Norte e a Europa, o que se deve ao grande incentivo à realização frequente de exames, bem como à existência de técnicas de diagnóstico mais avançadas (Rawla, 2019; Rebello *et al.*, 2021; Siegel *et al.*, 2021).

A mortalidade associada ao CaP tem vindo a diminuir em diversos países, nomeadamente na América do Norte, Oceânia, Europa Ocidental e nos países mais desenvolvidos da Ásia. No caso de Portugal, a taxa de mortes por este tipo de cancro também tem vindo a decrescer desde 1996, a um ritmo aproximadamente constante, provavelmente devido à melhoria dos cuidados de saúde e avanços no diagnóstico, estadiamento e tratamento (Bray *et al.*, 2018; Rawla, 2019; Sung *et al.*, 2021).

1.2.2.1. Fatores de risco

A análise detalhada da epidemiologia do CaP e uma melhor compreensão da sua etiologia e fatores de risco associados permitem identificar indivíduos com um maior risco de desenvolver esta doença e elaborar métodos preventivos mais eficientes. Apesar dos fatores de risco do CaP não serem totalmente conhecidos, sabe-se que a idade, a história familiar e algumas mutações genéticas se correlacionam com o desenvolvimento desta patologia (Bahl, 2013; Rawla, 2019). Entre eles, a idade avançada é o fator mais significativo, com o risco a aumentar consideravelmente com o avanço da idade. De facto, mais de 85% dos indivíduos diagnosticados com CaP têm idades superiores a 60 anos (Rebello *et al.*, 2021; Shen & Abate-Shen, 2010).

Ademais, múltiplos estudos epidemiológicos e estudos de gémeos permitiram concluir que uma história familiar de CaP aumenta significativamente o risco de desenvolver este tipo de cancro. Aproximadamente 9% dos indivíduos diagnosticados com CaP têm parentes que já tiveram, ou têm, esta doença e, no caso de os parentes serem diretos, o risco aumenta para o dobro. Este risco é ainda maior se os parentes forem diagnosticados antes dos 60 anos, passando de um risco de duas vezes para quatro vezes superior, em comparação com a população em geral (Dunn & Kazer, 2011; Rebello *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2018).

A história familiar de CaP pode estar relacionada com a existência de mutações genéticas, as quais são passadas à descendência e aumentam o risco de desenvolver esta patologia (Rawla, 2019). Por exemplo, mutações em genes envolvidos na reparação do ADN e na sinalização dos recetores de androgénios podem contribuir para o aumento do risco do aparecimento precoce de CaP. As mutações que mais contribuem para o risco elevado de CaP são as que ocorrem no gene de supressão tumoral *BRCA2* (do inglês *breast cancer 2*) e no gene *HOXB13* (do inglês

homeobox B13), que interage com os recetores de androgénios, aumentando o risco em 7-8 vezes e 3 vezes, respetivamente. A maioria dos casos de cancro da próstata que evoluem para o estágio metastático corresponde a homens portadores destas mutações, tendo sido revelado em estudos genómicos que 15 a 35% dos doentes com CPMRC possuíam mutações nestes genes (Rebello *et al.*, 2021; Sathianathen *et al.*, 2018). A descoberta de mutações que aumentam o risco de CaP poderá ser útil na deteção precoce desta patologia em grandes populações e também no desenvolvimento de novas terapias (Wang *et al.*, 2018).

1.2.3. Evolução do cancro da próstata

O cancro da próstata (CaP) é um tipo de cancro particularmente difícil de mimetizar na investigação pré-clínica e clínica, devido à sua complexa patogénese. É uma patologia progressiva e que evolui por várias etapas (Figura 8), que apresentam diferenças a nível das características moleculares, da resposta a fármacos e, também, dos mecanismos de resistência (Barbeau, 2018).

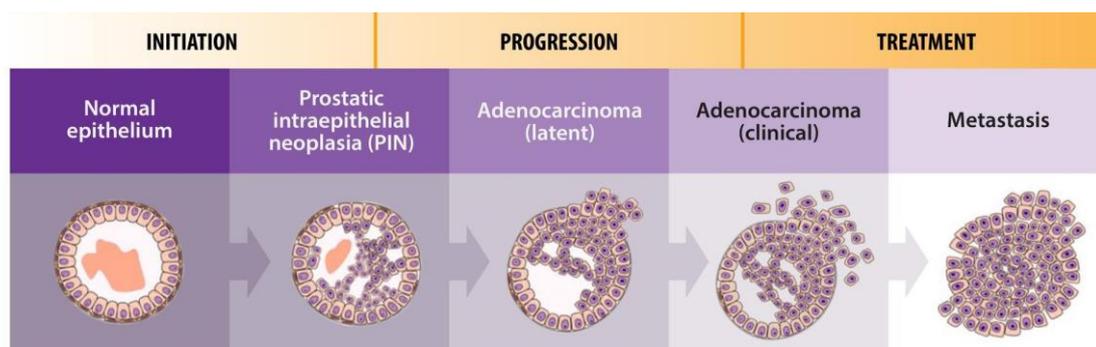


Figura 8: Etapas da transformação maligna da próstata, começando pela neoplasia intraepitelial e podendo progredir até ao CaP metastático. Adaptado de (Barbeau, 2018)

Atualmente, considera-se que a lesão mais frequentemente precursora do CaP é a neoplasia intraepitelial prostática, com base em evidências patológicas, epidemiológicas e citogenéticas. Por exemplo, a neoplasia intraepitelial e o cancro da próstata demonstram semelhanças nas anomalias cromossómicas, na localização preferencial na zona periférica, nas transições morfológicas e também semelhanças moleculares e fenotípicas. Existem ainda indícios de que a maioria das alterações na expressão génica, relacionadas com a progressão do CaP, ocorre na transição do epitélio normal para a neoplasia intraepitelial prostática e não na transição desta para o CaP (Cardoso, 2013; Joshua *et al.*, 2008; Marques, 2016; Packer & Maitland, 2016). Histologicamente, a neoplasia intraepitelial prostática é caracterizada pelo aparecimento de hiperplasia epitelial luminal, com diminuição das células basais, aumento dos núcleos e dos nucléolos, hiper Cromasia citoplasmática, entre outros. Para além destas características, as

lesões neoplasia intraepitelial prostática apresentam geralmente um aumento dos marcadores de proliferação celular (Joshua *et al.*, 2008; Packer & Maitland, 2016; Shen & Abate-Shen, 2010). A neoplasia intraepitelial prostática pode ser classificada em lesão de baixo grau ou de alto grau, associadas a 20% e 80% dos casos de CaP, respetivamente (Beyzadeoglu *et al.*, 2010).

A neoplasia intraepitelial prostática provoca lesões no tecido normal da próstata e, se não for tratada, progride para um estado localizado de CaP. O CaP localizado é, na maioria das vezes, morfológicamente heterogéneo e possui múltiplos focos tumorais na próstata, podendo estes focos apresentar diferenças genéticas entre eles. Mais de 95% dos casos de CaP são classificados como adenocarcinomas, os quais possuem um fenótipo luminal e expressam recetores de androgénios (Beyzadeoglu *et al.*, 2010; Rebello *et al.*, 2021; Shen & Abate-Shen, 2010; Tavares, 2019).

1.2.3.1. Importância dos recetores de androgénios

A compreensão da ação dos androgénios na próstata e dos mecanismos de sinalização associados aos seus recetores é essencial para entender a progressão do CaP e o surgimento da resistência à castração, contribuindo para a necessidade de aperfeiçoamento e desenvolvimento de novas terapias (Chandrasekar *et al.*, 2015).

Os androgénios são os principais ligandos dos recetores de androgénios, sendo a testosterona o androgénio circulante mais abundante. Estes são produzidos principalmente pelas células de Leydig presentes nos testículos ($\approx 90\%$) e uma pequena parte pelo córtex da glândula suprarrenal ($\approx 10\%$), estando a síntese regulada pela hormona luteinizante (LH, do inglês *luteinizing hormone*). No entanto, a testosterona circula principalmente ligada à globulina transportadora de hormonas sexuais e à albumina e, apenas 3%, circula livre e está funcionalmente ativa. É a testosterona livre que penetra nas células da próstata e se difunde no citoplasma, onde é convertida em 5 α -dihidrotestosterona, pela enzima 5 α -redutase, a qual está associada a uma elevada afinidade pelo domínio de ligação dos recetores de androgénios, 5 vezes superior à da testosterona livre (Chandrasekar *et al.*, 2015; Fujita & Nonomura, 2019; Harris *et al.*, 2009; Marques, 2016; Tan *et al.*, 2015).

Os recetores de androgénios são recetores nucleares codificados por um gene localizado no cromossoma Xq11-12 e constituídos por quatro domínios funcionais: o domínio N-terminal, o domínio central de interação com o ADN, o domínio curto de conexão e o domínio C-terminal (ou domínio de ligação), que é responsável pelo reconhecimento e interação com o ligando. No estado inativo, ou seja, quando não está ligado a nenhum composto, localiza-se predominantemente no citoplasma, ligado às proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat-shock proteins*) (Chandrasekar *et al.*, 2015; Fujita & Nonomura, 2019; Shafi *et al.*, 2013). A conexão da 5 α -dihidrotestosterona ao domínio de ligação dos recetores de androgénios provoca alterações conformacionais que levam à sua fosforilação e translocação para o núcleo,

onde se ligam à região promotora dos genes regulados por androgénios. Assim, ao ligar-se aos recetores de androgénios, a 5 α -dihidrotestosterona promove a sobrevivência, o crescimento, a proliferação e a diferenciação das células da próstata e estimula ainda a produção do PSA (Chandrasekar *et al.*, 2015; Harris *et al.*, 2009; Shafi *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2015).

Deste modo, os androgénios e a sua interação com os recetores de androgénios são fundamentais para o desenvolvimento e o funcionamento normal da próstata, pois desencadeiam diversas respostas biológicas que asseguram a manutenção das células. No entanto, em situações anormais, estão também envolvidos no processo de carcinogénese do CaP e contribuem para a sua evolução (Joshua *et al.*, 2008; Silva, 2021). Está comprovado que a progressão do CaP é acompanhada pelo aumento dos níveis séricos de PSA, o que significa uma atividade elevada dos recetores de androgénios (Rebello *et al.*, 2021; Shafi *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2015).

Em suma, as células do CaP, à semelhança das células normais da próstata, necessitam de androgénios para crescer e sobreviver. Esta dependência androgénica foi descoberta em 1941, por Charles Huggins e Clarence Hodges, que observaram uma regressão dos tumores em doentes com CaP após castração (Huggins & Hodges, 1941; Wang *et al.*, 2018). Por conseguinte, a terapia de privação androgénica (ADT, do inglês *androgen deprivation therapy*), que consiste na remoção dos androgénios testiculares através de castração cirúrgica ou química, é considerada a terapêutica de eleição de doentes com CaP avançado dependente de androgénios (Calais da Silva, 2013; Harris *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2018).

1.2.3.2. Resistência à castração

A terapêutica com ADT demonstra uma resposta inicial favorável, com o decréscimo dos níveis séricos de PSA em 80 a 90% dos doentes, contudo a regressão do tumor é apenas temporária. Em 10 a 20% dos doentes com CaP verifica-se que 12 a 18 meses após o início da ADT, as células cancerígenas se tornam resistentes a esta terapia hormonal e o tumor reincide, passando a designar-se por cancro da próstata resistente à castração (CPRC). Os doentes neste estágio da doença deixam de responder à ADT como primeira linha. A resistência à castração caracteriza-se pela progressão da doença em doentes com uma concentração de testosterona circulante inferior a 50 ng/dL (Bahl, 2013; Chandrasekar *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2015).

Os mecanismos responsáveis pela resistência à castração ainda não se conhecem na totalidade. No entanto, foram definidas possíveis razões para a evolução para o CPRC, salientando o aumento da expressão dos recetores de androgénios nas células tumorais, as mutações nos genes dos recetores de androgénios e a ativação destes recetores por vias independentes dos seus ligandos. O aumento da expressão dos recetores de androgénios nas células tumorais confere maior sensibilidade aos seus agonistas (androgénios), assim como o

aumento da síntese intratumoral da 5 α -dihidrotestosterona, elevando os seus níveis para valores capazes de ativar os recetores de androgénios. As mutações nos genes dos recetores de androgénios levam a substituições nos aminoácidos dos domínios de ligação, o que provoca uma diminuição da sua especificidade e seletividade que, por sua vez, torna os recetores de androgénios sensíveis a outros tipos de ligandos não-androgénicos. A ativação dos recetores de androgénios pode também ser efetivada por vias independentes dos ligandos, tais como o IGF-1 (do inglês *insulin-like growth-factor-1*), o KGF (do inglês *keratinocyte growth factor*) e o EGF (do inglês *epidermal growth factor*) (Chandrasekar *et al.*, 2015; Harris *et al.*, 2009; Katsogiannou *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2015). Todos estes mecanismos operam em conjunto, com o objetivo de aumentar a atividade dos recetores de androgénios, promovendo uma sinalização anormal destes recetores e, conseqüentemente, o desenvolvimento da resistência à castração (Silva, 2021; Tan *et al.*, 2015).

1.2.3.3. Cancro da próstata metastático resistente à castração

Cerca de 10 a 20% dos doentes com CaP apresentam metástases aquando do diagnóstico e, dos que são diagnosticados com CaP localizado, entre 20 e 30% irão desenvolver metástases no futuro (Bahl, 2013). Relativamente aos doentes com CPRC, aproximadamente 90% desenvolvem metástases, o que se deve principalmente ao facto das células que desenvolvem resistência à castração se tornarem altamente invasivas. O CPRC, ao evoluir para doença metastática, passa a denominar-se cancro da próstata metastático resistente à castração (CPMRC) e constitui a principal causa das mortes por CaP, estando associado a uma taxa de sobrevida muito baixa (Marques, 2016; Silva, 2021; Wang *et al.*, 2018).

Normalmente, o CaP metastiza primeiro para os gânglios linfáticos adjacentes aos tumores primários e depois para órgãos mais distantes, como o fígado, os pulmões, a pleura e, principalmente, os ossos (Shen & Abate-Shen, 2010; Wang *et al.*, 2018). A metastização é um processo complexo e que pode ser dividido em cinco passos principais constituintes da cascata metastática (Figura 9). Esses passos são a migração das células tumorais através da membrana basal e do estroma do tumor primário, a intravasão das células tumorais para a circulação sanguínea e/ou linfática, a sobrevivência das células tumorais na circulação, caracterizada pela resistência destas células ao ataque pelo sistema imune, o extravasamento das células dos vasos sanguíneos para o local metastático, atravessando a barreira endotelial e, por fim, a colonização dos órgãos-alvo onde se irão desenvolver os tumores secundários. No entanto, após o extravasamento das células tumorais para o local metastático, estas podem permanecer num período de dormência e, passado algum tempo, retomarem o seu crescimento e proliferação (Hapach *et al.*, 2019; Marques, 2016; Suhail *et al.*, 2019).

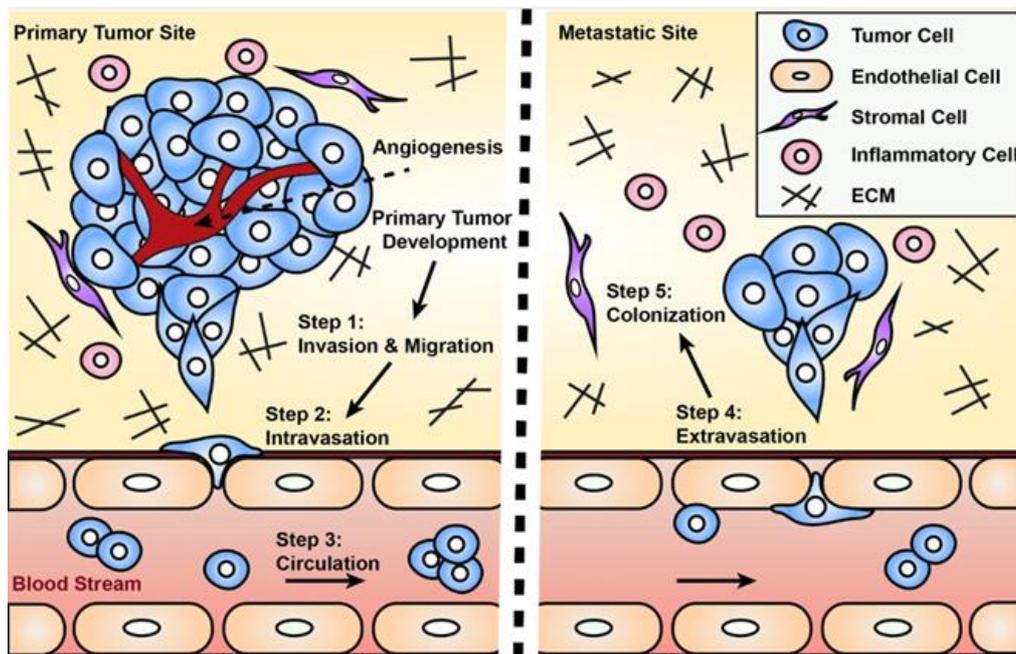


Figura 9: Esquema representativo das etapas principais da cascata metastática. Retirado de (Hapach *et al.*, 2019)

As metástases ósseas são as mais comuns no CPMRC, estando presentes em mais de 80% dos doentes neste estágio da doença (Rebello *et al.*, 2021). As regiões mais frequentemente afetadas no processo de metastatização óssea são os ossos do esqueleto axial, que contêm a medula óssea (M. Morris *et al.*, 2019). As metástases ósseas podem levar ao aparecimento de diversos sintomas e sinais, como dores fortes na região dorso-lombo-sagrada e na pélvis, assim como fraturas ósseas frequentes, falta de mobilidade, compressão da medula espinhal, hipercalcemia, entre outros. Todos estes sintomas afetam negativamente a qualidade de vida dos doentes e contribuem para a diminuição do tempo de sobrevivência (Bahl, 2013; Marques, 2016; Chris Parker *et al.*, 2018; Rebello *et al.*, 2021).

Para uma melhor compreensão da evolução das metástases ósseas a partir de células de CaP, é útil começar pela análise da composição do osso. O osso é um material natural e muito heterogêneo, constituído por uma parte orgânica e uma parte inorgânica. A parte orgânica é composta essencialmente por colagénio do tipo I (90%) e também por proteínas não colagénicas (5%) e lípidos (2%). O componente principal da parte inorgânica são os cristais de hidroxiapatite, constituídos por cálcio e fosfato. A concentração de cada um destes constituintes no osso varia com a idade, o género, a etnia e o estado de saúde, pelo que variações na composição mineral do osso podem ser indicativas de doença (Boskey, 2013; Silva, 2021; Von Euw *et al.*, 2019). Assim, a integridade óssea é mantida e controlada através de um ciclo contínuo de reabsorção óssea e formação de novo osso ao longo da vida. A reabsorção óssea é realizada unicamente pelos osteoclastos, cuja formação é controlada pelo RANKL (do inglês *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*) e pelo M-CSF (do inglês *macrophage colony-stimulating factor*). Por

outro lado, a formação de novo osso é realizada pelos osteoblastos e resulta da proliferação das SSCs (do inglês *primitive skeletal stem cells*), da sua diferenciação em precursores dos osteoblastos (osteoprogenitores e pré-osteoblastos), maturação desses precursores em osteoblastos, formação de matriz óssea e, por fim, mineralização. É a ação coordenada e equilibrada destes dois tipos de células que assegura a homeostasia óssea, o equilíbrio e a saúde do esqueleto, mas pode também influenciar o comportamento das células tumorais (Body *et al.*, 2015; Croucher *et al.*, 2016).

Assim que as células do CaP colonizam a medula óssea, vão interagir com os diferentes componentes do microambiente ósseo através das vias de sinalização. Deste modo, as metástases ósseas são estabelecidas através de mecanismos complexos que envolvem interações das células cancerígenas com os osteoblastos, os osteócitos, os osteoclastos, as células estaminais da medula óssea e as células hematopoiéticas. Ou seja, as células do CaP libertam fatores de crescimento que, por sua vez, induzem a desregulação do ciclo de formação e renovação óssea normal e levam a um aumento, sobretudo, da atividade osteoblástica. Este aumento, por sua vez, estimula a atividade osteoclástica através da secreção de RANKL pelos osteoblastos. Consequentemente, os osteoblastos e os osteoclastos expressam também fatores de crescimento que promovem a proliferação e a sobrevivência das células do CaP. Este mecanismo de *feedback* positivo entre as células tumorais, os osteoblastos e os osteoclastos constitui um “ciclo vicioso” (Figura 10) de formação e reabsorção ósseas, o qual suporta o crescimento e a progressão das metástases (Body *et al.*, 2015; Furesi *et al.*, 2021; M. Morris *et al.*, 2019; Suominen *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2018).

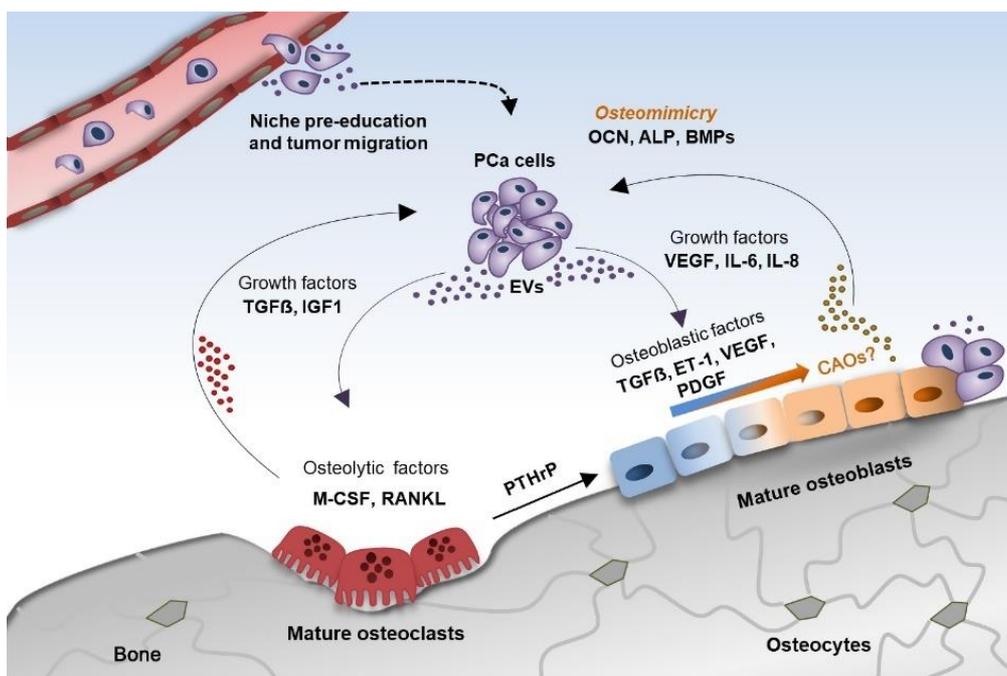


Figura 10: “Ciclo vicioso” das metástases ósseas. Retirado de (Furesi *et al.*, 2021)

1.2.4. Diagnóstico

O cancro da próstata em estágio inicial é normalmente assintomático, já que o tumor, devido ao seu pequeno tamanho, não exerce pressão na uretra (Bahl, 2013). Quando o tumor progride, o doente começa então a manifestar alguns sinais e sintomas, tais como um fluxo fraco de urina, a vontade constante de urinar, a dificuldade em esvaziar completamente a bexiga, a dor ao urinar e sangue na urina e/ou no sêmen (National Cancer Institute, 2021).

O diagnóstico do CaP tem sofrido mudanças radicais ao longo dos anos, tendo aumentado a preocupação com a deteção da doença numa fase precoce, enquanto o tumor está localizado apenas na próstata e é potencialmente curável. Nos últimos anos, o CaP passou de uma doença encontrada num estágio avançado e/ou metastizado para uma doença que é frequentemente identificada em exames de rastreio, num estágio inicial. O diagnóstico precoce resulta numa taxa de sobrevivência em 5 anos de aproximadamente 100%, enquanto a presença de metástases leva a uma diminuição drástica desta taxa. Daqui resulta a grande importância da deteção precoce do CaP, tanto para o aumento da probabilidade de sobrevivência, como para a aplicação de terapias eficientes, havendo um maior número de opções terapêuticas disponíveis (Borley & Feneley, 2009; Haberkorn et al., 2016; Schatten, 2018; Sp, 2013).

Os exames de rastreio são, normalmente, o primeiro recurso para detetar o CaP em indivíduos assintomáticos, com o objetivo de melhorar a discriminação prognóstica dos tumores que requerem uma terapia inicial ou que devem ser monitorizados através de uma vigilância ativa (Rebello *et al.*, 2021). O principal exame de diagnóstico consiste na medição do nível do PSA no sangue, um exame acessível e não-invasivo. Este antigénio atua como biomarcador e, tal como o nome indica, é secretado pelo epitélio prostático. De acordo com a *American Cancer Society*, um nível sérico de PSA acima dos 4 ng/mL é considerado anormal. De acordo com os dados disponíveis, os níveis séricos de PSA estão acima do valor de referência em cerca de 50% dos homens num estágio inicial da doença e em mais de 80% dos homens num estágio mais avançado. No entanto, como é um biomarcador não específico do tumor maligno, mas sim do órgão, este liga-se tanto aos tecidos malignos como benignos da próstata, o que faz com que os valores do PSA possam, também, estar elevados mesmo na ausência de CaP (Borley & Feneley, 2009; Sp, 2013). Por estes motivos, este método de diagnóstico é considerado incerto e duvidoso, o que levou ao desenvolvimento de exames de diagnóstico mais precisos e específicos do cancro da próstata, como a medição do antigénio da membrana específica da próstata (PSMA, do inglês *prostate-specific membrane antigen*). Contudo, o teste do PSA continua a ser o mais amplamente utilizado (Haberkorn *et al.*, 2016).

Outro exame de rastreio muito utilizado, juntamente com o teste do PSA, é o toque retal, que consiste na palpação física da próstata através do reto para avaliar as dimensões, o volume, a consistência e a sensibilidade da próstata (National Cancer Institute, 2021; Rebello *et al.*, 2021). As diretrizes da Sociedade Americana do Cancro para a deteção precoce do CaP incluem o rastreio anual através do teste dos níveis séricos de PSA e do toque retal, para homens acima

dos 50 anos (Pallwein *et al.*, 2008). Tendo em conta os resultados destes exames e outros fatores, como a idade, a história familiar de CaP e/ou de mutações associadas a esta patologia, o médico decide se são necessários métodos de diagnóstico complementares, nomeadamente a ecografia transretal, a ressonância magnética multiparamétrica ou a tomografia computadorizada. Nos últimos anos, as técnicas de imagem têm desempenhado um papel cada vez mais importante na deteção do CaP (Rebello *et al.*, 2021; Sarkar & Das, 2016).

Quando os resultados dos exames de rastreio estão fora do normal e levantam suspeitas, é indicada a realização de uma biópsia prostática, a qual é determinante para a confirmação do diagnóstico. O método mais comum é a biópsia transretal, que consiste na remoção de amostras de tecido da próstata, da zona periférica e especialmente de regiões suspeitas, através da inserção de uma agulha fina pelo reto. Este procedimento é geralmente guiado por ecografia, que ajuda a localizar com precisão o local de onde se pretende retirar as amostras (Dunn & Kazer, 2011; Rebello *et al.*, 2021; Sathianathen *et al.*, 2018). De um ponto de vista cirúrgico, a biópsia prostática é um procedimento invasivo que pode ter várias complicações pós-operatórias. Para ultrapassar estes obstáculos, tem-se desenvolvido e avaliado o potencial da utilização dos fluidos corporais, como o sangue e a urina, na deteção precoce do CaP como método minimamente invasivo. Estes fluidos contêm diversos biomarcadores que podem ser úteis no diagnóstico e no prognóstico do CaP, tais como células tumorais circulantes, vesículas extracelulares, ARN e microARNs circulantes (Munteanu *et al.*, 2020).

No caso de as amostras recolhidas confirmarem a presença de CaP, a agressividade do tumor é classificada usando o sistema de *Gleason*, desenvolvido por Donald Gleason em 1966 e que continua a ser utilizado na prática clínica até aos dias de hoje. É um sistema de classificação histopatológico que se baseia nas características histológicas das células de CaP, nomeadamente a extensão da diferenciação glandular e o padrão de crescimento no estroma (Sathianathen *et al.*, 2018). A escala de *Gleason* está dividida em cinco graus, em que o grau 1 corresponde a uma elevada diferenciação e o grau 5 a uma baixa diferenciação (Bahl, 2013; Rebello *et al.*, 2021; Sehn, 2018). Quanto maior o grau, maior a agressividade do tumor e, conseqüentemente, maior a rapidez com que o tumor pode crescer e disseminar para outras regiões (Beyzadeoglu *et al.*, 2010). Esta escala foi sofrendo algumas alterações ao longo dos anos (Sehn, 2018) e a Figura 11 ilustra a comparação entre o sistema de classificação original proposto por *Gleason* e o sistema atual.

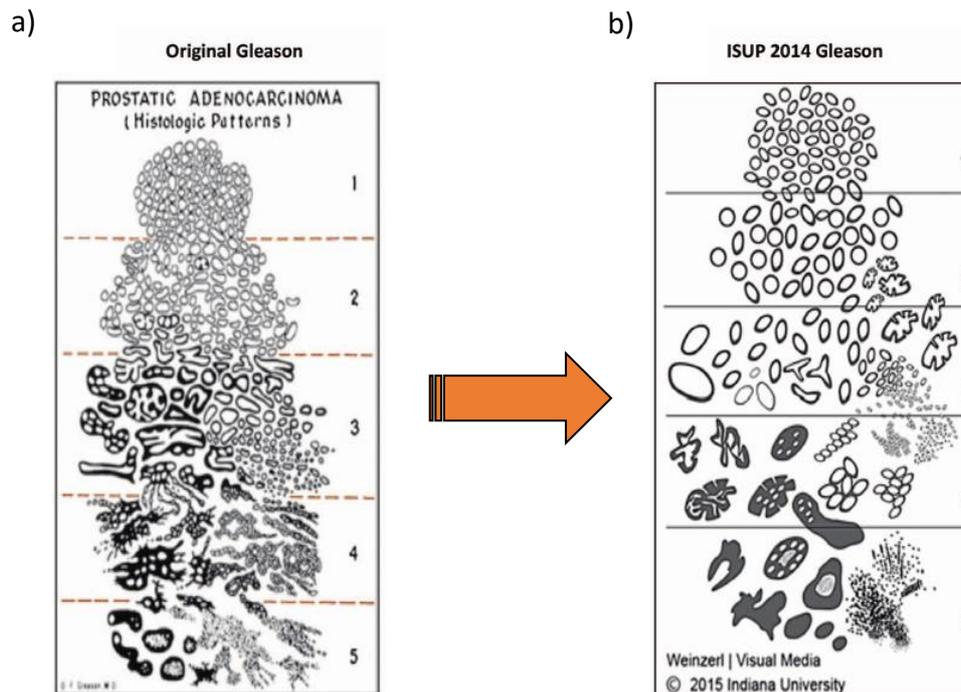


Figura 11: Evolução da escala de *Gleason*. a) Escala original, b) Escala atual, estabelecida pela *International Society of Urological Pathology* (ISUP), em 2014. Adaptado de (Paner *et al.*, 2019)

1.2.4.1. Estadiamento

Após o diagnóstico de CaP e considerando os resultados dos exames referidos no tópico anterior, são realizados testes complementares para verificar se as células tumorais estão confinadas exclusivamente à próstata ou se já se disseminaram para outras partes do corpo, sendo este processo denominado estadiamento. No caso do CaP, estes testes só se realizam se o doente apresentar sintomas ou sinais de que o tumor se espalhou para outros locais, mais especificamente dores nos ossos, uma concentração sérica elevada de PSA e/ou um elevado *score* de *Gleason*. A determinação do estágio da doença é essencial para escolher a melhor terapia e prever a resposta do doente ao tratamento (National Cancer Institute, 2021).

Os exames de imagem médica permitem avaliar a extensão da doença, sendo os mais comuns a Ressonância Magnética (RM), a tomografia computadorizada (TC), a tomografia por emissão de positrões (PET) e a cintigrafia óssea. A RM é utilizada, especialmente, em casos de doença localizada. A TC é recomendada para doentes com níveis séricos elevados de PSA, principalmente para verificar se o tumor se disseminou para os gânglios linfáticos próximos. No que toca à PET, tem crescido o interesse no uso desta técnica de imagiologia no estadiamento do CaP, com a utilização de vários radiotraçadores com afinidade pelas células de CaP, tais como a ^{11}C -colina, a ^{18}F -fluorocolina, a ^{18}F -fluciclovina e o ^{18}F -fluoreto de sódio. A cintigrafia óssea com derivados dos fosfonatos marcados pelo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é principalmente usada na deteção de metástases ósseas, bastante comuns no CPMRC (Ghafoor *et al.*, 2019; Litwin & Tan, 2017; Marques, 2016; National Cancer Institute, 2021).

O sistema de estadiamento do CaP mais comum baseia-se na classificação TNM (do inglês *tumour-node-metastasis*), desenvolvida inicialmente pelo *American Joint Committee on Cancer* em 1978, e mais recentemente atualizada com novos parâmetros tumorais (Sathianathen *et al.*, 2018). O sistema TNM classifica o tumor tendo em conta a sua extensão pelo organismo, nomeadamente o tumor primário (categoria T), a extensão para os gânglios linfáticos regionais (categoria N) e a existência de metástases à distância (categoria M), sendo que cada categoria é ainda dividida em subcategorias (Bahl, 2013; Dunn & Kazer, 2011; Schatten, 2018).

Com base no nível sérico de PSA, nos resultados do toque retal e da biópsia prostática, no grau de *Gleason* atribuído ao tumor e na classificação TNM, os doentes com cancro da próstata são estratificados em categorias de risco baixo, de risco intermédio ou de risco elevado (Dunn & Kazer, 2011).

1.2.5. Terapêutica

Existem diferentes opções terapêuticas para os doentes com cancro da próstata, pelo que é necessário ter em conta certos fatores a fim de escolher o melhor plano de tratamento. Alguns desses fatores são o estágio e grau do tumor, a idade, a expectativa de vida, o estado de saúde, a probabilidade de cura e os possíveis efeitos secundários de cada terapia (American Cancer Society, 2022; Rebello *et al.*, 2021).

Os homens diagnosticados com CaP localizado têm três opções terapêuticas principais, a vigilância ativa, a prostatectomia radical e a radioterapia. A vigilância ativa consiste na monitorização da progressão do CaP sem realização de nenhum tratamento e inclui a realização do teste do PSA a cada 6 meses, do toque retal pelo menos uma vez por ano, da biópsia prostática e de exames de imagem a cada 1-3 anos. Quando se observam alterações nos resultados dos exames e/ou o tumor começa a evoluir, são então consideradas opções de tratamento (Litwin & Tan, 2017; National Cancer Institute, 2021). A prostatectomia radical é indicada quando o CaP se encontra, ainda, confinado à próstata e consiste num procedimento cirúrgico para remoção de todo o órgão e também de algum tecido circundante, incluindo as vesículas seminais e, em alguns casos, os gânglios linfáticos próximos (Schatten, 2018; Silva, 2021). A radioterapia é cada vez mais comum como tratamento do CaP localizado, nomeadamente a radioterapia externa e a interna, a braquiterapia, podendo também ser usada após a remoção da próstata, no caso do tumor não ter sido removido na totalidade ou em caso de reincidência (American Cancer Society, 2022).

Tal como já foi referido, devido à dependência androgénica do CaP avançado, o tratamento *standard* para os doentes neste estágio da doença é a ADT, também denominada terapia hormonal (Calais da Silva, 2013). É um tratamento cujo objetivo é reduzir os níveis de androgénios ou bloquear a sua atividade e, conseqüentemente, impedir que estes continuem a estimular a proliferação das células de CaP, levando à diminuição do tamanho do tumor e ao

abrandamento da velocidade da sua progressão. Existem dois tipos principais de terapia hormonal, a castração cirúrgica e a castração médica (American Cancer Society, 2022).

A castração cirúrgica, ou orquiectomia, é um procedimento cirúrgico para remover um ou os dois testículos, que são a principal fonte de androgénios e, assim, reduzir a quantidade de hormonas produzidas. Como resultado, a maioria dos tumores deixa de crescer e regride durante algum tempo (National Cancer Institute, 2021; Sathianathen *et al.*, 2018).

A castração médica, ou química, consiste na administração de medicamentos que levam à diminuição dos níveis de androgénios no sangue, tais como os estrogénios, os agonistas da hormona libertadora da LH (LHRH, do inglês *luteinizing hormone-releasing hormone*) e os antagonistas da LHRH. Os estrogénios têm um efeito de *feedback* negativo sobre o hipotálamo pois diminuem a produção de LHRH e, como consequência, há um decréscimo da secreção da LH e os testículos deixam de ser estimulados a produzir testosterona. Os agonistas da LHRH têm a capacidade de diminuir a quantidade de testosterona produzida pelos testículos, através da inibição endócrina completa deste órgão. Os antagonistas da LHRH promovem a supressão da LH, através de um mecanismo de inibição competitiva pelos recetores da GnRH (do inglês *gonadotropin-releasing hormone*), provocando uma diminuição mais rápida dos níveis de testosterona (American Cancer Society, 2022; Calais da Silva, 2013; Marques, 2016).

Atualmente, os doentes com cancro da próstata metastático resistente à castração (CPMRC) continuam sem nenhuma opção terapêutica curativa e a maioria delas são apenas paliativas. Um dos tratamentos *standard* de 1ª linha do CPMRC é a quimioterapia com docetaxel. Quando o tumor progride, são recomendados, como terapêutica de 2ª linha, outros agentes quimioterapêuticos, como o cabazitaxel (Calais da Silva, 2013). Na última década, as opções para o tratamento deste estágio avançado do CaP têm sofrido alterações significativas, nomeadamente no que toca ao aumento da taxa de sobrevivência. Desde 2010, foram aprovados pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) novos agentes terapêuticos para o CPMRC, tais como o acetato de abiraterona, a enzalutamida, o sipuleucel-T, o denosumab e o dicloreto de rádio-223 (Bahl, 2013; Frieling *et al.*, 2015; Rebello *et al.*, 2021). Estas terapias, e outras que se encontram em desenvolvimento, podem ser observadas na Figura 12.

As metástases ósseas são frequentes em casos de CPMRC, já que quase todos os homens que morrem de cancro da próstata apresentam eventos esqueléticos. Por este motivo, a saúde óssea tem sido um dos focos terapêuticos adicionais no tratamento deste estágio da doença, com o surgimento de novas terapias, tais como o denosumab, os bisfosfonatos e os radiofármacos dirigidos para o osso (Frieling *et al.*, 2015; Litwin & Tan, 2017). Estes últimos permitem depositar uma grande dose de radiação nas metástases ósseas, evitando danos nos tecidos saudáveis próximos (American Cancer Society, 2022). Entre os radiofármacos aprovados para terapêutica do CPMRC existem os emissores de partículas beta ou alfa. Os emissores beta mais usados no tratamento paliativo das dores ósseas são o estrôncio-89 (⁸⁹Sr) (Metastron®) e o ácido etilenodiaminatetrametileno fosfónico marcado com samário-153 (¹⁵³Sm-EDTMP)

(Quadramet®). Embora os ensaios clínicos demonstrem uma diminuição da dor e uma melhoria da qualidade de vida dos doentes de CPMRC tratados com estes radiofármacos, não se verificou nem o prolongamento da sobrevivência, nem o decréscimo da frequência dos eventos esqueléticos. Com o objetivo de colmatar estas falhas, investigou-se o potencial terapêutico do emissor predominantemente alfa rádio-223 (Body *et al.*, 2015; Ingrassio *et al.*, 2018; Marques, 2016; Silva, 2021).

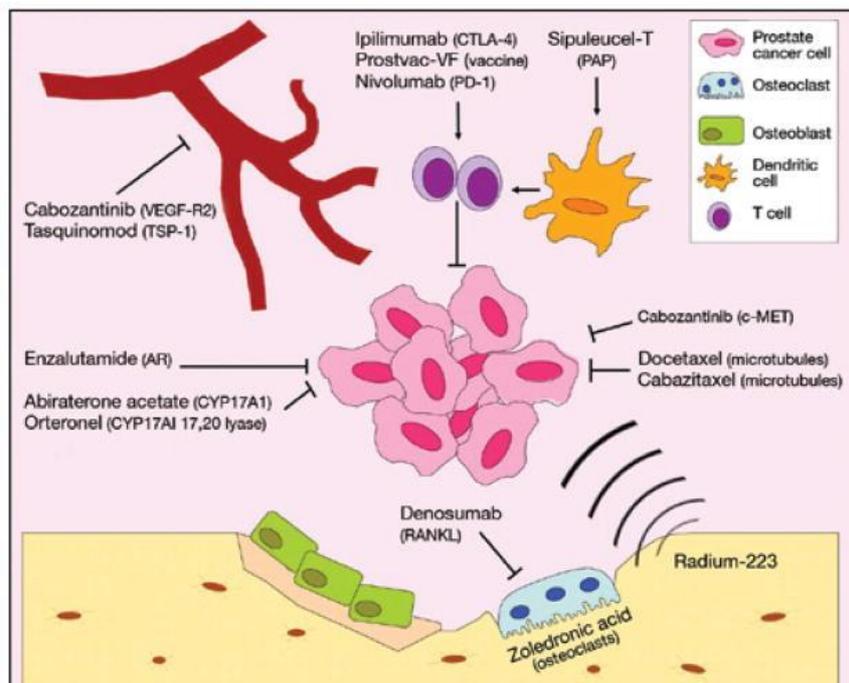


Figura 12: Terapias do CPMRC, aprovadas e em desenvolvimento, e respetivos alvos. Retirado de (Frieling *et al.*, 2015)

1.3. Rádio-223 no tratamento do CPMRC

O radioisótopo rádio-223, ao ligar-se ao ião cloreto, forma o dicloreto de rádio-223 ($^{223}\text{RaCl}_2$), que constitui o radiofármaco usado no tratamento de metástases ósseas em doentes com CPMRC, mas que não apresentam metástases viscerais. Este radiofármaco é comercializado pela empresa farmacêutica Bayer com o nome comercial Xofigo® (Bayer Pharma), sendo comumente designado apenas por rádio-223. O rádio-223 foi o primeiro emissor alfa aprovado pela FDA e pela EMA (do inglês *European Medicines Agency*) para fins terapêuticos (European Medicines Agency, 2013; M. Morris *et al.*, 2019).

A aprovação do rádio-223 baseou-se principalmente no ensaio ALSYMPCA (do inglês *ALpharadin in SYMptomatic Prostate CAncer*), um ensaio clínico de fase III realizado com o objetivo de investigar a biodistribuição, a dosimetria, a eficácia e a segurança do uso deste radiofármaco. Neste ensaio, 921 doentes com CPMRC e metástases ósseas sintomáticas, mas sem metástases viscerais, foram distribuídos aleatoriamente por dois grupos. O primeiro grupo

recebeu 6 injeções de rádio-223 a uma dose de 50 kBq/kg, em intervalos de 4 semanas. O segundo grupo recebeu placebo e, para além disso, alguns cuidados *standard*, que incluíram terapias hormonais, bisfosfonatos e radioterapia externa. Quando comparados os dois grupos, verificou-se uma resposta positiva dos doentes ao radiofármaco, tendo aumentado o tempo de sobrevida em 3,6 meses. Para além destes resultados, observou-se ainda um atraso no aparecimento dos primeiros eventos esqueléticos sintomáticos, um alívio significativo da dor e uma melhoria na qualidade de vida dos doentes (Lewis *et al.*, 2015; Liepe & Shinto, 2016; C. Parker *et al.*, 2013). Apesar de promissor, em 2018, a EMA restringiu o uso do rádio-223 devido ao aumento da mortalidade e de fraturas ósseas observadas no ensaio ERA-223. Neste sentido, a EMA recomendou o seu uso exclusivamente a doentes que tenham sido submetidos a, pelo menos, duas terapias prévias e que já não possam receber mais nenhuma (M. Morris *et al.*, 2019).

1.3.1. Administração, farmacocinética e dosimetria

O rádio-223 apresenta-se em frascos-ampola na forma de solução injetável isotónica límpida, incolor e com pH entre 6,0 e 8,0. Cada frasco-ampola contém 6 mL de solução de $^{223}\text{RaCl}_2$ com uma atividade específica inicial de 1100 kBq/mL, aquando da sua produção (European Medicines Agency, 2013). O tempo de meia-vida do rádio-223 é de 11,4 dias, o que permite uma fácil preparação, distribuição e administração do radiofármaco (Marques *et al.*, 2018).

Relativamente à administração do rádio-223, este é administrado no doente por via intravenosa, uma vez a cada 4 semanas, num total de 6 injeções. A atividade recomendada é de 55 kBq/kg em cada injeção. Durante a realização do tratamento, é monitorizado o perfil bioquímico do doente de modo a assegurar a continuidade do tratamento (Pandit-Taskar *et al.*, 2014; Shore, 2015). Apesar da dose administrada ao doente ser baixa em comparação com outros radiofármacos, recomenda-se a adoção do princípio ALARA (do inglês *As Low As Reasonably Achievable*), ou seja, a minimização do tempo passado nas áreas de radiação, a maximização da distância em relação às fontes de radiação e a utilização de proteção adequada (European Medicines Agency, 2013).

Depois de injetado, o rádio-223 é absorvido preferencialmente no osso e nas metástases ósseas, devido ao facto de ser um mímico do cálcio. De acordo com alguns estudos farmacocinéticos, concluiu-se que cerca de 60% da atividade administrada é incorporada nos ossos e a restante no intestino, nas primeiras 4 horas após a injeção, não se observando captação significativa nos outros órgãos (European Medicines Agency, 2013; Liepe & Shinto, 2016; Marques *et al.*, 2018). A Tabela 1 mostra a dosimetria do rádio-223 para alguns órgãos. O radiofármaco é excretado, principalmente, através das fezes e uma percentagem muito menor, cerca de 5%, através da urina (Pandit-Taskar *et al.*, 2014).

Tabela 1: Dosimetria do rádio-223 no corpo humano. Adaptado de (Pandit-Taskar *et al.*, 2014)

Órgão	cGy/37 MBq
Superfície óssea	4262,60
Medula óssea vermelha	513,51
Parede inferior do intestino	171,88
Parede da bexiga	14,9
Rins	11,86
Ovários	1,8
Parede uterina	0,94
Testículos	0,31

Um estudo mais detalhado da farmacocinética do rádio-223 e das doses de radiação absorvidas nos tecidos normais e tumorais pode contribuir para a otimização dos planos de tratamento, a maximização dos efeitos anti-tumorais deste medicamento e a minimização das lesões nos tecidos saudáveis (M. Morris *et al.*, 2019).

1.3.2. Mecanismo de ação do rádio-223

O rádio-223 é um mímico do cálcio e é incorporado em regiões de elevada renovação óssea e atividade osteoblástica, como é o caso das metástases ósseas de CaP, onde se liga seletivamente à superfície dos ossos e substitui o cálcio nos complexos de hidroxapatite, sendo também ativamente incorporado pelos osteoblastos (Shore, 2015; Suominen *et al.*, 2019). Após a sua deposição na matriz óssea, o rádio-223 emite partículas de elevada energia e que possuem um modo de ação dupla. Por um lado, as partículas alfa emitidas atuam diretamente nas células tumorais, induzindo lesões e morte celular. Por outro lado, estas partículas também interagem com o “ciclo vicioso” entre os osteoblastos e os osteoclastos e, conseqüentemente, induzem a interrupção do mecanismo de *feedback* positivo entre estas células e as células tumorais, o que leva à supressão da formação e progressão das metástases ósseas e à estabilização da estrutura normal do osso (Marques *et al.*, 2021; M. Morris *et al.*, 2019; Suominen *et al.*, 2017). O mecanismo de ação do rádio-223 encontra-se representado na Figura 13.

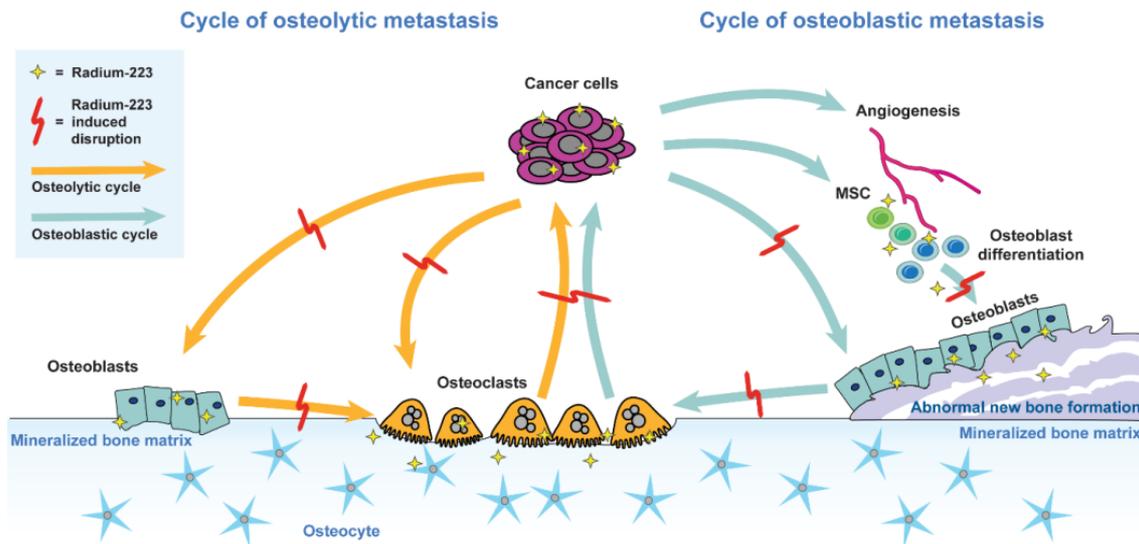


Figura 13: Mecanismo de ação do rádio-223 nas metástases ósseas. Retirado de (Suominen *et al.*, 2019)

Tal como referido anteriormente, o reduzido poder de penetração e a elevada LET das partículas alfa permitem a deposição de uma grande quantidade de energia nas células tumorais, enquanto as células saudáveis circundantes recebem uma dose de radiação baixa ou mesmo nula, o que resulta numa toxicidade hematológica limitada e poucos efeitos secundários associados a este radiofármaco. Por estas razões, o rádio-223 tem-se tornado numa escolha apelativa para o tratamento de lesões ósseas em doentes com CPMRC (Suominen *et al.*, 2019).

Apesar dos avanços na compreensão deste mecanismo, existem ainda certos aspetos que é necessário investigar e esclarecer, nomeadamente a nível molecular, tais como a localização do radiofármaco no interior das células tumorais, o modo de interação com os outros constituintes da metástase e o modo de intercalação do rádio-223 na estrutura cristalina do osso (Marques *et al.*, 2021).

1.4. Culturas celulares tridimensionais (3D)

1.4.1. Evolução das culturas celulares: do 2D ao 3D

Os estudos pré-clínicos, tanto em modelos animais como em culturas celulares, são extremamente importantes para a investigação biomédica e desenvolvimento de novas terapêuticas para o cancro e outras doenças, precedendo os ensaios clínicos. No entanto, as experiências com animais têm certas limitações, incluindo o facto dos animais responderem aos agentes patogénicos de forma diferente dos humanos, assim como as controversas questões éticas relacionadas (Sakalem *et al.*, 2021). Por sua vez, as culturas celulares tradicionalmente

utilizadas, que consistem em crescer as células em monocamada (2D), permitem uma rápida replicação e o estabelecimento de culturas de longo prazo, além de que são de baixo custo, fácil manipulação e manutenção simples. Contudo, nas culturas 2D, todas as células estão expostas aos mesmos níveis de nutrientes, oxigênio, fatores de crescimento, citoquinas, entre outros, o que não mimetiza corretamente o ambiente *in vivo* tridimensional dos tecidos e tumores. Outras limitações das culturas 2D são as reduzidas interações célula-célula e célula-matriz extracelular, baixa diferenciação celular, proliferação mais rápida do que nos tumores *in vivo* e perfil genético modificado quando comparado com o tecido *in vivo* (Caleffi *et al.*, 2021; B. Pinto *et al.*, 2020).

Com o objetivo de ultrapassar estas limitações, a cultura celular tem sofrido avanços significativos com o desenvolvimento de modelos celulares 3D. No geral, as culturas 3D, em comparação com as 2D, constituem uma representação mais precisa e real do microambiente celular *in vivo*, principalmente em termos da comunicação entre as células e a matriz extracelular, mas também da expressão gênica, da morfologia, da proliferação e da diferenciação celular, da polaridade, das vias de sinalização, dos mecanismos moleculares e dos gradientes de nutrientes e de oxigênio. Assim, as culturas celulares 3D estabelecem uma ligação entre as culturas 2D e os ensaios clínicos, reduzindo as experiências *in vivo* em modelos animais (Sebők *et al.*, 2021; Silva, 2021; Suckert *et al.*, 2021).

1.4.2. Tipos de culturas celulares 3D

Existem vários modelos celulares 3D, sendo os mais comuns os esferoides e os organoides. Os esferoides são culturas celulares, geralmente, com uma forma aproximadamente esférica, constituídos ou por um único tipo de células (culturas homotípicas) ou por vários tipos de células (culturas heterotípicas) que se agregam para formar uma estrutura tridimensional capaz de melhor mimetizar um determinado tecido ou órgão. O tamanho dos esferoides varia dependendo do número de células cultivadas e do ou dos tipos de células. Estes fatores podem ainda influenciar a capacidade de estabelecer ligações célula-célula e célula-matriz extracelular, refletindo-se na morfologia dos esferoides, que podem ser mais ou menos irregulares. É importante ter em conta que quanto maior for o tamanho dos esferoides, maior a probabilidade de desenvolverem um *core* necrótico e hipóxico, o que deve ser controlado na prática experimental (Caleffi *et al.*, 2021; Sakalem *et al.*, 2021; ThermoFisher, 2020a).

Os organoides são estruturas mais complexas do que os esferoides, como se pode observar na Figura 14, constituídas por pelo menos um tipo de células epiteliais e um tipo de células mesenquimais. Os organoides diferenciam-se dos esferoides essencialmente pela capacidade de replicarem funções fisiológicas do tecido que mimetizam. Representam múltiplos tecidos que formam um determinado órgão, ou um fragmento de um órgão, necessitando de mais tempo para se formarem. A possibilidade de usar diferentes tipos de células no mesmo organoide permite uma representação mais real da funcionalidade e diferenciação dos tecidos. Alguns

exemplos de organoides já produzidos são “mini pulmões”, “mini corações” e “mini cérebros”. Tanto nos esferoides como nos organoides, as células apresentam a capacidade de se organizarem espontaneamente, depositarem matriz extracelular e formarem microambientes específicos (Sakalem *et al.*, 2021; Suckert *et al.*, 2021).

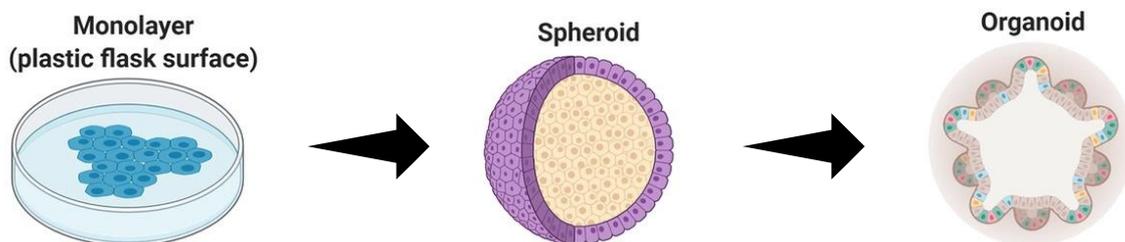


Figura 14: Representação de culturas 2D, esferoides e organoides. Adaptado de (Sakalem *et al.*, 2021)

Nos últimos anos, têm sido propostos vários modelos para a formação de culturas 3D, tais como a técnica *hanging drop*, a cultura de sobreposição líquida (do inglês *liquid overlay technique*), o uso de *scaffolds*, os hidrogéis e os modelos magnéticos.

A técnica *hanging drop* consiste no cultivo de células em gotas suspensas que, devido à ação conjunta da tensão superficial e da força gravitacional, promove a agregação espontânea das células em esferoides. Embora seja uma técnica de baixo-custo e não necessite de equipamentos específicos, possui algumas limitações, tais como a dificuldade na sua execução e na transferência dos esferoides para outra superfície (Caleffi *et al.*, 2021).

Na cultura de sobreposição líquida, as células são cultivadas numa superfície não-aderente que as repele e promove a agregação umas às outras em esferoides. As plataformas de cultura mais utilizadas nesta técnica são as placas *ultra-low attachment* (ULA), que englobam as placas revestidas com biomateriais repelentes como, por exemplo, a agarose e o ágar, e as placas feitas de materiais com propriedades anti-adesivas, promovendo a formação de esferoides no centro dos poços, que podem ser de fundo plano ou redondo. A superfície deve ser não citotóxica, biologicamente inerte e não degradável. É uma das técnicas mais utilizadas recentemente na produção de agregados celulares 3D, devido à sua simplicidade, facilidade de execução e possibilidade de produzir esferoides em larga-escala e de os manter em cultura a longo-prazo (Costa *et al.*, 2014, 2018; Metzger *et al.*, 2011).

Os modelos magnéticos baseiam-se na magnetização das células com nanopartículas magnéticas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina, designadas NanoShuttle™-PL, que se ligam às células em monocamada, através de interações eletrostáticas com a membrana celular. Após magnetização, as células são semeadas em placas não aderentes ou de baixa aderência e, em

seguida, sujeitas a um campo magnético, normalmente proveniente de um ímã, que induz a agregação das células em estruturas 3D ao estabelecerem interações célula-célula (Haisler *et al.*, 2013). Existem 3 modelos magnéticos principais: a levitação magnética, em que o ímã é colocado sobre a placa com as células; o *bioprinting*, em que a placa com as células é colocada sobre o ímã; e a formação de anéis, que usa ímãs em forma de anéis colocados sobre a placa onde se encontram as células. Esta técnica é fácil de implementar e permite a formação rápida de esferoides consistentes, o controlo do movimento e da agregação celular e a manutenção dos esferoides em cultura por longos períodos de tempo, para além de que não necessita de uma matriz extracelular artificial (Caleffi *et al.*, 2021). Estas vantagens têm despertado cada vez mais atenção para os modelos magnéticos, tendo aumentado significativamente a sua utilização para produzir culturas 3D (Souza-Araújo *et al.*, 2020).

1.4.3. Importância das culturas celulares 3D na representação do microambiente tumoral

O microambiente tumoral é composto por uma população heterogénea de células tumorais, matriz extracelular e células do estroma associadas ao tumor, como fibroblastos, células endoteliais, adipócitos e células do sistema imunitário. A matriz extracelular é responsável pelo suporte estrutural destas células e pela regulação de diversos processos, incluindo a migração, a proliferação e a diferenciação celular e a comunicação entre as células (ThermoFisher, 2020a). A organização celular dos tumores é bastante complexa e as interações entre os diversos componentes desempenham um papel essencial no crescimento e na progressão do tumor, assim como no desenvolvimento de metástases. Por este motivo, têm-se desenvolvido novas estratégias terapêuticas que bloqueiam a interação entre as células tumorais e o microambiente tumoral que as rodeia (B. Pinto *et al.*, 2020). Outra das características deste ambiente é a divisão descontrolada das células, que promove o aumento do tamanho do tumor e resulta num fornecimento insuficiente de oxigénio e de nutrientes às células tumorais no *core* do tumor, levando ao aparecimento de hipóxia nessa região. A hipóxia constitui uma das principais características dos tumores, contribuindo para o seu desenvolvimento e resistência às terapêuticas. Deste modo, a investigação de novos tratamentos contra o cancro requerem modelos pré-clínicos capazes de reproduzir a complexa arquitetura multicelular do microambiente tumoral e as suas barreiras biológicas, pelo que as culturas 2D convencionais são demasiado simples para este propósito (Fontana *et al.*, 2021; B. Pinto *et al.*, 2020).

Os avanços tecnológicos permitiram a evolução das culturas 2D para as culturas 3D, nas quais as células tumorais têm a capacidade de estabelecer interações célula-célula e célula-matriz extracelular e de se agregarem espontaneamente em esferoides, o que resulta numa estrutura 3D com uma organização espacial semelhante à dos tumores. Os esferoides tumorais são geralmente compostos por 3 zonas concêntricas (Figura 15), uma zona mais externa de

elevada proliferação e migração celular, uma zona intermédia de células quiescentes e uma zona interna de células hipóxicas e necróticas (Fontana *et al.*, 2021; B. Pinto *et al.*, 2020; ThermoFisher, 2020a). O desenvolvimento de hipoxia e de necrose deve-se aos gradientes de nutrientes e de oxigénio e à maior dificuldade de estes alcançarem o interior dos esferoides, juntamente com a acumulação de resíduos metabólicos. Como a camada periférica está exposta a grandes concentrações de oxigénio, nutrientes e fatores de crescimento presentes no meio, a sua proliferação é estimulada (Caleffi *et al.*, 2021; Leek *et al.*, 2016).

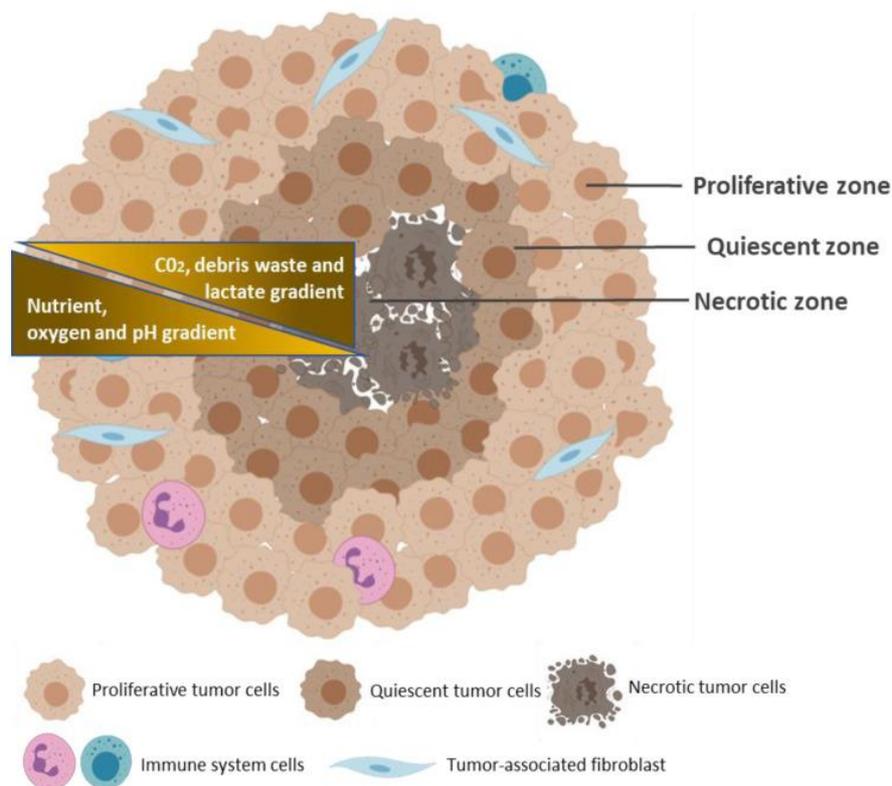


Figura 15: Estrutura típica de um esferoide tumoral multicelular. Retirado de (B. Pinto *et al.*, 2020)

Vários estudos pré-clínicos demonstraram que enquanto células tumorais em monocamada eram sensíveis à ação de determinados agentes quimioterapêuticos, as mesmas células, mas em esferoides, tornavam-se resistentes a estes agentes. Noutros casos, os fármacos apenas eram eficazes quando as células eram cultivadas em ambiente 3D. Estes resultados demonstram a importância e a potencialidade da cultura celular 3D na investigação oncológica, mais concretamente no estudo da biologia de diversos tipos de cancro, desde o estudo da iniciação da carcinogénese, aos processos de invasão e de metastização e à previsão dos efeitos e eficácia de certos fármacos (Leenhardt *et al.*, 2019; Sakalem *et al.*, 2021).

1.4.4. Culturas celulares 3D como modelos pré-clínicos do CaP

Apesar de existirem várias linhas celulares de diferentes estádios desta patologia, quando cultivadas em 2D não representam de uma forma realista o microambiente e a resposta terapêutica do cancro da próstata *in vivo*. Ao longo dos últimos anos, foram aplicados vários métodos e tecnologias na produção de culturas celulares 3D de CaP, com o objetivo comum de colmatar as falhas das culturas 2D e mimetizar com maior precisão a estrutura *in vivo* deste tumor, permitindo a investigação e a análise da resposta a medicamentos e o desenvolvimento de novas terapêuticas (Fontana *et al.*, 2020).

São vários os modelos de cultura 3D já utilizados no estudo do CaP, tais como a cultura de sobreposição líquida, a técnica *hanging drop*, a tecnologia *organ-on-chip*, os hidrogéis ou outros *scaffolds* que mimetizam a matriz extracelular e os explantes derivados de doentes (Fontana *et al.*, 2020; B. Pinto *et al.*, 2020). Recorrendo à cultura de sobreposição líquida, foram desenvolvidos esferoides homotípicos de duas linhas celulares de CaP, a PC3 e a LNCaP, com o objetivo de avaliar os efeitos anti-tumorais de diversos compostos, tais como a alvespimicina, o elesclomol, o olaparib e o rucaparib (Costa *et al.*, 2018). Fitzgerald e colaboradores (Fitzgerald *et al.*, 2015) produziram esferoides, também de células PC3 e LNCaP, em *scaffolds* de colagénio para avaliar a sensibilidade ao tratamento com o agente quimioterapêutico docetaxel. Noutro estudo realizado por Camus e colaboradores (Camus *et al.*, 2016) foi utilizada a técnica *hanging drop* para obter esferoides da linha celular PC3, os quais foram expostos a 12 Gy de raios-X, em doses fracionadas e, posteriormente, os efeitos da radiação foram monitorizados através da *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*. Os efeitos do agente teranóstico cobre-64 foram recentemente avaliados em esferoides homotípicos de três linhas celulares de CaP, nomeadamente constituídos por células 22RV1, DU145 ou LNCaP, gerados com a cultura de sobreposição líquida em placas ULA de 96 poços (C. Pinto *et al.*, 2020).

O uso de esferoides para a avaliação dos efeitos radiobiológicos de emissores beta ou alfa é muito reduzido ou praticamente inexistente. Contudo, pode apresentar uma abordagem de extrema relevância para o estudo do efeito de radiofármacos, em concreto do rádio-223, considerando as vantagens do uso de modelos celulares 3D face às culturas tradicionais.

2. Objetivos

O cancro da próstata (CaP) continua a ser o segundo tipo de cancro mais frequentemente diagnosticado e a quinta causa de morte global relacionada com o cancro, em homens (Sung *et al.*, 2021). O estágio mais avançado desta doença designa-se cancro da próstata metastático resistente à castração (CPMRC) e está associado a um prognóstico crítico. Apesar dos avanços recentes nos tratamentos, atualmente ainda não existe cura para o CPMRC, sendo as opções terapêuticas disponíveis apenas paliativas (Marques *et al.*, 2021). Com uma população cada vez mais envelhecida torna-se, assim, fundamental desenvolver novos tratamentos que melhorem a sobrevida global dos doentes.

Uma das opções terapêuticas é o rádio-223, um radionuclídeo que emite predominantemente partículas alfa e foi aprovado pela FDA e pela EMA para o tratamento de doentes com CPMRC que apresentem metástases ósseas e sem metástases viscerais. O uso deste radiofármaco demonstrou, em ensaios clínicos, um aumento do tempo de sobrevida e uma melhoria da qualidade de vida dos doentes, principalmente devido à diminuição da ocorrência de eventos ósseos. Este radionuclídeo é um análogo do cálcio, logo, é principalmente absorvido a nível dos ossos, mais especificamente em zonas de elevada renovação óssea, como é o caso das metástases ósseas (Abou *et al.*, 2015; M. Morris *et al.*, 2019). Apesar de promissor, os resultados clínicos associados ao uso do rádio-223 não correspondem às expectativas e ainda existem dúvidas acerca do seu mecanismo de ação, especialmente sobre a sua localização nas metástases e nas células tumorais, os seus alvos moleculares e a forma específica como interage com os elementos constituintes do nicho metastático (Marques *et al.*, 2018, 2021). Uma melhor compreensão do modo de atuação do rádio-223 poderá levar a um aumento da eficácia terapêutica deste radiofármaco e ao desenvolvimento de possíveis combinações com outros agentes anticancerígenos, não só para o tratamento do CPMRC, mas também de outros cancros que metastizam frequentemente para os ossos (M. Morris *et al.*, 2019).

Deste modo, o principal objetivo deste projeto, “Efeitos do Rádio-223 em modelos celulares de cancro da próstata metastático”, consistiu em avaliar os efeitos radiobiológicos do rádio-223 em modelos celulares 3D de CaP, permitindo uma melhor representação do microambiente tumoral *in vivo*. Para alcançar este objetivo, foram definidas as seguintes metas:

- Estabelecer e otimizar modelos 3D homotípicos de CaP metastático, constituídos pela linha celular PC3 ou pela LNCaP;
- Avaliar os efeitos radiobiológicos do rádio-223 em esferoides de CaP, em termos de sobrevivência, proliferação, viabilidade, morte e morfologia celular;
- Comparar a radiosensibilidade das células irradiadas em esferoides (3D) com as células irradiadas em cultura 2D.

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo estão apresentadas as várias técnicas, materiais e reagentes utilizados para o desenvolvimento deste projeto.

A primeira fase deste projeto consistiu no estabelecimento de culturas 2D de duas linhas celulares de cancro da próstata (CaP) e no desenvolvimento e otimização de culturas 3D homotípicas de CaP, mais especificamente esferoides. Foram usadas quatro metodologias diferentes para a obtenção de esferoides: a técnica *hanging drop*, o método de levitação magnética, a junção dos métodos *hanging drop* e levitação magnética e a cultura de sobreposição líquida.

A segunda fase deste projeto consistiu em estudar os efeitos radiobiológicos do dicloreto de rádio-223 ($^{223}\text{RaCl}_2$), designado como rádio-223 nestas secções, em ambos os modelos celulares de CaP, quando expostos a diferentes atividades volúmicas (55-7040 Bq/mL). Os efeitos induzidos pela exposição ao rádio-223, durante diferentes tempos, foram avaliados inicialmente em culturas celulares 2D, em termos de proliferação e de sobrevivência celular. Foram, também, avaliados os efeitos da exposição ao rádio-223 em culturas celulares 3D (esferoides) de CaP, em termos de viabilidade e de morte celular, assim como da estrutura e da morfologia dos esferoides.

3.1. Cultura celular

A cultura celular consiste na remoção de células de um animal ou planta e no seu cultivo *in vitro* num ambiente artificial adequado, em monocamada, se as células crescerem em cultura aderente, ou em suspensão. As primeiras técnicas de cultura celular foram desenvolvidas há mais de cem anos e desde então têm contribuído para grandes avanços na ciência. Hoje em dia, é uma ferramenta fundamental nos laboratórios de todo o mundo para estudar a fisiologia e a morfologia das células, sendo aplicada em diversas áreas, tais como o estudo de mecanismos moleculares de doenças, o potencial terapêutico de medicamentos e outros compostos, o desenvolvimento de novos fármacos, a produção em grande escala de vacinas, entre outros (Bleloch, 2021).

Apesar das condições de cultura celular variarem de acordo com o tipo de células, todas necessitam de um recipiente adequado contendo meio de cultura que fornece os nutrientes (aminoácidos, hidratos de carbono, vitaminas, sais minerais, entre outros), os fatores de crescimento e as hormonas essenciais para as células, assim como da presença de gases (oxigénio e dióxido de carbono) que, em conjunto, regulam as condições físico-químicas, nomeadamente o pH, a pressão osmótica e a temperatura, adequados à propagação celular. Para além dos procedimentos básicos de cultura celular, é também muito importante manter as células num ambiente assético e estéril, para prevenir contaminações (Bleloch, 2021; ThermoFisher, 2020b).

3.1.1. Culturas celulares 2D de CaP

Para a realização deste projeto foram utilizadas duas linhas celulares humanas de cancro da próstata (CaP), a PC3 (ATCC[®] CRL-1435[™]) e a LNCaP (ATCC[®] CRL-1740[™]), adquiridas à ATCC (do inglês *American Type Culture Collection*). A linha celular PC3 foi isolada em 1979 a partir de uma metástase óssea localizada nas vértebras lombares de um homem caucasiano de 62 anos com adenocarcinoma da próstata de grau IV. As células PC3 possuem uma morfologia do tipo epitelial e não expressam recetores de androgénios, pelo que o seu crescimento é independente destas hormonas (ATCC, 2021b; Namekawa *et al.*, 2019). A linha celular LNCaP foi estabelecida em 1977 através de uma biópsia de uma lesão metastática num gânglio linfático supraclavicular de um homem caucasiano de 50 anos, com diagnóstico de CaP metastático. Tal como as PC3, as células LNCaP também apresentam uma morfologia do tipo epitelial. No entanto, tendo em conta as diferentes origens das duas linhas celulares, as células LNCaP possuem um crescimento mais lento, um menor potencial metastático e dependência androgénica, já que expressam recetores de androgénios e PSA (ATCC, 2021a; Namekawa *et al.*, 2019). Na Figura 16 é possível observar a morfologia destas duas linhas celulares.

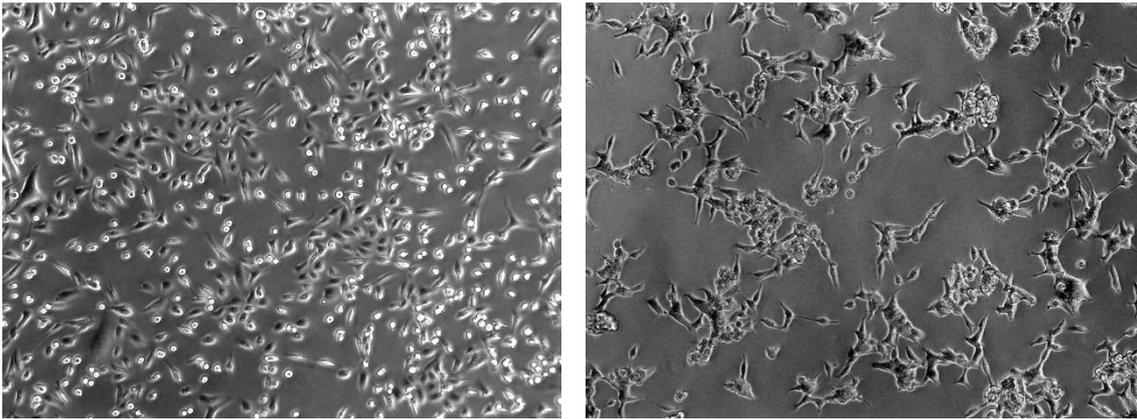


Figura 16: Imagens de células PC3 (esquerda) e de células LNCaP (direita), adquiridas num microscópio óptico invertido, com uma ampliação de 100×.

Tanto as células PC3 como as LNCaP foram descongeladas e propagadas em cultura aderente e, tendo em conta o recomendado pela ATCC, foram mantidas numa atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de CO₂ e a uma temperatura de 37°C, dentro de uma incubadora (Binder®, Alemanha). Ambas as linhas celulares foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640, Sigma 4130), suplementado com 5 g/L de glucose (Scharlab GL01271000), 100 µM de piruvato de sódio (Sigma S8636), 5% de FBS (do inglês *fetal bovine serum*) (Gibco 10270-106) e 1% de antibiótico (Sigma A5955), a um pH de 7,4. Durante o período em que estas células se mantiveram em cultura, foram feitos testes, de duas em duas semanas, para detetar a presença de *Mycoplasma*, microorganismos com um tamanho muito reduzido, não visíveis ao microscópio e que têm impacto no crescimento e no desenvolvimento das culturas de células (Uphoff & Drexler, 2014).

Como as células foram propagadas em cultura aderente, para a realização dos ensaios e formação das culturas 3D foi necessário destacá-las da superfície aderente e preparar suspensões celulares. Primeiro, os frascos foram observados ao microscópio e apenas se procedeu ao destacamento das células quando a confluência era cerca de 80/90%. Nestes casos, o meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas com 4 mL de PBS (do inglês *phosphate buffered saline*), que é uma solução tampão fosfato-salina e com pH de 7,4. De seguida, aspirou-se o PBS e as células PC3 foram incubadas com 2 mL da solução tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco 25200-072) e as células LNCaP com 2 mL de TrypLE™ Express (Gibco 12605-028). A função do PBS é lavar vestígios de meio que possam ter ficado no frasco, pois este contém FBS que pode inativar a função das soluções de dissociação. Ao fim de 3 a 5 minutos na incubadora, observaram-se os frascos ao microscópio para confirmar o destacamento das células e inativaram-se as soluções adicionando 5 mL de meio de cultura por frasco. Após homogeneização, foi determinada a concentração celular. A homogeneização é particularmente importante no caso das células LNCaP, pois formam muitos agregados, como se pode ver na Figura 16.

Para a determinação da concentração celular, recorreu-se ao método de exclusão de azul tripano. Este é um dos métodos tradicionais de análise da viabilidade celular, permitindo contar o número de células viáveis numa suspensão celular. As células viáveis possuem uma membrana celular intacta e impermeável ao azul tripano, enquanto as células não viáveis possuem uma membrana celular danificada e disfuncional e, conseqüentemente, permeável ao mesmo corante. Deste modo, quando observadas ao microscópio, as células coradas de azul correspondem a células não viáveis e as células “brilhantes” correspondem a células viáveis (Louis & Siegel, 2011). Adicionaram-se 20 µL da suspensão celular e 20 µL de azul tripano (Aldrich 30,264-3), na diluição de 1:20 em água ultra-pura e, utilizando um hemocitómetro e um microscópio ótico invertido (Motic AE31), com ampliação de 100×, contaram-se as células em cada quadrante e calculou-se a concentração celular, com base na Equação 1. A suspensão celular foi posteriormente ajustada para a concentração celular pretendida, de acordo com o ensaio a realizar.

$$[Celular] \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = \text{média do nº células viáveis} \times 2 \times 10000$$

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

3.1.2. Culturas celulares 3D de CaP

A cultura celular em 2D é, ainda, a mais amplamente utilizada na descoberta e estudo de agentes terapêuticos anticancerígenos. Contudo, este tipo de cultura não é capaz de reproduzir a arquitetura e a estrutura dos tumores malignos na sua totalidade, o que leva a uma previsão pouco precisa da resposta das células tumorais aos fármacos. Por outro lado, é também necessário reduzir a utilização de animais em laboratórios, devido aos problemas económicos e éticos associados. Para ultrapassar estas limitações e obter uma melhor representação do microambiente tumoral *in vivo*, foram desenvolvidos os modelos celulares 3D (M. Carvalho, 2016). Tal como referido no tópico 1.3.2, existem diversas técnicas para a formação de agregados celulares tridimensionais, as quais necessitam de ser otimizadas tendo em conta as características das células utilizadas, de modo a aumentar a sua robustez, a eficácia e a reprodutibilidade (Costa *et al.*, 2014).

Assim, para além das culturas 2D e de modo a estudar os efeitos do rádio-223 num microambiente mais semelhante ao *in vivo*, realizaram-se experiências em culturas 3D, com esferoides homotípicos. O nosso grupo de investigação já desenvolveu anteriormente este tipo de esferoides homotípicos de CaP, constituídos por células LNCaP ou PC3, ambas linhas celulares de CaP metastático. Contudo, os esferoides desenvolvidos previamente apresentavam um tamanho muito grande e, além disso, desintegravam-se facilmente dificultando a realização dos estudos de radiobiologia e a reprodutibilidade dos mesmos. Deste modo, esta fase do projeto

teve início com a otimização da cultura 3D para obtenção de esferoides homotípicos constituídos por células PC3 ou LNCaP, de modo a ultrapassar as limitações anteriores. O estabelecimento dos primeiros esferoides foi realizado com recurso à técnica *hanging drop*. De acordo com estudos realizados anteriormente, o tamanho e a densidade dos esferoides são influenciados tanto pelo tipo de linha celular como pelo número inicial de células. Foram, então, preparadas suspensões celulares com diferentes concentrações iniciais e colocaram-se, com a ajuda de uma micropipeta, gotas de 10 μ L no centro de cada poço (1 gota por poço) em placas de 24 poços não aderentes. Considerando que se forma um esferoide em cada gota, as suspensões celulares foram preparadas de forma a obter as seguintes concentrações: 2 500, 5 000, 10 000, 12 500, 15 000 e 20 000 células/esferoide. Foram também formadas gotas de 100 μ L de PBS na tampa da placa, como exemplificado na Figura 17, para manter uma atmosfera húmida e evitar que as gotas secassem.

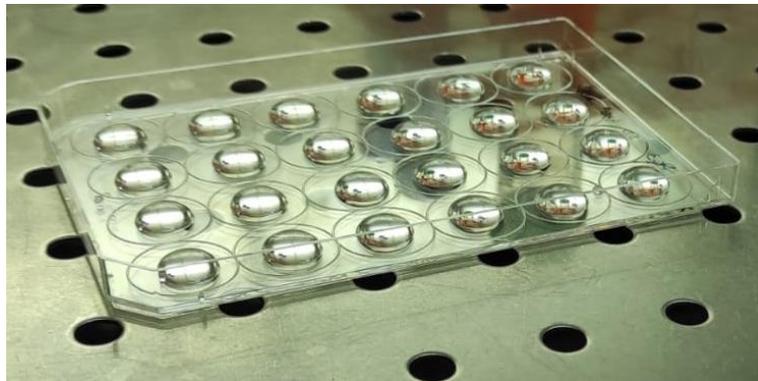


Figura 17: Gotas de PBS na tampa da placa de 24 poços não aderente.

De seguida, a placa foi colocada sobre a tampa (Figura 18) e incubada durante 48 horas para permitir a formação dos esferoides.



Figura 18: Placa de 24 poços não aderente com uma gota de suspensão celular em cada poço, colocada sobre a tampa com as gotas de PBS.

Em seguida, o PBS foi aspirado e foram adicionados 500 μL de meio de cultura a cada poço, de modo a garantir o acesso necessário a oxigênio e nutrientes. Colocou-se novamente a placa na incubadora para os esferoides continuarem o seu crescimento e desenvolvimento durante 8 dias. A formação, o tamanho e a estrutura de cada esferoide foram monitorizados ao longo do tempo. A Figura 19 corresponde a um esquema representativo desta metodologia.

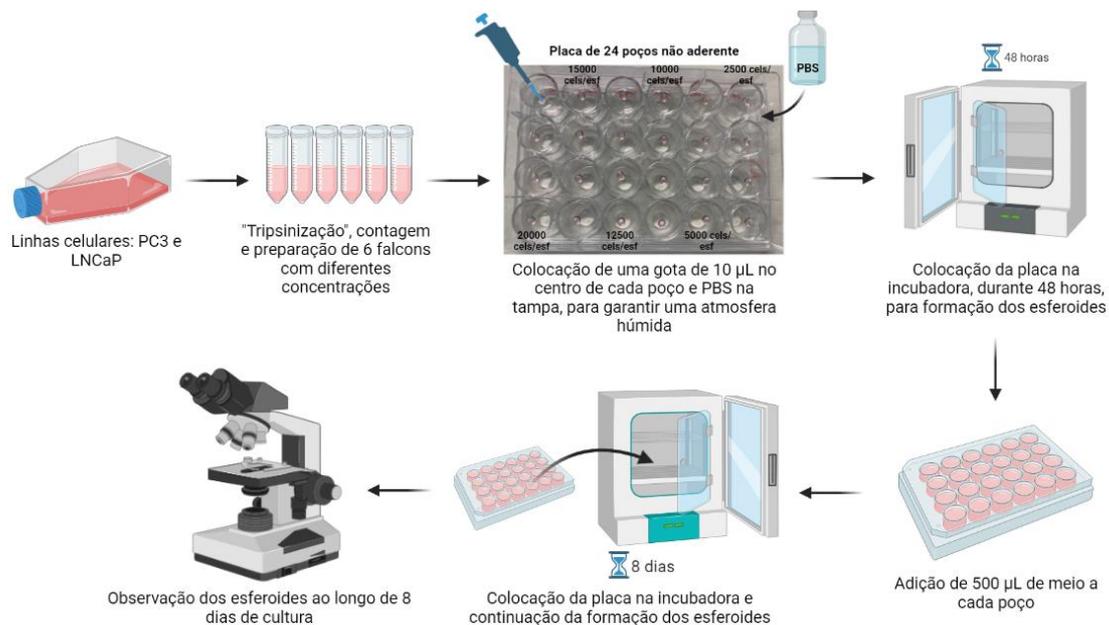


Figura 19: Esquema do processo de formação dos esferoides, com diferentes concentrações, através da técnica *hanging drop*. (Esquema criado no BioRender)

Contudo, os esferoides obtidos com a técnica *hanging drop*, acima descrita, apresentaram uma baixa coesão, o que iria dificultar a sua transferência e manipulação durante o processo de irradiação e a execução dos ensaios. Assim, foram avaliados outros 3 métodos para o estabelecimento de esferoides menos frágeis e mais coesos: o modelo de levitação magnética, a junção das técnicas *hanging drop* e levitação magnética e a cultura de sobreposição líquida. Nesta etapa, apenas foi utilizada a linha celular PC3 devido à maior facilidade na propagação e na manutenção destas células, assim como na de se agregarem em estruturas 3D.

Para o desenvolvimento do modelo de levitação magnética, as células PC3 foram semeadas num frasco de 25 cm^2 e incubadas durante aproximadamente 24 horas, possibilitando a sua aderência. A fim de magnetizar as células, foram adicionados 80 μL da solução de nanopartículas (NanoShuttleTM-PL, Greiner Bio-One 657841), tendo o cuidado de homogeneizar bem a solução antes de a adicionar ao frasco. De seguida, as células foram incubadas por 24 horas para permitir a internalização das nanopartículas pelas células. Após este tempo, foi preparada uma suspensão celular com a concentração de 25 000 células/mL, da qual foram transferidos 400 μL para cada poço de uma placa de 24 poços não aderente de modo a obter 10 000 células/poço.

Logo em seguida, foi colocada sobre os poços uma placa de levitação constituída por ímãs, como se encontra representado na Figura 20, de modo a induzir a levitação das células magnetizadas e sua agregação em estruturas 3D.



Figura 20: Placa de levitação colocada sobre a placa de 24 poços não aderente.

Outra abordagem foi a junção das técnicas *hanging drop* e levitação magnética, uma abordagem experimental que o nosso grupo conduziu de modo a tentar ultrapassar as limitações observadas quando as metodologias eram desenvolvidas em separado, mais concretamente, a dificuldade em manipular esferoides produzidos por *hanging drop* e a dificuldade em obter esferoides de menor dimensão e mais coesos por levitação magnética. As primeiras etapas coincidem com o modelo de levitação magnética, de modo a magnetizar as células. No entanto, após destacar as células magnetizadas do frasco de 25 cm², foi preparada uma suspensão celular com a concentração de 1×10^6 células/mL. De seguida, formaram-se gotas de 10 µL da suspensão celular segundo a mesma metodologia utilizada na técnica *hanging drop*, como representado na Figura 17 e Figura 18. Após 24 horas de incubação, a placa com as gotas foi colocada sobre uma placa magnética de concentração (Figura 21), com o objetivo de atrair as células que incorporaram as nanopartículas e evitar a sua dispersão pelo meio, assegurando a manutenção da coesão dos esferoides durante a adição dos 500 µL de meio a cada poço. Passados 15 minutos, a placa magnética foi retirada e os esferoides ficaram suspensos no fundo dos poços, sendo depois colocados na incubadora para continuarem o seu desenvolvimento (Silva, 2021).



Figura 21: Placa magnética de concentração.

Por fim, foi testada a cultura de sobreposição líquida, começando pela preparação de uma suspensão celular com a concentração de 25 000 células/mL, da qual se transferiram 200 μ L para cada poço de uma placa de 96 poços de fundo redondo e baixa aderência, de forma a obter 5 000 células/esferoide. Esta concentração inicial foi escolhida com base nos resultados obtidos na primeira etapa de otimização do tamanho dos esferoides. Foram usadas placas de 2 marcas diferentes: a *BIOFLOAT™ 96-well plate* (faCellitate F202001) e a *Corning® 96-well Black/Clear Round Bottom Ultra-Low Attachment (ULA) Spheroid Microplate* (Corning 4515) (Figura 22). Ambas as placas possuem uma superfície com propriedades anti-adesivas que repelem as células e promovem a sua aglomeração no centro dos poços, mas com revestimentos e configurações geométricas dos poços distintos. As placas foram incubadas durante 10 dias, sendo os esferoides formados em cada uma das placas observados e analisados ao microscópio ótico ao longo do tempo.

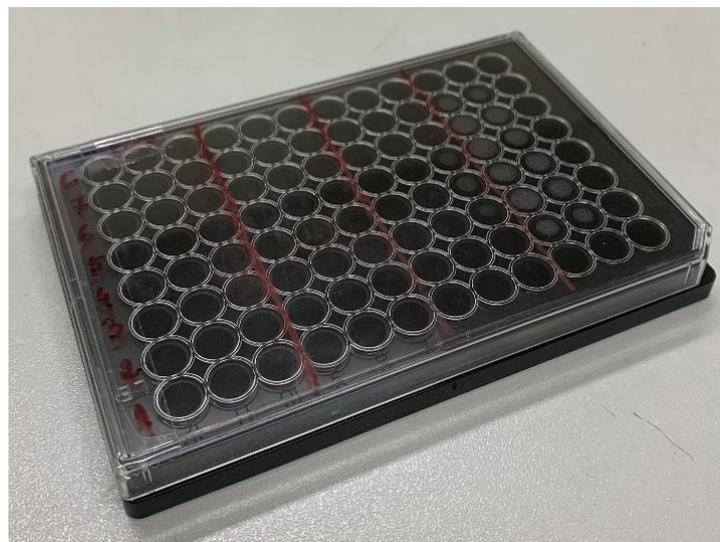


Figura 22: *Corning® 96-well Black/Clear Round Bottom ULA Spheroid Microplate*.

Tendo em conta as vantagens e desvantagens de cada técnica, a cultura de sobreposição líquida foi a escolhida para estabelecer as culturas celulares 3D de CaP. Comparando as duas placas, concluiu-se que a *Corning*[®] era a que permitia produzir esferoides mais coesos, uniformes e reprodutíveis, pelo que se escolheu esta placa para a formação dos esferoides e realização das restantes experiências. Esta técnica foi ainda testada com a linha celular LNCaP, seguindo o mesmo protocolo estabelecido para a linha celular PC3. No entanto, não se observou a formação de esferoides, pelo que as experiências seguintes foram realizadas apenas em esferoides de células PC3.

3.2. Irradiação das culturas celulares de CaP com rádio-223

Com o objetivo de avaliar os efeitos biológicos do rádio-223 nas células de cancro da próstata (CaP) e no nicho metastático, procedeu-se à irradiação das culturas celulares em 2D e em 3D. Em ambas as culturas, o processo de irradiação consistiu na exposição das culturas celulares a uma gama crescente de atividades volúmicas (Bq/mL) de rádio-223, existindo sempre condições controlo não irradiadas (0 Bq/mL). As atividades volúmicas utilizadas e referidas ao longo deste projeto correspondem às atividades volúmicas iniciais. O radiofármaco foi cedido gentilmente pelo Serviço de Medicina Nuclear do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. A atividade inicial do rádio-223 foi medida numa câmara de ionização (Capintec CRC-25W), seguindo as medidas de radioproteção adequadas. Sempre que necessário, o rádio-223 foi diluído em soro fisiológico e, de seguida, tendo em conta a atividade volúmica pretendida e o volume dos poços, foram calculados os respetivos volumes de radiofármaco a adicionar a cada poço. Antes da adição do rádio-223, o mesmo volume de meio de cultura foi retirado dos poços para manter o volume igual. O protocolo de irradiação e a gestão dos resíduos foram realizados seguindo as normas de radioproteção adequadas ao tipo de radiação ionizante usada.

Relativamente às culturas 2D, as células PC3 foram expostas às atividades volúmicas de 55, 440, 880, 1 760, 3 520, 5 280 e 7 040 Bq/mL e as células LNCaP apenas foram expostas às atividades volúmicas de 55, 3 520 e 7 040 Bq/mL, devido à dificuldade em manter estas células em cultura. As placas foram irradiadas como está representado na Figura 23 e incubadas durante 4, 24 ou 48 horas, no caso das células PC3, e durante 24 horas, no caso das células LNCaP. O tempo de exposição de 24 horas, para a linha celular LNCaP, foi selecionado tendo em conta que a diminuição do conteúdo proteico das células PC3 foi mais acentuada após exposição durante 24 e 48 horas e ainda outros estudos encontrados na literatura que utilizaram este tempo. Após os tempos de exposição, também designados tempos de irradiação, o meio dos poços foi renovado e colocaram-se as placas na incubadora durante 5 ou 7 dias, para posterior realização do ensaio de sulforodamina B.

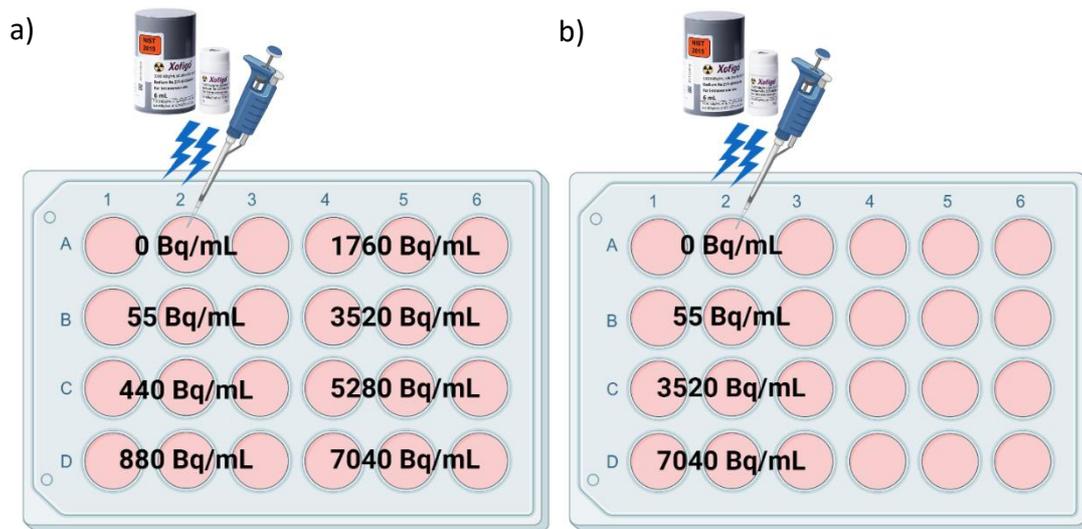


Figura 23: Esquema da irradiação das células a) PC3 e b) LNCaP, em placas de 24 poços, para a realização do ensaio de SRB. (Esquema criado no *BioRender*)

Para o ensaio clonogénico, as células PC3 semeadas em placas de 6 poços, com 3 mL de meio por poço, foram irradiadas com as atividades volúmicas de 55, 440, 880, 1 760, 5 280 e 7 040 Bq/mL e, depois, colocadas na incubadora durante 4 ou 24 horas. Passado o tempo de irradiação, o meio com atividade foi substituído por novo meio frio e as células foram incubadas durante 8 dias, com renovação do meio de cultura ao quinto dia.

Como mencionado no estabelecimento das culturas 3D, foram desenvolvidos esferoides de células PC3, inicialmente com 5 000 células, os quais foram mantidos em 200 µL de meio por poço, em placas ULA de 96 poços. As placas foram incubadas durante 48 horas para permitir a formação dos esferoides, seguindo-se a sua irradiação com a seguinte gama de atividades: 55, 440, 880, 1 760, 3 520, 5 280 e 7 040 Bq/mL. Após 24 horas de irradiação, o meio com atividade foi aspirado e adicionaram-se primeiro 100 µL de novo meio e, 3 dias depois, mais 100 µL para renovação do meio. Os esferoides foram mantidos em cultura durante 7 dias após irradiação, ao fim dos quais foram retirados da incubadora para a realização de ensaios e avaliação dos efeitos radiobiológicos do rádio-223. A Figura 24 esquematiza todo este processo, desde a formação dos esferoides à realização dos ensaios descritos nos tópicos seguintes.

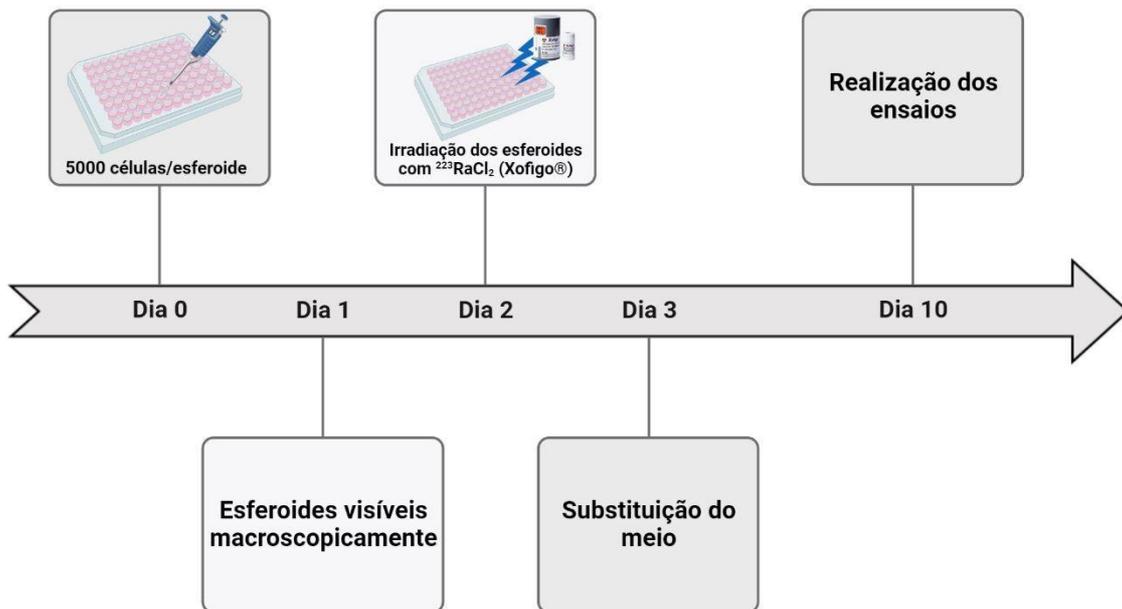


Figura 24: Linha temporal do estabelecimento e irradiação de culturas 3D de CaP. O dia 0 corresponde à colocação de 200 μ L de uma suspensão celular com 25 000 células/mL em cada poço de uma placa de 96 poços. No dia 1 foi possível visualizar os esferoides macroscopicamente. No dia 2 procedeu-se à sua irradiação com 7 atividades volúmicas de rádio-223. No dia 3 substituiu-se o meio e os esferoides foram mantidos numa incubadora a 37°C até ao dia 10, para a realização de ensaios e avaliação dos efeitos do rádio-223. (Esquema criado no *BioRender*)

3.3. Estudo dos efeitos radiobiológicos do rádio-223

3.3.3. Em culturas celulares 2D de CaP

3.3.3.1. Análise do conteúdo proteico celular através do ensaio de sulforodamina B

O ensaio de sulforodamina B foi desenvolvido em 1990 e continua a ser um dos métodos mais usados para avaliar a citotoxicidade de compostos em estudos *in vitro*. A sulforodamina B (SRB) é um corante rosa que se liga aos componentes proteicos das células em ambiente ácido, podendo depois dissociar-se e ser extraído em ambiente básico. A ligação do SRB aos aminoácidos é estequiométrica, pelo que a quantidade de corante extraído das células é diretamente proporcional ao conteúdo proteico celular e pode, posteriormente, ser extrapolado para medir indiretamente a proliferação celular (Orellana & Kasinski, 2016; Vichai & Kirtikara, 2006). Esta técnica possui uma elevada sensibilidade, eficácia, reprodutibilidade e baixo custo (Kuee *et al.*, 2017).

O ensaio de SRB foi executado para ambas as linhas celulares de cancro da próstata (CaP), PC3 e LNCaP. Foi preparada uma suspensão celular com a concentração de 60 000 células/mL e foram colocados 500 µL desta suspensão em cada poço (30 000 células/poço), em placas de 24 poços (SPL 30024). As placas foram colocadas na incubadora durante 24 horas, para garantir a aderência das células aos poços, e após este período foram irradiadas com rádio-223, de acordo com o protocolo descrito no tópico 3.2.

Ao fim de 5 ou 7 dias após irradiação, realizou-se o ensaio de SRB. Para tal, o meio foi descartado e os poços lavados com PBS gelado (4°C) com o intuito de parar a atividade metabólica. De seguida, fixaram-se as células adicionando 200 µL de ácido acético a 1% em metanol por poço, incubando as placas a 4°C durante 45 minutos. Após fixação, o ácido acético foi descartado e as placas foram deixadas à temperatura ambiente para secarem. Após secagem das placas, adicionaram-se 400 µL de SRB (0,05%) a cada poço, deixando as placas a corar por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, o SRB foi descartado e lavaram-se as placas várias vezes com água para remover o corante em excesso, ou seja, o que não se ligou às proteínas. Após nova secagem, adicionaram-se 400 µL de Tris-NaOH (10 mM, pH=10) e agitaram-se as placas até dissolução do corante. Por fim, foram lidas as absorvâncias num espectrofotómetro (Perkin Elmer Enspire 2300) no comprimento de onda de 540 nm, com um filtro de referência de 690 nm. Importa salientar que foram feitas pequenas alterações ao protocolo aquando da realização do ensaio de SRB com as células LNCaP, pois como estas células são semi-aderentes, é necessária maior sensibilidade na troca de soluções para evitar descolamento e perda de células, assim como um maior tempo de fixação (1 hora).

Após aquisição dos dados, o conteúdo proteico celular foi calculado usando a Equação 2 e foram traçados gráficos da percentagem de conteúdo proteico celular das células irradiadas, normalizada aos controlos.

$$\text{Conteúdo proteico celular (\%)} = \frac{(\text{Abs } 540 - \text{Abs } 690) \text{ Irradiadas}}{(\text{Abs } 540 - \text{Abs } 690) \text{ Controlo}} \times 100$$

Equação 2: Equação do cálculo do conteúdo proteico celular, com base nas absorvâncias medidas no espectrofotómetro.

3.3.3.2. Avaliação da sobrevivência celular através do ensaio clonogénico

O ensaio clonogénico é um ensaio *in vitro* que permite avaliar a sobrevivência celular, tendo em conta a capacidade de células individuais se reproduzirem e formarem colónias, ou seja, aglomerados de, pelo menos, 50 células. Este ensaio foi inicialmente desenvolvido para estudar os efeitos da radiação na sobrevivência e no crescimento de células cancerígenas, tendo vindo a desempenhar um papel essencial na radiobiologia (Bleloch, 2020). Hoje em dia, é considerada

a técnica mais adequada na avaliação da radiosensibilidade de diferentes linhas celulares e é usada com o objetivo de analisar as diferenças na capacidade reprodutiva entre células controle, ou seja, não tratadas e células que foram sujeitas a algum tipo de tratamento, não só a exposição a radiação ionizante, mas também a compostos químicos e manipulação genética (Munshi *et al.*, 2005; Rafehi *et al.*, 2011).

Deste modo, recorreu-se ao ensaio clonogénico para estudar os efeitos do Rádio-223 em células de CaP, mais especificamente na linha celular PC3. Para começar, foi preparada uma suspensão celular com a concentração de 100 000 células/mL, da qual se retirou o volume correspondente ao número de células que se pretendia colocar em cada poço. As células foram semeadas em placas de 6 poços aderentes (Corning Costar 3516), de acordo com a Tabela 2, juntamente com 3 mL de meio de cultura por poço. Os valores apresentados na Tabela 2 resultaram da otimização do número de células a semear em cada poço, tendo em conta a atividade administrada e o tempo de irradiação. Tal como para o ensaio de SRB, as placas foram colocadas na incubadora durante 24 horas e, após este período, foram irradiadas com rádio-223, de acordo com o protocolo descrito no tópico 3.2.

Tabela 2: Número de células semeadas por poço para o ensaio clonogénico, com base na atividade e no tempo de irradiação.

Tempo de irradiação	Atividade (Bq/mL)						
	0	55	440	880	1 760	5 280	7 040
4 horas	1 000	1 500	1 500	1 500	1 500	1 500	1 500
24 horas	1 000	1 500	1 500	1 500	1 500	2 000	2 000

Ao fim de 8 dias após irradiação, as placas foram retiradas da incubadora para a coloração das colónias formadas. Para tal, foi removido o meio de cultura e lavaram-se os poços com cerca de 4 mL de PBS por poço. Seguiu-se a fixação das colónias com adição de 4 mL de metanol a cada poço, deixando atuar durante 20 minutos. Descartou-se o metanol e as placas foram deixadas a secar à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionaram-se 4 mL de uma solução de violeta de cristal a 0,5% em metanol e as colónias foram deixadas a corar durante 10 minutos. Por fim, retirou-se o corante em excesso e lavaram-se as placas, mergulhando-as em água. Depois das placas secarem, foi possível contar o número de colónias e determinar a eficiência das placas (EP) e o fator de sobrevivência celular (FS), com base na Equação 3 e na Equação 4, respetivamente (Bleloch, 2020). Por último, foram traçados gráficos do FS em função da atividade volúmica.

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

Equação 3: Cálculo da eficiência da placa.

$$\text{Fator de sobrevivência} = \frac{EP \text{ das células irradiadas}}{EP \text{ das células controle}}$$

Equação 4: Cálculo do fator de sobrevivência celular.

3.3.4. Em culturas celulares 3D de CaP

3.3.4.1. Avaliação da estrutura dos esferoides

O crescimento e o desenvolvimento dos esferoides, após irradiação com rádio-223, foram monitorizados a partir do dia 1 até ao dia 10, usando o *software Motic Images Plus 2.0 ML* que está associado ao microscópio ótico invertido (Motic AE31) com uma câmara acoplada, através do qual foram obtidas imagens dos esferoides, com uma ampliação de 40×. Posteriormente, as imagens foram analisadas no *software ImageJ* (Rasband, W.S., U. S. National Institutes of Health), onde foi medida a área e o perímetro dos esferoides, tal como se encontra esquematizado na Figura 25.

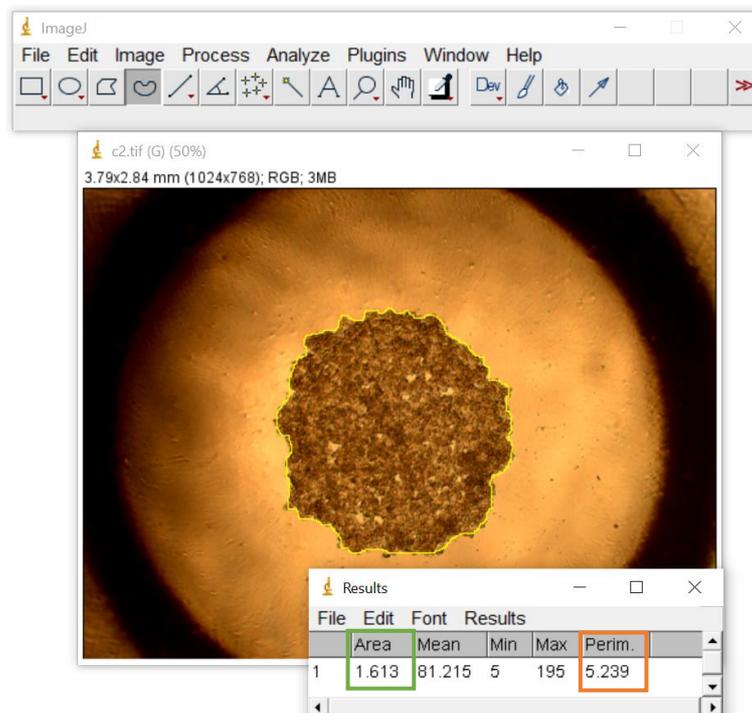


Figura 25: Exemplo de delimitação de um esferoide (amarelo) no programa *ImageJ* e medição da respetiva área (verde) e perímetro (laranja), em mm.

Foi também determinada a circularidade dos esferoides, que consiste numa medida da sua simetria, a partir da distância entre o centro do esferoide e qualquer ponto na sua superfície, recorrendo à Equação 5.

$$Circularidade = \frac{4\pi \times \acute{A}rea}{Per\acute{ı}metro^2}$$

Equação 5: Cálculo da circularidade dos esferoides. A área e o perímetro foram medidos com o *software ImageJ* (C. Pinto *et al.*, 2020).

Além do *software ImageJ*, recorreu-se também ao *software AnaSP*, um programa muito recente desenvolvido especificamente para análise de imagens de esferoides e extração automática de parâmetros que permitem caracterizá-los. Cada imagem deve conter apenas um esferoide e este deve estar bem contrastado e focado (Piccinini, 2015). Primeiro, as imagens dos esferoides foram segmentadas, o que consistiu na sua conversão em níveis de cinzento e estabelecimento de um *threshold*. Quando a segmentação automática falhou, realizou-se a segmentação manual dos esferoides, semelhante ao que está exemplificado na Figura 25. Da segmentação resultaram imagens binárias, ou seja, com apenas duas cores (preto e branco). A partir das imagens binárias foi possível extrair os seguintes parâmetros: área, circularidade, compacidade, diâmetro equivalente, perímetro e esfericidade. A compacidade está relacionada com o grau de compactação dos esferoides. O diâmetro equivalente corresponde ao diâmetro do círculo com a mesma área da secção transversal do esferoide que foi analisada. A esfericidade é calculada com base na equação proposta por (Kelm *et al.*, 2003). A Figura 26 representa um fluxograma com as etapas deste processo.

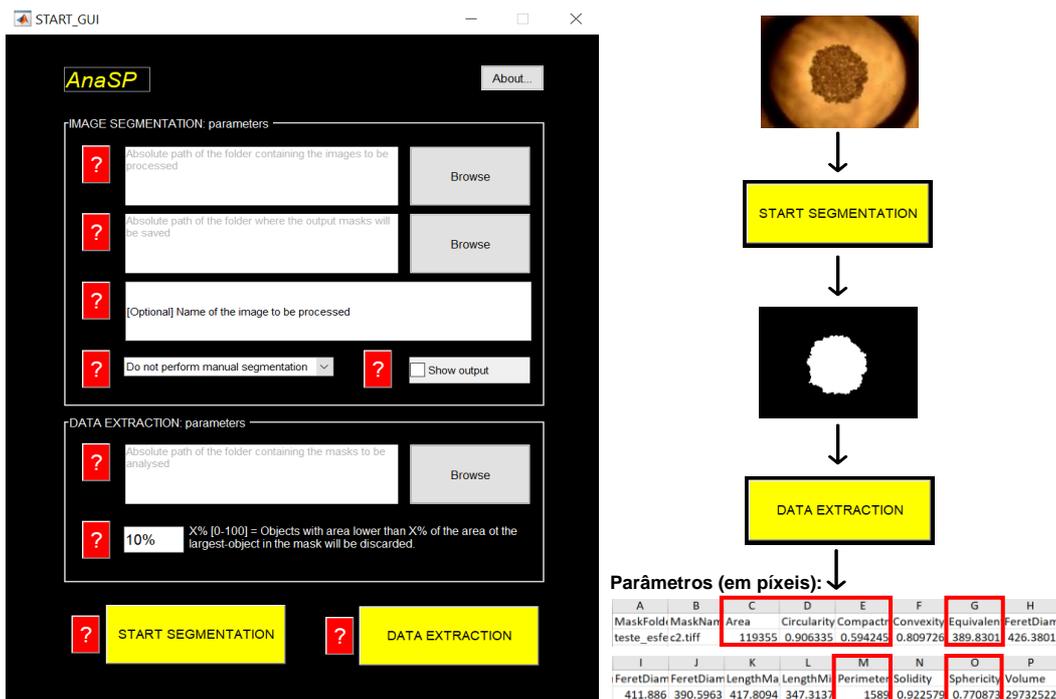


Figura 26: Interface e fluxograma do *software AnaSP*. Foram retirados os parâmetros rodeados a vermelho.

3.3.4.2. Análise da viabilidade celular através do ensaio de viabilidade *CellTiter-Glo*[®] 3D

O ensaio de viabilidade *CellTiter-Glo*[®] 3D é usado para determinar indiretamente o número de células viáveis em culturas celulares 3D, permitindo avaliar os danos citotóxicos induzidos por tratamentos químicos ou físicos, tais como a exposição à radiação ionizante. Este ensaio baseia-se na quantidade de ATP presente na cultura 3D, visto que o ATP é um marcador da presença de células metabolicamente ativas (Promega, 2015; Zanoni *et al.*, 2016). A reação de bioluminescência subjacente a este ensaio encontra-se representada na Figura 27. De acordo com estudos anteriores, o sinal de luminescência gerado é proporcional à quantidade de ATP e esta, por sua vez, é diretamente proporcional à viabilidade celular da cultura 3D (Crouch *et al.*, 1993).

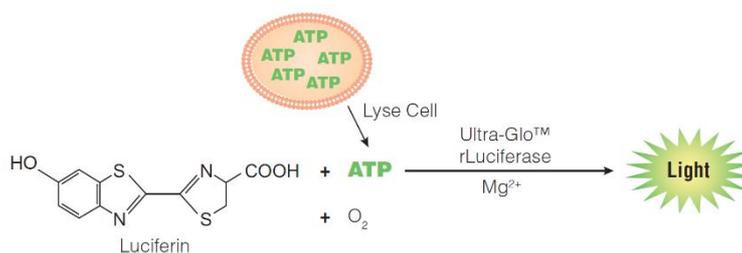


Figura 27: Princípio do ensaio *CellTiter-Glo*[®] 3D. Retirado de (Promega, 2015)

As principais vantagens desta técnica são a rapidez na aquisição dos dados, a elevada sensibilidade, a flexibilidade, pois pode ser aplicada em diferentes tipos de placas, e a estabilidade do sinal de luminescência, que tem um tempo de meia vida superior a 3 horas, o que permite o processamento consecutivo de múltiplas placas (Promega, 2015). Além destas vantagens, este ensaio apresenta uma boa performance em experiências com esferoides, sendo o método mais adequado e reprodutível para determinar a viabilidade de esferoides de grande tamanho, comparativamente a ensaios como o Alamar Blue, o XTT, o SRB, o método de exclusão de azul tripano, o ensaio *Perfecta3D*, entre outros (Zanoni *et al.*, 2016).

Deste modo, recorreu-se ao ensaio de viabilidade *CellTiter-Glo*[®] 3D para avaliar os efeitos do rádio-223 na viabilidade dos esferoides de CaP. Para tal, começou-se por retirar 100 µL do meio de cultura de cada poço da placa ULA de 96 poços e adicionaram-se, em seguida, 40 µL do reagente *CellTiter-Glo*[®] 3D (Promega G9681) a cada poço, ressuspendendo várias vezes. Este passo é muito importante pois garante a extração eficaz do ATP das células constituintes dos esferoides e a ocorrência da reação esquematizada na Figura 27. De seguida, a placa foi incubada à temperatura ambiente e protegida da luz durante 25 minutos, com o intuito de estabilizar o sinal de luminescência. Ao fim dos 25 minutos, foram transferidos 100 µL de cada

poço para uma placa branca de 96 poços (Thermo Scientific 136101) e foi lida a luminescência num espectrofotómetro (Perkin Elmer Enspire 2300).

3.3.4.3. Análise dos esferoides de CaP através de microscopia confocal

A principal vantagem da microscopia confocal é a capacidade de obter imagens de alta-resolução dos vários planos de uma amostra e posteriormente realizar a sua reconstrução 3D (Elliott, 2020). Para auxiliar a reconstrução 3D, são, por vezes, utilizados marcadores fluorescentes que marcam certas estruturas das células. Um dos marcadores utilizado foi o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), um marcador que emite fluorescência azul e tem grande afinidade pelo ADN, ligando-se preferencialmente a regiões ricas em adenina-timina (Chazotte, 2011). Assim, através da marcação com DAPI, marcaram-se os núcleos das células de modo a obter imagens dos esferoides de CaP, o que levou a uma melhor perceção do seu tamanho, estrutura e organização interna. Foi também analisada a viabilidade e as vias de morte celular ao longo da estrutura dos esferoides, usando a marcação dupla com anexina V (AnV) e iodeto de propídio (IP). A AnV é uma proteína com grande afinidade pelo fosfolípido aniónico fosfatidilserina que, em células saudáveis, se encontra no folheto interno da membrana plasmática. No entanto, em caso de apoptose, a membrana plasmática sofre mudanças estruturais que expõem a fosfatidilserina ao meio extracelular, pelo que a marcação com AnV permite a identificação de células apoptóticas. Por outro lado, as células necróticas podem ser distinguidas através da marcação com IP, pois este é capaz de se ligar ao ADN, mas não consegue atravessar a membrana plasmática, logo, apenas marca as células quando ocorre rutura da membrana, que é um sinal de necrose. Em síntese, a dupla marcação permite classificar as células em quatro populações, nomeadamente em células viáveis, células em apoptose, células em necrose e células em apoptose tardia/necrose (Crowley *et al.*, 2016).

Na marcação com DAPI, começou-se por aspirar o meio dos poços e realizou-se uma lavagem dos esferoides com PBS, cuidadosamente para não os desintegrar. De seguida, adicionaram-se 10 µL da solução de DAPI (Invitrogen D1306) diluída em PBS (1:5000) e incubou-se a placa, protegida da luz, durante 30 minutos. Por fim, aspirou-se o DAPI e acrescentaram-se 200 µL de meio a cada poço. Na marcação dupla com AnV/IP, após aspirar o meio dos poços, adicionaram-se 100 µL de tampão de ligação (Immunostep BB10X), 1 µL da solução de AnV (Immunostep ANXVF-200T) e 0,5 µL da solução de IP (KIT Immunotech) a cada poço, deixando a incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Passado este tempo, o conteúdo dos poços foi aspirado e acrescentaram-se 200 µL de meio a cada poço. Como as paredes da placa de 96 poços eram pretas e opacas, foi possível observar os esferoides diretamente na placa sem a necessidade de os transferir para outro suporte, evitando a sua desintegração. As imagens foram adquiridas num microscópio confocal de varrimento a laser (LSM 710 Axio Observer Z1 microscope, Carl Zeiss), usando as objetivas de ampliação EC Plan-Neofluar 10×/0.3 e Plan-Apochromat 20×/0.8 e tendo o cuidado de selecionar os lasers

correspondentes às sondas que se pretendia visualizar. As imagens dos vários planos dos esferoides, designadas *Z-stacks*, foram obtidas com intervalos de 203 μm , na marcação com DAPI, e de 310 μm , na marcação com AnV/IP. Como alguns dos esferoides tinham um tamanho superior à janela do microscópio, foi ainda necessário recorrer ao *tile scanning*, que consiste na aquisição das imagens “bloco a bloco”, de modo a obter uma imagem do esferoide completo. No final, procedeu-se à reconstrução 3D dos esferoides de CaP no programa *Zen 3.6 Blue Edition* (ZEISS Microscopy), cuja interface está representada na Figura 28.

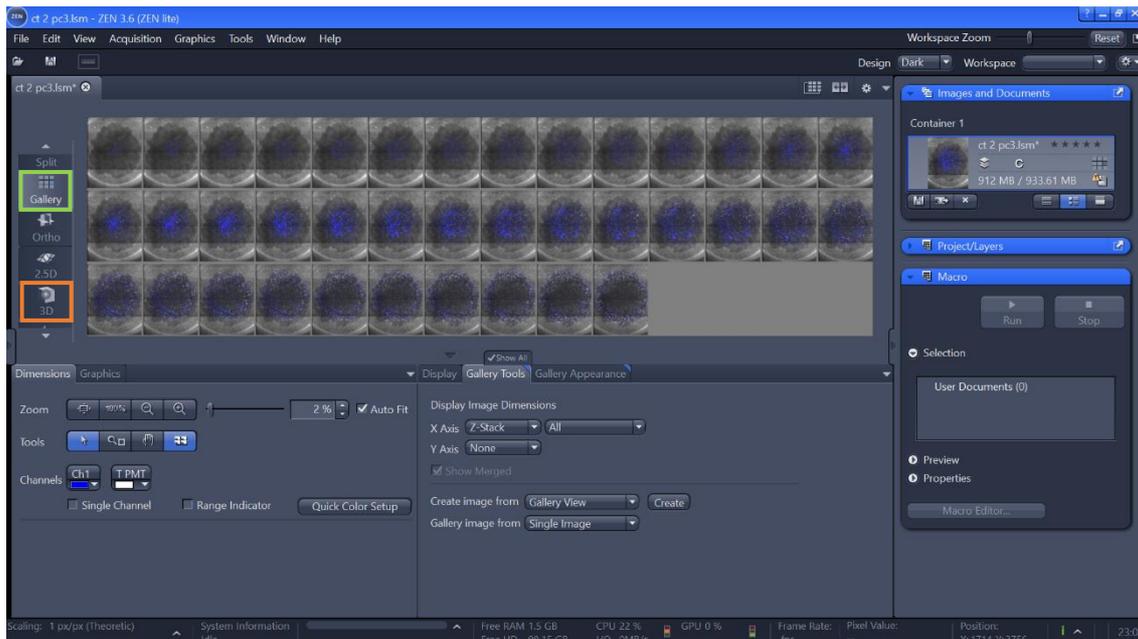


Figura 28: Interface do programa *Zen 3.6 Blue Edition*, com o exemplo de um dos esferoides obtidos e que foi marcado com DAPI (marcação azul). As imagens da galeria (verde) correspondem a vários planos do esferoide, a partir dos quais é possível obter a reconstrução 3D (laranja).

3.3.4.4. Estudo da morfologia celular através do método de coloração *Giemsa*

A análise da morfologia das células constituintes dos esferoides de CaP foi conduzida para avaliar características representativas dos tipos de morte celular por apoptose ou por necrose que podiam ter sido induzidos pela irradiação com rádio-223. Para tal, utilizou-se a coloração de *Giemsa*, um corante azul do tipo *Romanowsky*. Este tipo de corante é composto por um corante básico e um corante ácido, que vão corar as estruturas ácidas e básicas das células, respetivamente, garantindo que todos os componentes celulares ficam corados. Esta técnica é amplamente utilizada em laboratório, por exemplo, na coloração de esfregaços hematológicos, amostras de medula óssea e secções de tecido, mas com aplicabilidade, também, em linhas celulares (Barcia, 2007; Piaton *et al.*, 2016).

Em primeiro lugar, 3 esferoides de cada condição testada foram dissociados e agrupados no mesmo tubo de centrifugação, tendo sido depois centrifugados a 1 300 ×G, durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e cada *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de PBS e novamente centrifugado a 1 300 ×G, durante 5 minutos. O sobrenadante foi uma vez mais descartado e cada *pellet* ressuspensionado em 10 µL de FBS. Em seguida, foi colocada uma gota de cada suspensão celular numa lâmina de vidro (Normax 1.5470117C) e procedeu-se à realização de um esfregaço. As lâminas foram deixadas a secar durante aproximadamente 30 minutos, à temperatura ambiente. Após secagem, as células foram fixadas em metanol, durante 5 minutos e, depois das lâminas estarem completamente secas, foram cobertas por uma solução de *Giemsa* (Merck 9204) diluída a 5% em PBS. Passados 15 minutos, as lâminas foram lavadas com água, para retirar o excesso de corante e ficaram a secar à temperatura ambiente. Por fim, para observar as lâminas, utilizou-se o microscópio vertical *ECLIPSE Ni* (Nikon) com uma ampliação de 500×.

3.4. Análise estatística

Os resultados obtidos foram processados no software *GraphPad Prism* (versão 9.2.0 para *Windows*, GraphPad Software), de modo a obter os gráficos que serão apresentados no capítulo seguinte. Os resultados foram todos apresentados como a média±erro-padrão. A análise estatística foi também realizada no mesmo software. Em primeiro lugar verificou-se se a distribuição dos dados era normal, através do teste de normalidade Shapiro-Wilk. No caso de os dados seguirem uma distribuição normal, foram utilizados testes paramétricos, enquanto para os dados que não seguiam uma distribuição normal, foram utilizados testes não paramétricos. O teste ANOVA de 2 fatores, juntamente com o teste de *Tukey* para as comparações múltiplas, foi usado no ensaio de SRB para comparar entre os diferentes tempos de irradiação e entre as atividades volúmicas, tanto para a linha celular PC3 como para a LNCaP, considerando a presença de 2 variáveis independentes. No ensaio clonogénico, recorreu-se ao teste ANOVA de 1 fator e ao teste de *Holm-Sidak* para as comparações múltiplas entre as diferentes atividades e, para comparar entre os 2 tempos de irradiação, foi usado o teste ANOVA de 2 fatores com o teste de *Sidak* para as comparações múltiplas. Na análise da estrutura dos esferoides após irradiação, foi utilizado o teste ANOVA de 2 fatores e os testes de *Dunnnett* e de *Tukey* para as comparações múltiplas. Por fim, para a análise dos dados obtidos no ensaio *CellTiterGlo-3D*[®], aplicou-se o teste ANOVA de 1 fator em conjunto com o teste de *Tukey* para as comparações múltiplas entre as atividades. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas sempre que valor-p<0,05.

4. Resultados¹

¹Os resultados descritos ao longo deste capítulo foram obtidos em coautoria com a Mestre Inês Alexandra Marques.

4.1. Estabelecimento de culturas celulares 3D de CaP

Um dos passos cruciais deste trabalho foi o desenvolvimento de um modelo celular 3D de cancro da próstata (CaP). A primeira abordagem consistiu em estabelecer esferoides através da técnica *hanging drop*, testando várias concentrações iniciais de células PC3 por esferoide. A cultura de esferoides foi monitorizada macroscópica e microscopicamente ao longo do tempo. De um modo geral, verificou-se a formação de esferoides com todas as concentrações de células, sendo os esferoides formados com 5 000 e 10 000 células/esferoide os mais uniformes e com volume menor. Contudo, a incubação durante 24 horas não foi suficiente para que os esferoides de 2 500 e de 5 000 células se formassem e ficassem coesos, verificando-se a desintegração dos mesmos após a adição de 500 μ L de meio de cultura, pelo que houve a necessidade de incubação durante 48 horas até à adição do meio de cultura. Apesar de os esferoides se manterem em cultura após a adição do meio, os mesmos não eram resistentes a manipulações da cultura, necessárias ao longo do tempo. Assim, foram testadas outras 3 metodologias para otimizar o processo de formação dos esferoides, com a linha celular PC3.

A cultura de esferoides, constituídos inicialmente por 10 000 células, através do modelo de levitação magnética foi monitorizada ao microscópio depois de 24 horas e de 48 horas do início do protocolo de cultura previamente descrito. Verificou-se que as células semeadas não se agregaram em estruturas 3D, optando por juntar as técnicas de *hanging drop* e de levitação magnética, uma abordagem desenvolvida previamente pelo nosso grupo. Através desta nova metodologia, foi possível obter esferoides, a partir de 10 000 células, visíveis macroscopicamente 24 horas depois da formação das gotas, como se encontra apresentado na Figura 29.

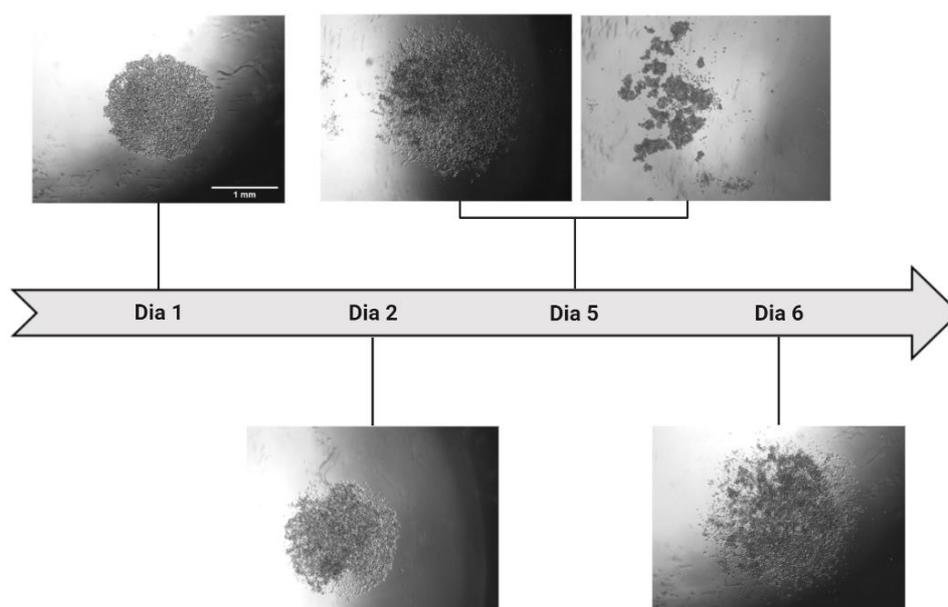


Figura 29: Esquema e imagens representativas da evolução dos esferoides produzidos através da junção das técnicas de *hanging drop* e de levitação magnética, ao longo de 6 dias, com uma concentração inicial de 10 000 células/esferoide. O dia 1 corresponde a 24 horas depois da adição do meio aos poços. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio invertido com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 1 mm.

Observou-se que a maioria dos esferoides estava localizada na periferia dos poços, o que acaba por ser uma desvantagem pois poderia influenciar o seu crescimento e o processo de irradiação a realizar. Além disso, apesar de se terem formado esferoides aparentemente coesos, verificou-se a sua progressiva desintegração a partir do segundo dia e a formação de outros agregados celulares irregulares, como está visível na imagem do quinto dia da Figura 29. Estes resultados demonstraram que esta metodologia também não seria a mais apropriada para a produção de esferoides uniformes, reproduzíveis e capazes de serem mantidos em cultura durante, pelo menos, uma semana.

O último método de formação de esferoides testado foi a cultura de sobreposição líquida, usando a concentração inicial de 5 000 células/esferoide, através da utilização das placas *BIOFLOAT™ 96-well plate* e das *Corning® 96-well Black/Clear Round Bottom Ultra-Low Attachment (ULA) Spheroid Microplate*. A evolução dos esferoides nas duas placas, ao longo de 10 dias, encontra-se representada na Figura 30 e na Figura 31, respetivamente.

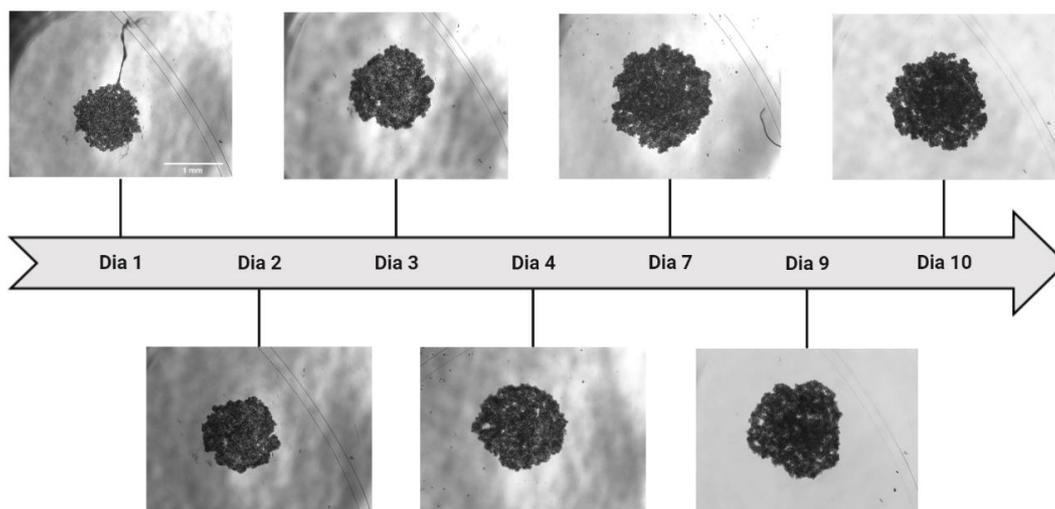


Figura 30: Esquema e imagens representativas da evolução de esferoides de 5000 células PC3 produzidos na placa ULA da *BIOFLOAT™*, ao longo de 10 dias. O dia 1 corresponde a 24 horas depois de semear as células nos poços. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio invertido com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 1 mm.

Em ambas as placas, houve uma rápida formação dos esferoides, visíveis macroscopicamente 24 horas depois de semear as células nos poços. No geral, a forma dos esferoides permaneceu aproximadamente constante e circular, com um aumento do tamanho nos primeiros dias, estabilizando a partir do dia 6. As imagens apresentadas demonstram que os esferoides não se desintegraram com o passar do tempo, constatando-se que a cultura de sobreposição líquida é um método prático que permite produzir esferoides uniformes e mantê-los em cultura durante o tempo necessário para a realização dos ensaios de avaliação de efeitos a longo prazo. Além disso, ao contrário da junção das técnicas de *hanging drop* e de levitação magnética, não se verificou a formação de outros agregados celulares irregulares.

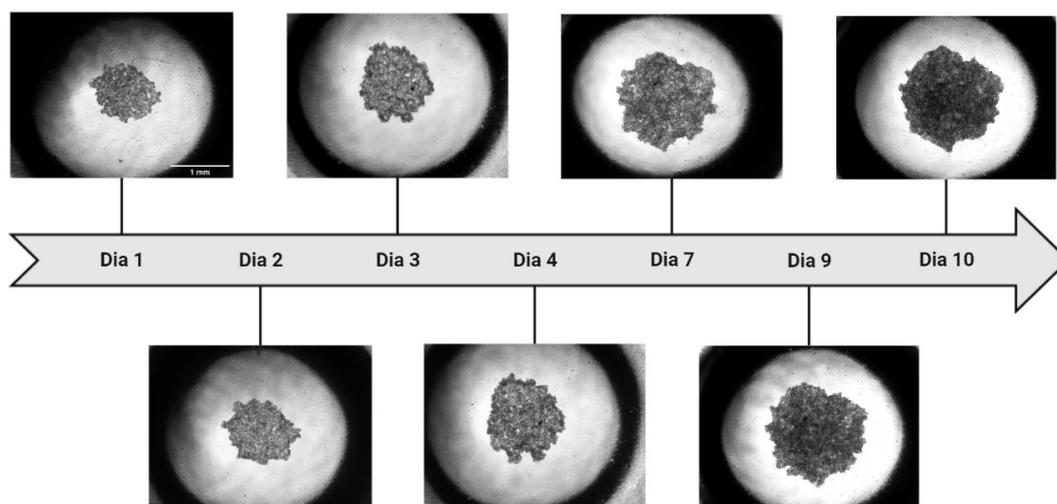


Figura 31: Esquema e imagens representativas da evolução de esferoides de 5000 células PC3 produzidos na placa ULA da *Corning*[®], ao longo de 10 dias. O dia 1 corresponde a 24 horas depois de semear as células nos poços. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio invertido com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 1 mm.

Porém, comparando a estrutura dos vários esferoides produzidos nos dois tipos de placas, estes apresentaram diferenças entre eles. Os esferoides produzidos na placa ULA da *Corning*[®] permaneceram mais coesos, compactos e uniformes, ao longo dos 10 dias. Na renovação do meio, foi mais difícil aspirar o meio dos poços na placa *BIOFLOAT*[™], tendo-se aspirado algumas vezes também o esferoide, o que condicionou a continuação das experiências. A placa ULA da *Corning*[®] possui ainda a vantagem de as paredes dos poços serem pretas opacas, não sendo necessária a transferência dos esferoides para outro suporte para a realização de ensaios de fluorescência, como a microscopia confocal, entre outros, que constitui um passo favorecedor da desagregação. Tendo em conta todos estes aspetos, decidiu-se escolher a cultura de sobreposição líquida, em placas ULA da *Corning*[®], para o estabelecimento das culturas celulares 3D de CaP.

Recorreu-se também à microscopia confocal para analisar e visualizar, com maior detalhe, a estrutura interna e externa dos esferoides de PC3, através da marcação com DAPI, o qual se liga ao ADN das células e adquire uma coloração azul. As imagens obtidas encontram-se na Figura 32, as quais evidenciam a forma esferoidal e circular dos esferoides. A marcação com DAPI permitiu também assegurar a possibilidade de visualizar os esferoides no microscópio confocal, fulcral para avaliar, posteriormente, os efeitos do rádio-223 na viabilidade e na morte celular dos esferoides.

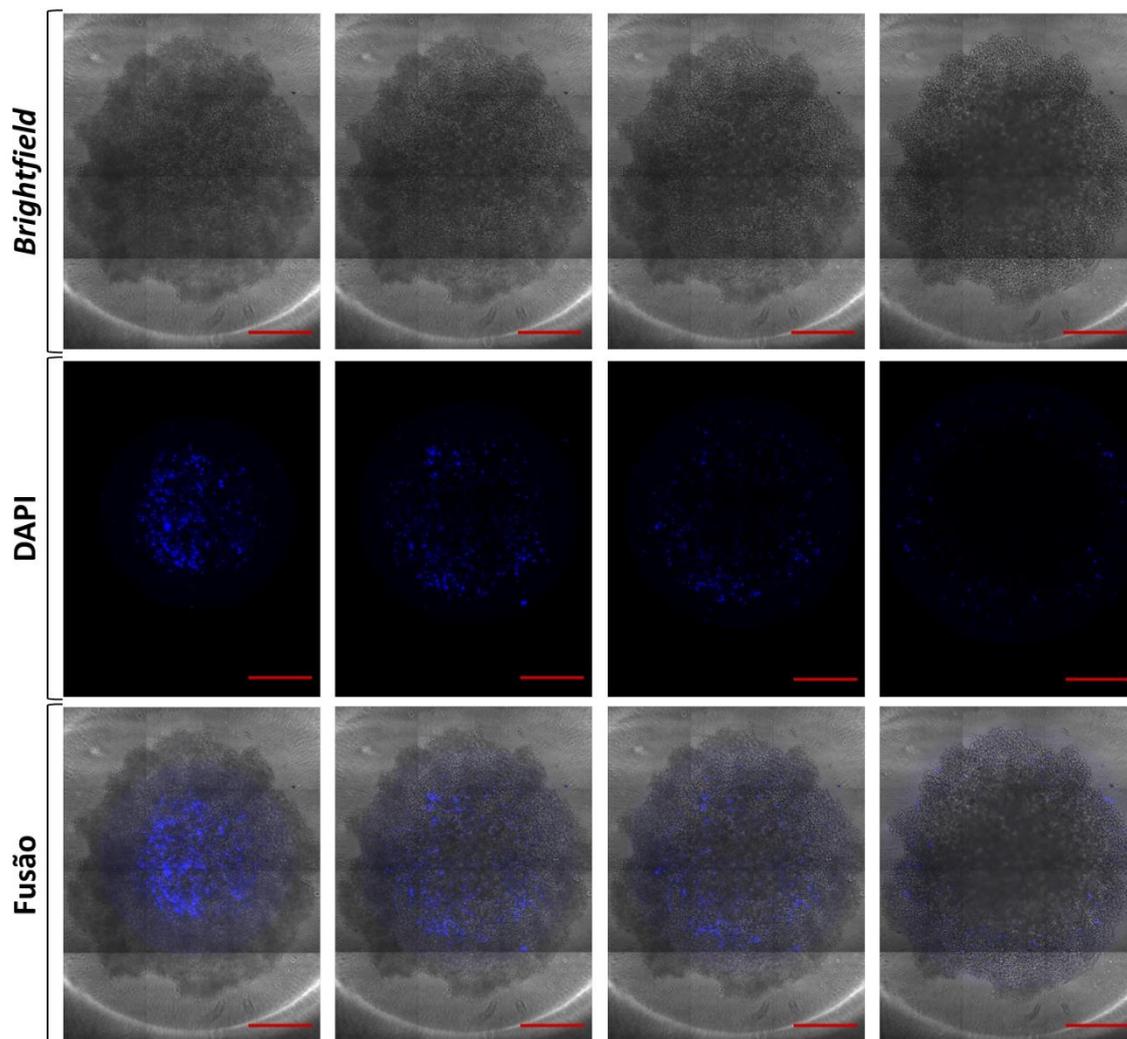


Figura 32: Imagens de vários planos de um esferoide de células PC3, mantido em cultura durante 10 dias e depois marcado com DAPI. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio confocal com uma ampliação de 200X. A escala apresentada nas imagens corresponde a 500 μm .

De seguida, esta técnica de cultura 3D foi também utilizada para desenvolver esferoides da linha celular LNCaP, cujos resultados se encontram representados na Figura 33. Esta linha celular exibiu um comportamento muito distinto da linha celular PC3. No primeiro dia, ou seja, 24 horas depois de se terem semeado as células nos poços, as células LNCaP ainda se encontravam dispersas, observando-se apenas pequenos agregados no centro. Nos dois dias seguintes, as células não se aglomeraram para formar os esferoides, antes continuaram dispersas em pequenos agregados. Como não foi possível desenvolver modelos celulares 3D de células LNCaP, os ensaios de radiobiologia apenas foram realizados com a linha celular PC3.

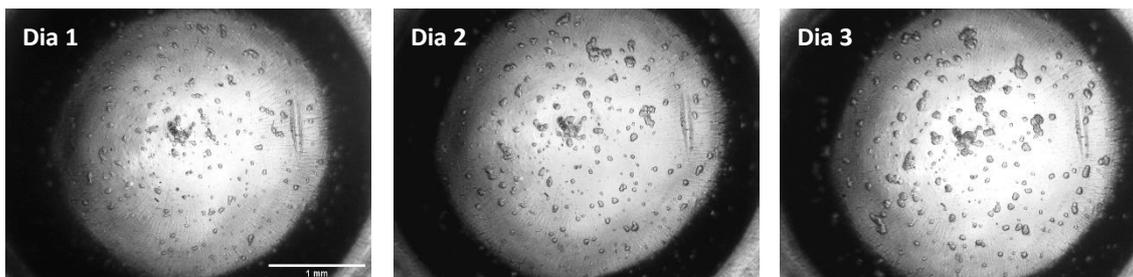


Figura 33: Esquema e imagens representativas da evolução de esferoides de 5 000 células LNCaP produzidos na placa *Corning*[®], ao longo de 3 dias. O dia 1 corresponde a 24 horas depois de semear as células nos poços. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio invertido com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 1 mm.

4.2. Estudo dos efeitos radiobiológicos do rádio-223

4.2.1. Em culturas celulares 2D de CaP

A realização de estudos de radiobiologia permitiu avaliar o efeito da exposição ao rádio-223 na proliferação e na sobrevivência de culturas celulares de cancro da próstata, nomeadamente em células PC3 e LNCaP. Estes estudos foram realizados, em primeiro, em cultura 2D, para posterior comparação com os efeitos observados quando avaliados em estruturas 3D, mais semelhantes à estrutura *in vivo*.

4.2.1.1. Conteúdo proteico celular

O efeito do rádio-223 no conteúdo proteico celular foi avaliado com recurso ao ensaio de SRB. Para este ensaio, as células PC3 foram expostas a várias atividades volúmicas iniciais do radiofármaco, em específico de 0, de 55, de 440, de 880, de 1 760, de 3 520, de 5 280 ou de 7 040 Bq/mL, durante três tempos de exposição, 4, 24 ou 48 horas, também designados por tempos de irradiação. O ensaio de SRB foi realizado ao fim de 5 ou de 7 dias e os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 34 e na Figura 35.

A Figura 34 apresenta os resultados do conteúdo proteico de células PC3, 5 ou 7 dias após exposição ao radiofármaco rádio-223 durante 4 h (a), 24 h (b) ou 48 h (c). Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que, de um modo geral, a exposição das células ao rádio-223 induziu uma diminuição do conteúdo proteico celular dependente do aumento da atividade adicionada ao meio, sendo esta diminuição estatisticamente significativa a partir dos 3 520 Bq/mL até aos 7 040 Bq/mL, para os três tempos de exposição. Contudo, verificou-se que 7 dias após exposição durante 4 horas, apenas houve uma diminuição significativa do conteúdo proteico a partir dos 5 280 Bq/mL.

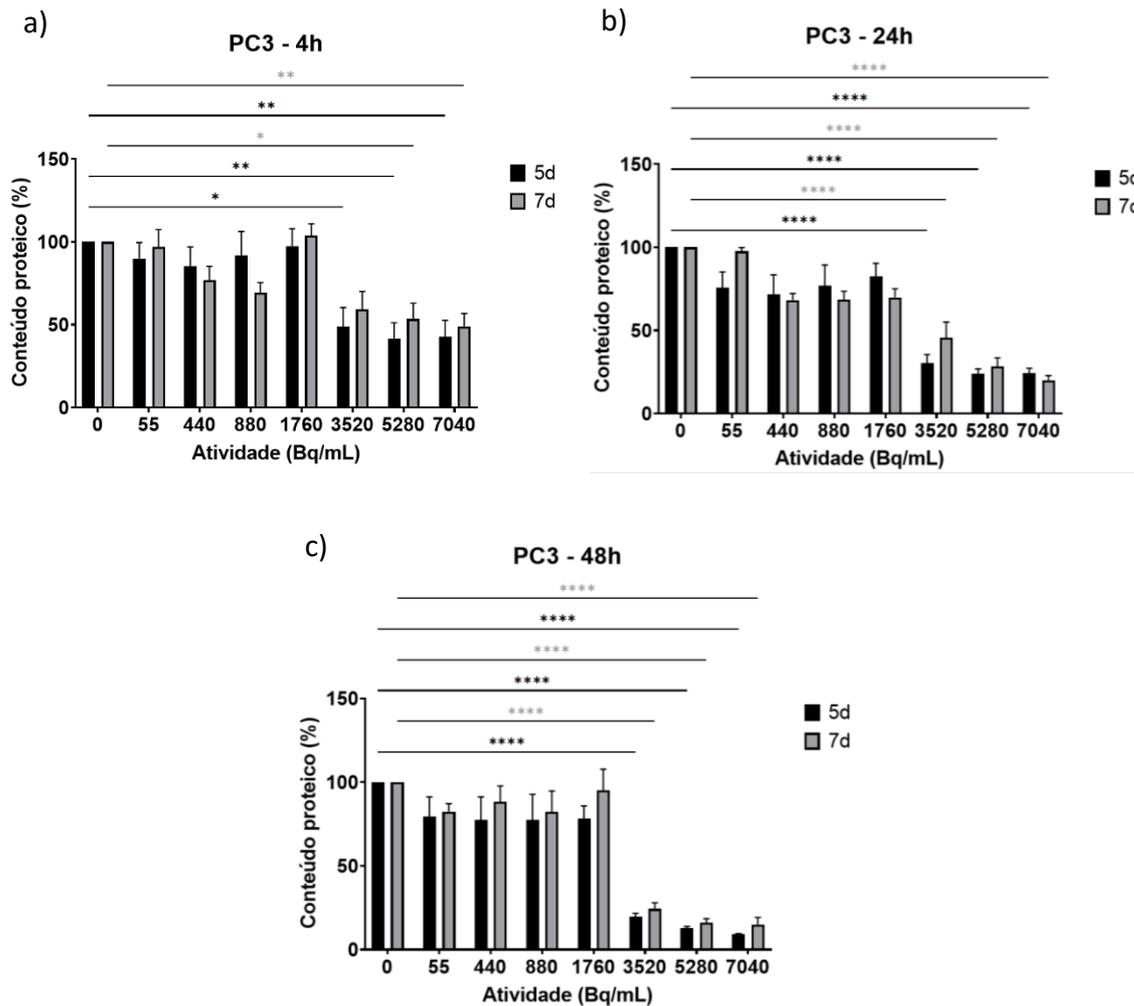


Figura 34: Análise do conteúdo proteico celular das células PC3 através do ensaio de SRB, realizado 5 ou 7 dias após irradiação com atividades iniciais entre 0 e 7 040 Bq/mL. Os resultados estão agrupados pelos tempos de exposição ao rádio-223 de 4 (a), 24 (b) ou 48 (c) horas. Os resultados foram normalizados ao controlo não irradiado e são apresentados como a média±erro padrão da percentagem de conteúdo proteico de, pelo menos, 5 experiências independentes realizadas em triplicado. ANOVA de dois fatores e teste de *Tukey* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$).

Verificou-se que 5 dias após a irradiação das células PC3 com 3 520, com 5 280 e com 7 040 Bq/mL, durante 4 horas, ocorreu diminuição significativa do conteúdo proteico para $48,7 \pm 11,7\%$ ($p = 0,0219$), para $41,5 \pm 9,7\%$ ($p = 0,0034$) e para $42,9 \pm 9,8\%$ ($p = 0,0049$), respetivamente. A irradiação com as mesmas três atividades, durante 24 horas, levou a uma diminuição significativa do conteúdo proteico para $30,4 \pm 5,2\%$ ($p < 0,0001$), para $24,0 \pm 2,9\%$ ($p < 0,0001$) e para $24,2 \pm 2,9\%$ ($p < 0,0001$), respetivamente, e durante 48 horas para $19,6 \pm 2,2\%$ ($p < 0,0001$), para $12,8 \pm 1,1\%$ ($p < 0,0001$) e para $9,2 \pm 0,4\%$ ($p < 0,0001$), respetivamente. Quando analisado 7 dias após irradiação, verificou-se que a exposição a atividades de 3 520, de 5 280 e de 7 040 Bq/mL, durante 24 horas, diminuiu significativamente o conteúdo proteico para $56,8 \pm 9,6\%$ ($p < 0,0001$), para $40,6 \pm 7,8\%$ ($p < 0,0001$) e para $35,3 \pm 9,0\%$ ($p < 0,0001$), respetivamente, e durante 48 horas para $24,4 \pm 3,6\%$ ($p < 0,0001$), para $16,0 \pm 2,5\%$ ($p < 0,0001$) e para $15,1 \pm 4,2\%$ ($p < 0,0001$),

respetivamente. A irradiação com 5 280 e com 7 040 Bq/mL, durante 4 horas, levou a um decréscimo do conteúdo proteico para $53,5 \pm 9,6\%$ ($p=0,0121$) e para $49,0 \pm 7,8\%$ ($p=0,0031$), respetivamente. Comparando os efeitos observados no conteúdo proteico das células PC3 expostas ao rádio-223 durante os três diferentes tempos, concluiu-se que houve uma diminuição mais acentuada quando irradiadas durante 24 e 48 horas. Além disso, verificou-se que os efeitos observados a nível do conteúdo proteico das células PC3, quando avaliado após 5 ou 7 dias, eram semelhantes, sem diferenças estatisticamente significativas, independentemente do tempo de irradiação.

A Figura 35 mostra a comparação entre os efeitos dos diferentes tempos de exposição ao rádio-223, avaliados 5 (a) ou 7 (b) dias após a irradiação.

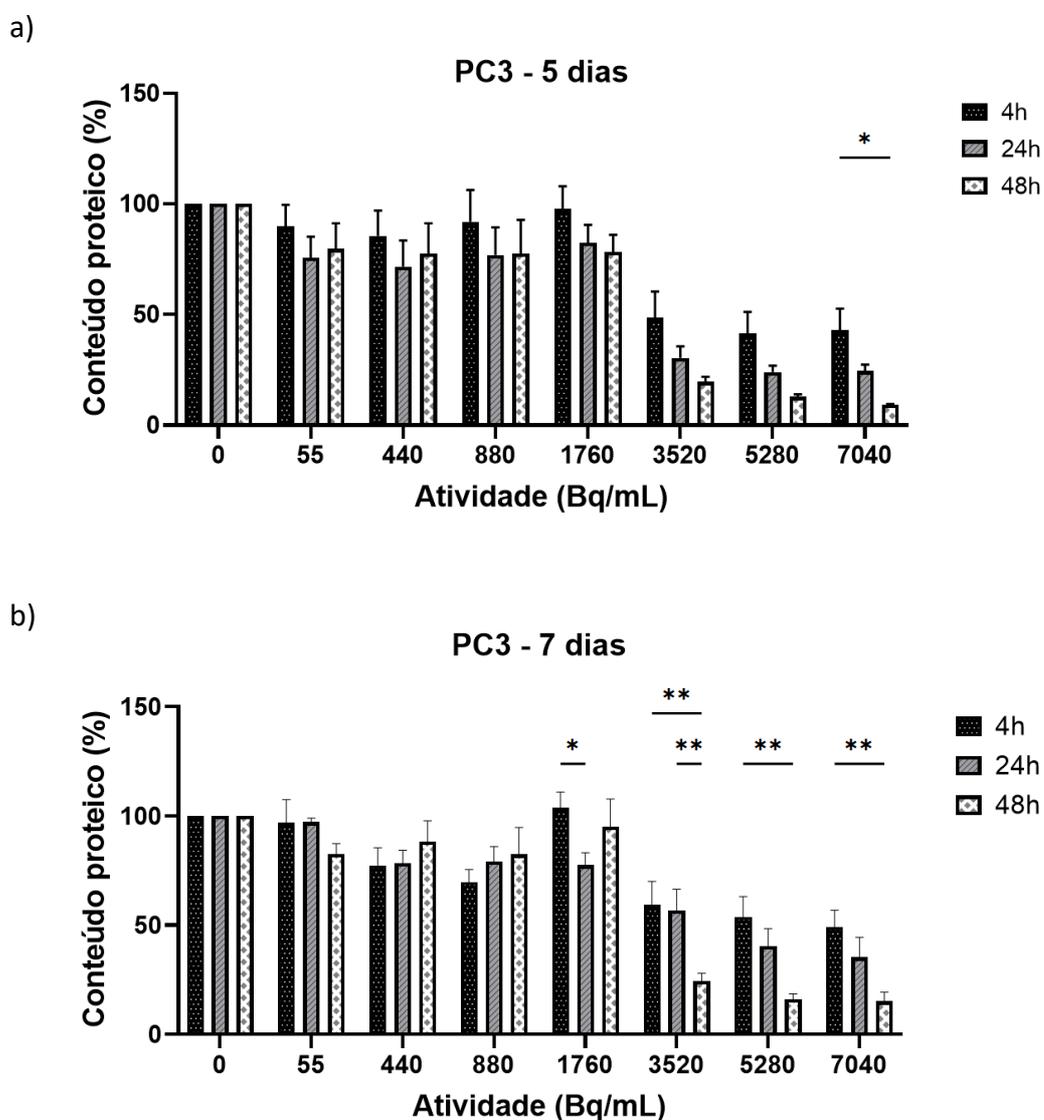


Figura 35: Análise do conteúdo proteico celular das células PC3 após irradiação com atividades iniciais entre 0 e 7040 Bq/mL, durante 4, 24 ou 48 horas. Os resultados estão agrupados segundo o tempo após a irradiação em que os efeitos foram avaliados, nomeadamente aos 5 dias (a) ou 7 dias (b). Os resultados foram normalizados ao controlo não irradiado e são apresentados como a média±erro padrão da percentagem de conteúdo proteico de, pelo menos, 5 experiências independentes realizadas em triplicado. ANOVA de dois fatores e teste de Tukey (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

Tendo em conta os resultados obtidos, tanto para 5 dias como para 7 dias após a irradiação, verificou-se que, no geral, houve uma tendência para a diminuição do conteúdo proteico celular com o aumento do tempo de irradiação, principalmente para as atividades de 3 520, de 5 280 e de 7 040 Bq/mL. No entanto, quando avaliado 5 dias após irradiação, somente a exposição à atividade volúmica de 7 040 Bq/mL de rádio-223, durante 4 ou 48 horas, mostrou induzir diferenças estatisticamente significativas ($p=0,0255$) na diminuição do conteúdo proteico, tendo-se verificado um decréscimo de $42,9\pm 9,8\%$ para $9,2\pm 0,4\%$. Esta diminuição significativa do conteúdo proteico já não se verificou entre as 4 e as 24 horas de exposição das células à mesma atividade volúmica de radiofármaco, nem entre as 24 e as 48 horas. Por outro lado, observando a Figura 35b, quando os efeitos foram avaliados 7 dias após irradiação, o decréscimo no conteúdo proteico celular foi estatisticamente significativo logo para a atividade volúmica de 1 760 Bq/mL, entre as 4 e as 24 horas de irradiação ($p=0,0337$), tendo diminuído de $103,9\pm 7,1\%$ para $77,5\pm 5,6\%$. O aumento do tempo de exposição ao rádio-223 provocou também decréscimos significativos no conteúdo proteico durante a irradiação com 3 520 Bq/mL, quer entre as 4 e as 48 horas ($p=0,0028$), quer entre as 24 e as 48 horas ($p=0,0062$), sendo a única atividade para a qual foram observadas diferenças significativas no conteúdo proteico entre estes dois últimos tempos. Também se observaram diferenças significativas na diminuição do conteúdo proteico entre as 4 e as 48 horas para as células PC3 expostas a atividades de 5 280 Bq/mL ($p=0,0012$) e de 7 040 Bq/mL ($p=0,0039$).

As células LNCaP, em cultura 2D, foram expostas a atividades volúmicas de rádio-223 de 0, de 55, de 3 520 ou de 7 040 Bq/mL, durante 24 horas. Os efeitos induzidos pelo rádio-223, a nível do conteúdo proteico foram, também, avaliados através do ensaio de SRB, 5 ou 7 dias após a irradiação, e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 36.

Através da análise destes resultados, verificou-se que houve uma diminuição do conteúdo proteico celular com o aumento da atividade volúmica inicial de rádio-223, a qual foi estatisticamente significativa para as atividades de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL. Os resultados obtidos 5 dias após a irradiação das células LNCaP com estas três atividades, durante 24 horas, mostraram uma diminuição significativa do conteúdo proteico para $85,4\pm 5,8\%$ ($p=0,0048$), para $28,5\pm 3,5\%$ ($p<0,0001$) e para $11,9\pm 0,8\%$ ($p<0,0001$), respetivamente. Considerando agora os resultados obtidos 7 dias após a irradiação das células LNCaP com as mesmas três atividades, durante 24 horas, houve uma diminuição significativa do conteúdo proteico para $66,4\pm 2,5\%$ ($p<0,0001$), para $18,1\pm 2,3\%$ ($p<0,0001$) e para $9,9\pm 1,1\%$ ($p<0,0001$), respetivamente.

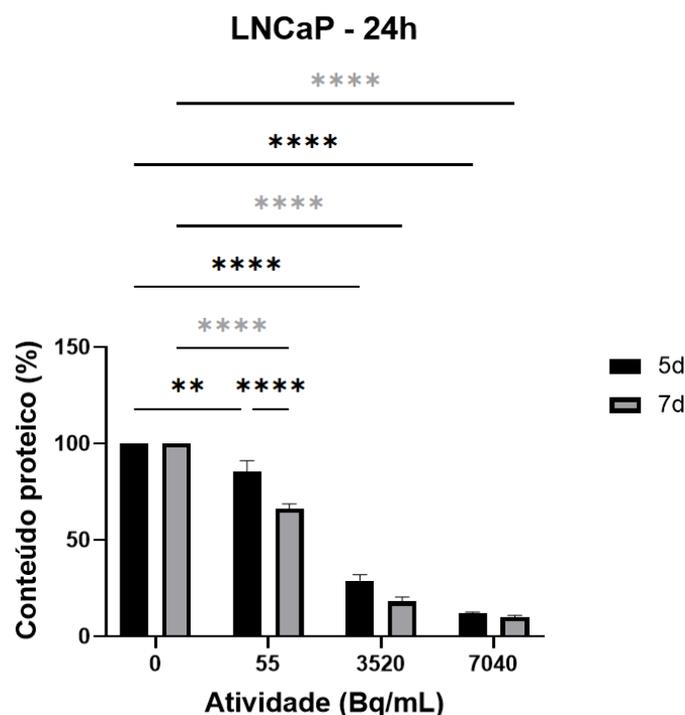


Figura 36: Análise do conteúdo proteico celular das células LNCaP através do ensaio de SRB, realizado 5 ou 7 dias após irradiação com as atividades iniciais de 0, 55, 3 520 ou 7 040 Bq/mL de rádio-223 durante 24 horas. Os resultados foram normalizados ao controlo não irradiado e são apresentados como a média±erro padrão da percentagem de conteúdo proteico de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em sextuplicado. ANOVA de dois fatores e teste de *Tukey* (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$).

Apesar de em ambas as linhas celulares a exposição ao rádio-223 levar a um decréscimo do conteúdo proteico celular com o aumento da atividade volúmica, observaram-se algumas diferenças entre elas. Considerando as 24 horas de irradiação com 55 Bq/mL, verificou-se que, após 5 dias, o conteúdo proteico das células LNCaP (85,4±5,8%) foi maior do que o das células PC3 (75,6±9,6%). No entanto, 5 dias após a irradiação com 3 520 e com 7 040 Bq/mL, o conteúdo proteico das células LNCaP (28,5±3,5% e 11,9±0,8%, respetivamente) foi inferior em comparação com as células PC3 (30,4±5,2% e 24,4±2,9%, respetivamente). Já quando avaliado após 7 dias, verificou-se que o conteúdo proteico das células LNCaP após administração de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL (66,4±2,5%, 18,1±2,3% e 9,9±1,1%, respetivamente) foi sempre inferior comparativamente ao das células PC3 (97,2±1,5%, 56,8±9,6% e 35,3±9,0%, respetivamente). Assim, verificou-se que os efeitos do rádio-223 nas células LNCaP conduziram a uma maior diminuição do conteúdo proteico, permitindo inferir que as células LNCaP foram mais radiosensíveis do que as células PC3. Para além disso, ao contrário do que aconteceu com as células PC3, observaram-se diferenças estatisticamente significativas aquando da avaliação do conteúdo proteico das células LNCaP, após 5 ou 7 dias, quando irradiadas com 55 Bq/mL, diminuindo de 85,4±5,8% para 66,4±2,5% ($p < 0,0001$). Ou seja, para a atividade mais baixa, a diminuição do conteúdo proteico na linha celular LNCaP acentuou-se significativamente ao longo do tempo após irradiação.

4.2.1.2. Sobrevivência celular

A análise da sobrevivência celular das células PC3, em resposta à irradiação durante 4 ou 24 horas com o rádio-223, foi avaliada através do ensaio clonogênico. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 37, que correlaciona o fator de sobrevivência celular (FS) e a atividade volúmica inicial, após 4 (a) ou 24 (b) horas de irradiação.

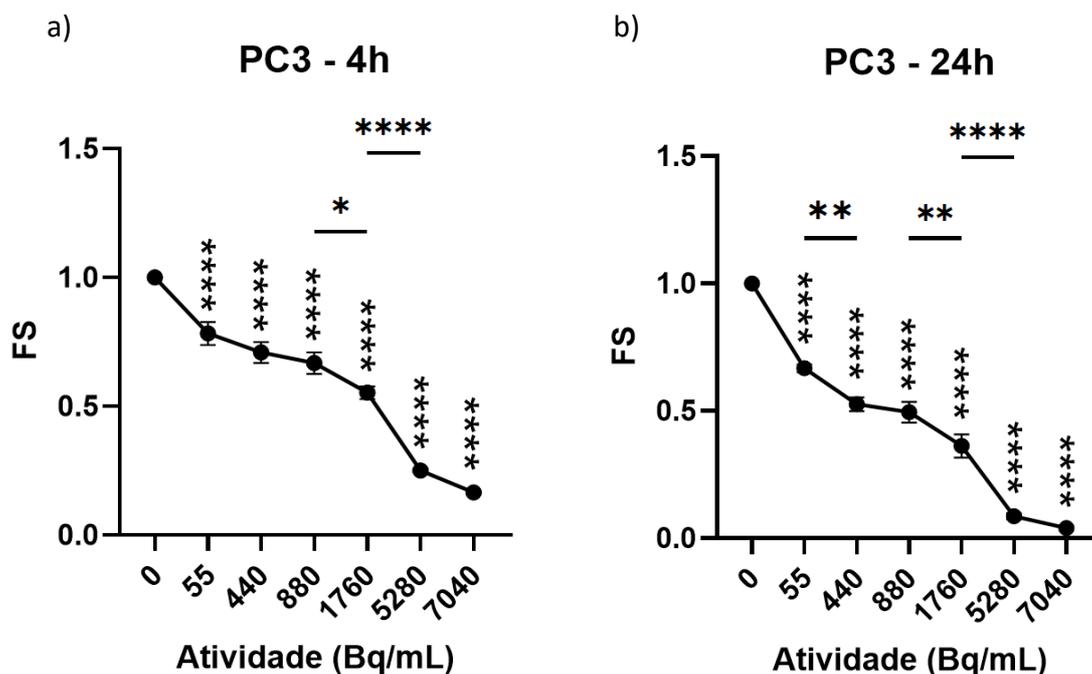


Figura 37: Sobrevivência celular da linha celular PC3, medida através do ensaio clonogênico, após irradiação com atividades iniciais entre 0 e 7 040 Bq/mL de rádio-223 durante 4 (a) ou 24 (b) horas. Os resultados são apresentados como a média±erro padrão do FS de 5 experiências independentes realizadas em duplicado. ANOVA de 1 fator e teste de *Holm-Sidak* (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$).

Observou-se que, de um modo geral e independentemente do tempo de irradiação, quanto maior a atividade volúmica inicial, menor a sobrevivência celular. Em relação ao controlo, a irradiação das células PC3 com 55, com 440, com 880, com 1 760, com 5 280 e com 7 040 Bq/mL, durante 4 horas, diminuiu significativamente o FS para $0,78\pm0,04$ ($p<0,0001$), para $0,71\pm0,04$ ($p<0,0001$), para $0,67\pm0,04$ ($p<0,0001$), para $0,55\pm0,02$ ($p<0,0001$), para $0,25\pm0,01$ ($p<0,0001$) e para $0,16\pm0,01$ ($p<0,0001$), respetivamente. Também se verificaram diminuições estatisticamente significativas no FS das células entre as atividades volúmicas de 880 e de 1 760 Bq/mL ($p=0,0379$) e entre 1 760 e 5 280 Bq/mL ($p<0,0001$).

Também a irradiação das células PC3 com 55, com 440, com 880, com 1 760, com 5 280 e com 7 040 Bq/mL, durante 24 horas, diminuiu significativamente o FS para $0,67\pm0,02$

($p < 0,0001$), para $0,53 \pm 0,03$ ($p < 0,0001$), para $0,50 \pm 0,04$ ($p < 0,0001$), para $0,36 \pm 0,05$ ($p < 0,0001$), para $0,09 \pm 0,01$ ($p < 0,0001$) e para $0,04 \pm 0,01$ ($p < 0,0001$), respetivamente. Verificaram-se, ainda, diminuições estatisticamente significativas no FS das células entre as atividades de 55 e de 440 Bq/mL ($p = 0,0018$), entre 880 e 1 760 Bq/mL ($p = 0,0027$) e, também, entre 1 760 e 5 280 Bq/mL ($p < 0,0001$).

A comparação entre os resultados obtidos para as 4 horas e as 24 horas de irradiação encontra-se representada na Figura 38.

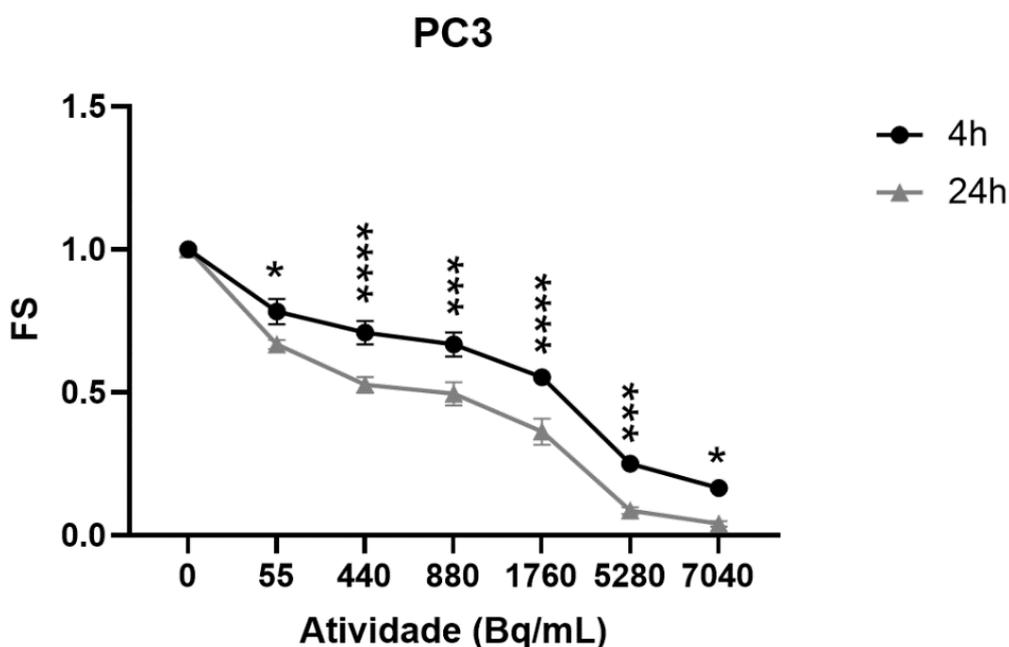


Figura 38: Comparação entre os resultados obtidos no ensaio clonogénico para as 4 horas (preto) e as 24 horas (cinzento) de irradiação. Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão do fator de sobrevivência celular (FS) de 5 experiências independentes realizadas em duplicado. ANOVA de 2 fatores e teste de *Sidak* (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

A análise da Figura 38 permitiu aferir que a exposição das células PC3 ao radiofármaco, durante diferentes tempos, induziu diferenças estatisticamente significativas na sobrevivência celular, independentemente da atividade volúmica. Tendo em conta o período de irradiação de 4 horas, foi necessária uma atividade entre 1 760 e 5 280 Bq/mL para que o FS diminuísse pelo menos 50%, enquanto para as 24 horas de irradiação apenas foi necessária uma atividade de aproximadamente 880 Bq/mL para induzir o mesmo efeito. A radiosensibilidade das células PC3 foi particularmente elevada quando expostas a 5 280 e a 7 040 Bq/mL, durante 24 horas, pois verificou-se uma diminuição do FS para valores inferiores a 0,1. Em suma, o aumento do tempo de exposição das células PC3 ao rádio-223 levou a um decréscimo na sua capacidade de sobrevivência.

4.2.2. Em culturas celulares 3D de CaP

Por fim, os efeitos radiobiológicos do rádio-223 foram avaliados em esferoides de cancro da próstata, constituídos por células PC3, a nível da estrutura, da viabilidade, da morte e da morfologia celular.

4.2.2.1. Estrutura dos esferoides

Com recurso a um microscópio ótico invertido, foram obtidas imagens dos esferoides de CaP, ao longo de 10 dias, desde a sua formação (Dia 1) até 7 dias após a sua irradiação com diferentes atividades volúmicas (Dia 10). A Figura 39 mostra imagens representativas da evolução dos esferoides produzidos e os efeitos do rádio-223 no seu crescimento, tamanho e estrutura ao longo do tempo.

As imagens dos esferoides revelam que a exposição à radiação emitida pelo rádio-223 teve impacto no crescimento, na morfologia e na integridade dos esferoides. Nos dias 7 e 10, foi visível a desagregação das células da superfície dos esferoides, principalmente a partir dos 1 760 Bq/mL. Avaliando a evolução dos esferoides ao longo dos dias e comparando com as imagens dos esferoides controlo, verificou-se que quanto maior a atividade administrada, maior a desintegração dos esferoides e, conseqüentemente, menor o seu crescimento e o seu tamanho.

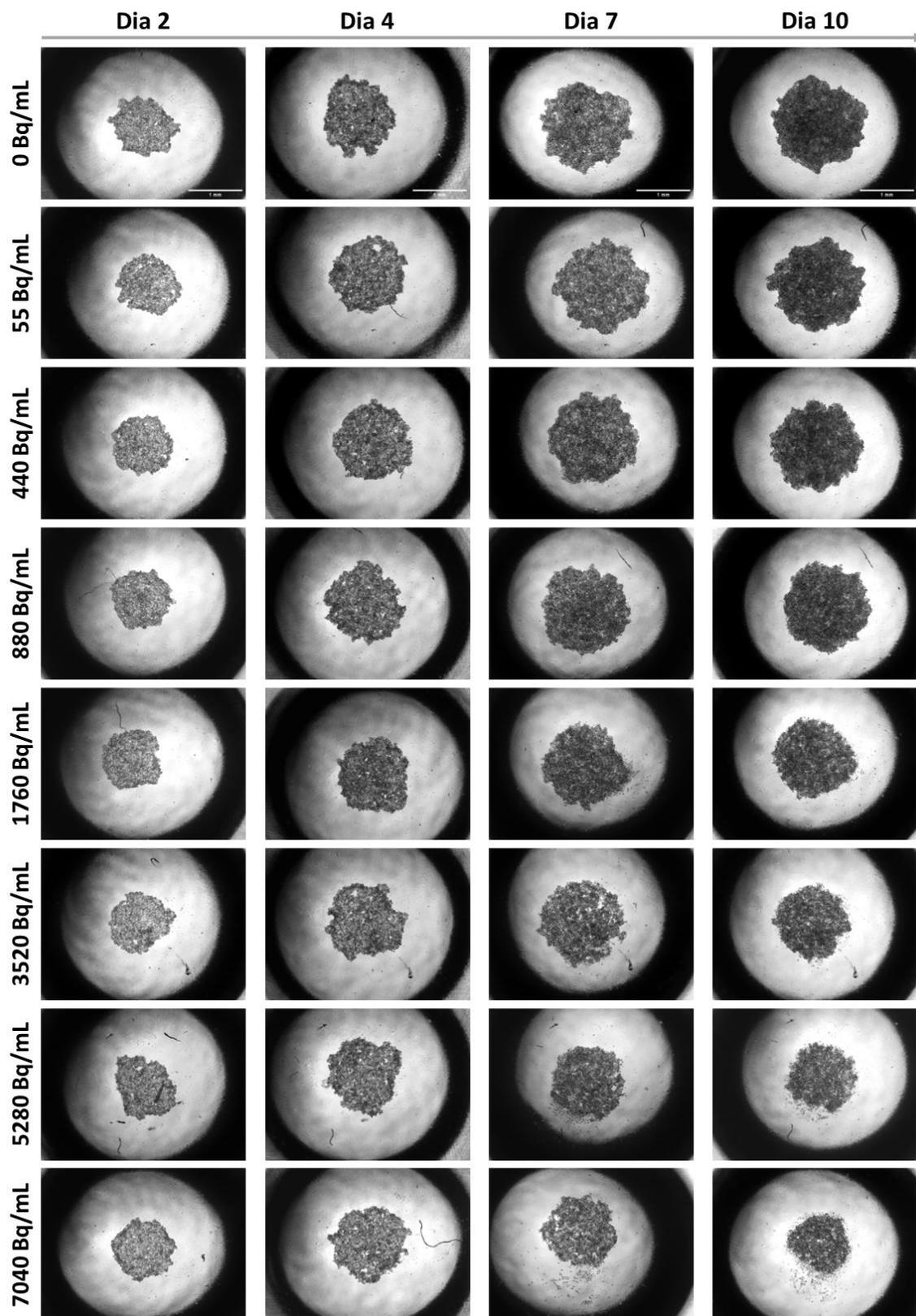


Figura 39: Painel de evolução dos esferoides de células PC3, com imagens adquiridas nos dias 2, 4, 7 e 10, em que o dia 2 corresponde ao dia em que os esferoides foram irradiados com as atividades iniciais indicadas na figura (0-7 040 Bq/mL). Para obtenção destas imagens, recorreu-se a um microscópio ótico invertido, com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 1 mm, igual para todas as imagens.

Além das observações qualitativas, usaram-se dois *softwares*, o *ImageJ* e o *AnaSP*, para analisar quantitativamente a progressão dos esferoides em termos da área, do perímetro e da circularidade. Com o *software AnaSP* foram ainda estimados o diâmetro equivalente, a esfericidade e a compacidade.

ImageJ

A Figura 40 mostra a evolução da área (a), do perímetro (b) e da circularidade (c) dos esferoides ao longo de 10 dias. A análise estatística destes gráficos foi realizada com recurso ao teste ANOVA de 2 fatores, cujos valores-p se encontram nos próprios gráficos e na Tabela 3.

Observando o gráfico apresentado na Figura 40a, constatou-se que no dia 1, ou seja, 24 horas depois das células serem semeadas nos poços, os esferoides tinham todos praticamente o mesmo tamanho (área $\approx 0,74 \pm 0,01 \text{ mm}^2$). Ao longo do tempo, a área foi aumentando de forma semelhante para todos os esferoides até ao quarto dia (1 dia após irradiação). No sexto dia (3 dias após irradiação), já eram bem visíveis as diferenças na área dos esferoides expostos às várias atividades volúmicas de radiofármaco, a qual se manteve aproximadamente constante até ao décimo dia (7 dias após irradiação). Após o sexto dia, verificou-se um aumento ligeiro da área nos esferoides controlo e irradiados com 55 e com 440 Bq/mL e uma diminuição nos esferoides irradiados com 880, com 1 760, com 3 520, com 5 280 e com 7 040 Bq/mL. No entanto, apenas a irradiação com 5 280 e com 7 040 Bq/mL levou a um decréscimo estatisticamente significativo da área dos esferoides do sexto dia para o décimo dia, diminuindo de $1,81 \pm 0,05 \text{ mm}^2$ para $1,39 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ ($p=0,0016$) e de $1,39 \pm 0,11 \text{ mm}^2$ para $1,01 \pm 0,06 \text{ mm}^2$ ($p=0,0064$). A área final dos esferoides (dia 10) foi maior do que a área inicial (dia 1) em todas as condições de irradiação, com diferenças estatisticamente significativas. No décimo dia, a diferença entre a área dos esferoides controlo e dos esferoides irradiados apenas foi estatisticamente significativa a partir da irradiação com 880 Bq/mL, sendo que os esferoides controlo alcançaram uma área de $2,66 \pm 0,11 \text{ mm}^2$ e os esferoides irradiados com 880, com 1 760, com 3 520, com 5 280 e com 7 040 Bq/mL alcançaram uma área de $2,21 \pm 0,10 \text{ mm}^2$ ($p<0,0001$), de $1,89 \pm 0,06 \text{ mm}^2$ ($p<0,0001$), de $1,77 \pm 0,06 \text{ mm}^2$ ($p<0,0001$), de $1,39 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ ($p<0,0001$) e de $1,01 \pm 0,06 \text{ mm}^2$ ($p<0,0001$), respetivamente.

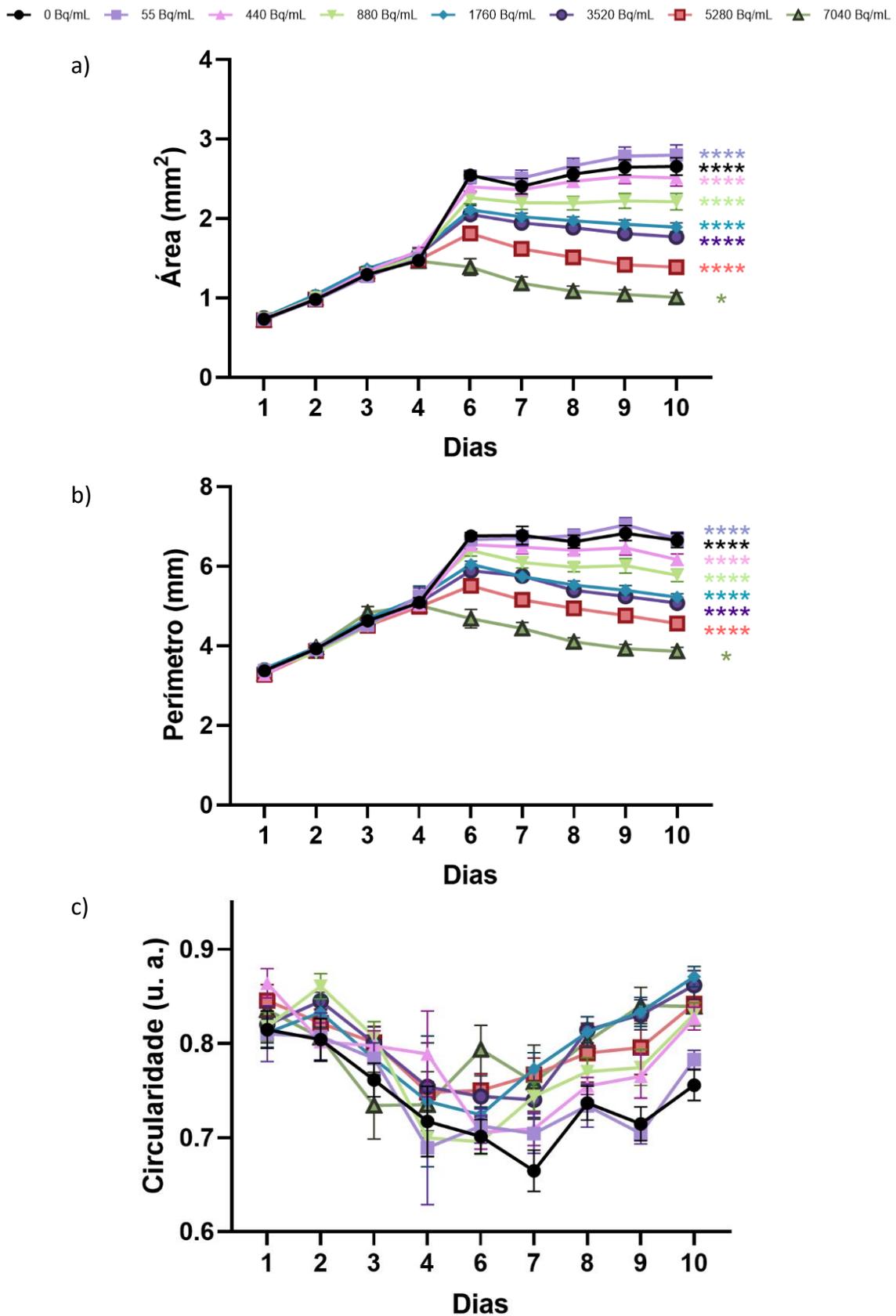


Figura 40: Evolução da a) área, b) perímetro e c) circularidade dos esferoides de células PC3, durante os 10 dias em que foram mantidos em cultura. Os esferoides analisados foram expostos durante 24 horas a atividades iniciais de rádio-223 entre 0 e 7 040 Bq/mL. Os resultados são apresentados como a média±erro padrão de 4 experiências independentes realizadas em triplicado. A análise estatística corresponde à comparação entre os dias 1 e 10, para todas as condições de irradiação.

Tabela 3: Análise estatística da Figura 40, através do teste ANOVA de 2 fatores e respetivos valores-p, em termos da comparação entre os esferoides controlo e os irradiados com as várias atividades, no dia 10, ou seja, 7 dias após irradiação (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$).

		Comparações múltiplas	Valor-p	Representação
Área	0 Bq/mL	880 Bq/mL	<0,0001	****
		1760 Bq/mL	<0,0001	****
		3520 Bq/mL	<0,0001	****
		5280 Bq/mL	<0,0001	****
		7040 Bq/mL	<0,0001	****
Perímetro	0 Bq/mL	440 Bq/mL	0,0165	*
		880 Bq/mL	<0,0001	****
		1760 Bq/mL	<0,0001	****
		3520 Bq/mL	<0,0001	****
		5280 Bq/mL	<0,0001	****
		7040 Bq/mL	<0,0001	****
Circularidade	0 Bq/mL	440 Bq/mL	0,0464	*
		880 Bq/mL	0,0290	*
		1760 Bq/mL	0,0001	***
		3520 Bq/mL	0,0005	***
		5280 Bq/mL	0,0102	*
		7040 Bq/mL	0,0111	*

Como era de esperar, a evolução do perímetro dos esferoides (Figura 40b) foi semelhante à da área. No primeiro dia, o perímetro era aproximadamente de $3,35 \pm 0,05$ mm, aumentando uniformemente até ao quarto dia. No sexto dia, já se observavam diferenças no perímetro entre as várias atividades. Desde o sexto dia até ao décimo dia, o perímetro dos esferoides controlo e dos irradiados com 55 e com 440 Bq/mL manteve-se praticamente estável, enquanto o perímetro dos esferoides irradiados com 880, com 1 760, com 3 520, com 5 280 e com 7 040 Bq/mL diminuiu significativamente de $6,39 \pm 0,14$ mm para $5,78 \pm 0,17$ mm, de $6,05 \pm 0,08$ mm para $5,22 \pm 0,09$ mm, de $5,89 \pm 0,05$ mm para $5,08 \pm 0,09$ mm, de $5,51 \pm 0,13$ mm para $4,56 \pm 0,11$ mm e de $4,68 \pm 0,23$ mm para $3,86 \pm 0,10$ mm, respetivamente. O perímetro final dos esferoides (dia 10) também foi maior do que o perímetro inicial (dia 1) em todas as condições de irradiação, com diferenças estatisticamente significativas. No décimo dia, a diferença entre o perímetro dos esferoides controlo e dos esferoides irradiados foi significativa logo a partir da irradiação com 440 Bq/mL, sendo que os esferoides controlo alcançaram um perímetro de $6,65 \pm 0,18$ mm e os esferoides irradiados com 440, com 880, com 1 760, com 3 520, com 5 280 e com 7 040 Bq/mL alcançaram um perímetro de $6,17 \pm 0,14$ mm ($p = 0,0165$), de $5,78 \pm 0,16$ mm ($p < 0,0001$), de $5,22 \pm 0,09$ mm ($p < 0,0001$), de $5,08 \pm 0,09$ mm ($p < 0,0001$), de $4,56 \pm 0,11$ mm ($p < 0,0001$) e de $3,86 \pm 0,10$ mm ($p < 0,0001$), respetivamente. Apesar de, no décimo dia, a área e o perímetro dos esferoides irradiados com 55 Bq/mL terem sido superiores aos esferoides controlo, as diferenças

não foram estatisticamente significativas. Em resumo, a exposição dos esferoides ao rádio-223 provocou uma diminuição tanto da área como do perímetro.

Em termos da forma dos esferoides, a evolução da circularidade (Figura 40c) foi totalmente diferente da evolução da área e do perímetro. Inicialmente, a circularidade dos esferoides variou entre 0,8 e 0,9, com uma média de $0,83 \pm 0,02$, indicando que os esferoides eram aproximadamente circulares. Até ao sétimo dia, observou-se, no geral, uma diminuição da circularidade em todas as condições, a qual foi mais acentuada nos esferoides controlo do que nos irradiados. Desde o sétimo dia até ao décimo dia, a circularidade voltou a aumentar para valores próximos dos valores iniciais, não se tendo verificado diferenças significativas entre o início e o fim do período de cultura. No décimo dia, os esferoides controlo e os esferoides irradiados com 55, com 440, com 880, com 1 760, com 3 520, com 5 280 e com 7 040 Bq/mL apresentaram valores de circularidade de $0,76 \pm 0,02$, de $0,78 \pm 0,01$, de $0,83 \pm 0,01$ ($p=0,0464$), de $0,83 \pm 0,01$ ($p=0,0290$), de $0,87 \pm 0,01$ ($p=0,0001$), de $0,86 \pm 0,02$ ($p=0,0005$), de $0,84 \pm 0,02$ ($p=0,0102$) e de $0,84 \pm 0,02$ ($p=0,0111$), respetivamente. Analisando estes resultados, concluiu-se que o tratamento com rádio-223 induziu um aumento da circularidade.

AnaSP

A Figura 41 mostra a evolução da área, do perímetro, do diâmetro equivalente, da circularidade, da esfericidade e da compacidade dos esferoides ao longo de 10 dias. A análise estatística destes gráficos foi realizada com recurso ao teste ANOVA de 2 fatores, cujos valores-p se encontram nos próprios gráficos e na Tabela 4.

Relativamente ao tamanho dos esferoides, a evolução da área e do diâmetro equivalente foram semelhantes. No primeiro dia, os esferoides tinham todos praticamente o mesmo tamanho, com uma área média de $0,71 \pm 0,03$ mm² e um diâmetro equivalente médio de $0,95 \pm 0,02$ mm. Até ao quarto dia ambos aumentaram de igual modo para todas as condições de irradiação. Contudo, do quarto dia até ao sexto dia, o comportamento destes dois parâmetros variou em função da atividade administrada. A partir do sexto dia, mantiveram-se aproximadamente estáveis, com diferenças estatisticamente significativas entre o sexto e o décimo dias apenas para a irradiação com 5 280 Bq/mL, que provocou o decréscimo da área de $1,64 \pm 0,05$ mm² para $1,27 \pm 0,04$ mm² ($p=0,0150$) e o decréscimo do diâmetro equivalente de $1,45 \pm 0,02$ mm para $1,28 \pm 0,02$ mm ($p=0,0135$). A área e o diâmetro equivalente final (dia 10) foram superiores aos valores iniciais (dia 1) em todas as condições de irradiação, com diferenças estatisticamente significativas, exceto entre os esferoides irradiados com 7 040 Bq/mL. No dia 10, as diferenças na área e no diâmetro equivalente entre os esferoides controlo e os esferoides irradiados foram significativas a partir da irradiação com 880 Bq/mL. Os esferoides controlo obtiveram uma área e um diâmetro equivalente de $2,74 \pm 0,09$ mm² e de $1,87 \pm 0,03$ mm, respetivamente, enquanto que os esferoides irradiados com 880, com 1 760, com 3 520, com

5 280 e com 7 040 Bq/mL alcançaram uma área e um diâmetro equivalente de $2,10 \pm 0,015 \text{ mm}^2$ ($p < 0,0001$) e de $1,64 \pm 0,06 \text{ mm}$ ($p < 0,0001$), de $1,85 \pm 0,08 \text{ mm}^2$ ($p < 0,0001$) e de $1,54 \pm 0,03 \text{ mm}$ ($p < 0,0001$), de $1,66 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ ($p < 0,0001$) e de $1,46 \pm 0,01 \text{ mm}$ ($p < 0,0001$), de $1,27 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ ($p < 0,0001$) e de $1,28 \pm 0,02 \text{ mm}$ ($p < 0,0001$), de $0,98 \pm 0,09 \text{ mm}^2$ ($p < 0,0001$) e de $1,12 \pm 0,05 \text{ mm}$ ($p < 0,0001$), respetivamente. Em resumo, a exposição dos esferoides ao rádio-223 provocou uma diminuição tanto da área como do diâmetro equivalente.

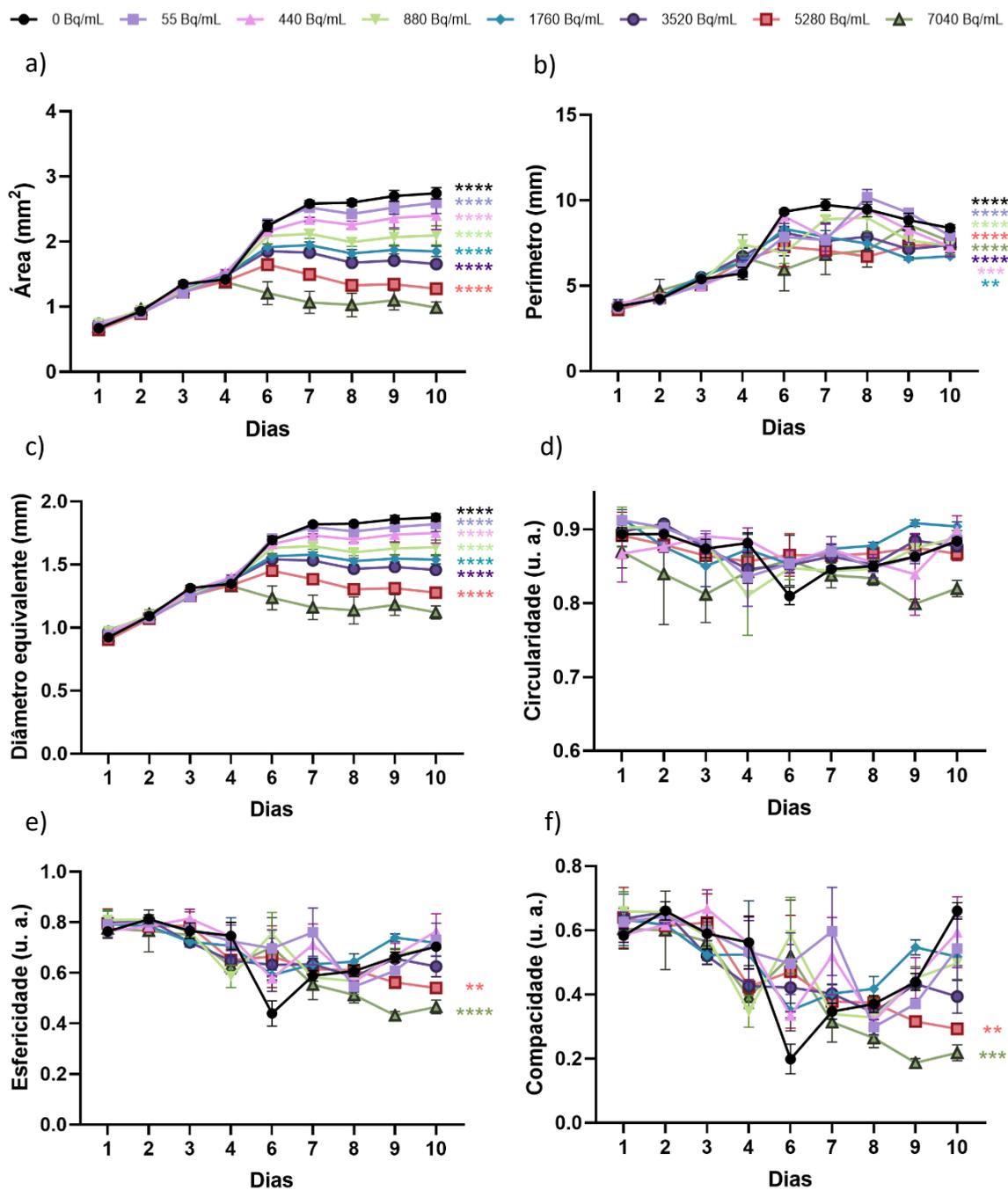


Figura 41: Evolução da a) área, b) perímetro, c) diâmetro equivalente, d) circularidade, e) esfericidade e f) compacidade dos esferoides de células PC3, durante os 10 dias em que foram mantidos em cultura. Os esferoides analisados foram expostos durante 24 horas a atividades iniciais de rádio-223 entre 0 e 7 040 Bq/mL. Os resultados são apresentados como a média±erro padrão de 4 experiências independentes realizadas em triplicado. A análise estatística corresponde à comparação entre os dias 1 e 10, para todas as condições de irradiação.

Tabela 4: Análise estatística da Figura 41, através do teste ANOVA de 2 fatores e respetivos valores-p, em termos da comparação entre os esferoides controlo e os irradiados com as várias atividades, no dia 10, ou seja, 7 dias após irradiação (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

		Comparações múltiplas	Valor-p	Representação
Área	0 Bq/mL	880 Bq/mL	<0,0001	****
		1760 Bq/mL	<0,0001	****
		3520 Bq/mL	<0,0001	****
		5280 Bq/mL	<0,0001	****
		7040 Bq/mL	<0,0001	****
Diâmetro equivalente	0 Bq/mL	880 Bq/mL	<0,0001	****
		1760 Bq/mL	<0,0001	****
		3520 Bq/mL	<0,0001	****
		5280 Bq/mL	<0,0001	****
		7040 Bq/mL	<0,0001	****
Esfericidade	0 Bq/mL	7040 Bq/mL	0.0025	**
Compacidade	0 Bq/mL	3520 Bq/mL	0.0286	*
		5280 Bq/mL	0.0009	***
		7040 Bq/mL	<0.0001	****

Inicialmente, o perímetro também foi idêntico para todos os esferoides, com uma média de $3,80 \pm 0,16$ mm, aumentando uniformemente até ao quarto dia. Todavia, a partir do sexto dia, a sua evolução foi irregular, sem relação aparente com a atividade administrada. No décimo dia, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os esferoides controlo e os esferoides irradiados, para nenhuma das condições de irradiação.

Em termos da forma dos esferoides, o comportamento da circularidade e da esfericidade foram equivalentes. Inicialmente, a circularidade dos esferoides variou entre 0,85 e 0,95, com uma média de $0,89 \pm 0,02$, e a esfericidade variou entre 0,75 e 0,80, com uma média de $0,79 \pm 0,03$, indicando que os esferoides eram sensivelmente circulares e esféricos. Ao longo dos 10 dias, apenas se observaram alterações ligeiras na circularidade dos esferoides, mais acentuadas na irradiação com 7 040 Bq/mL, mas sem diferenças estatisticamente significativas entre o primeiro e o décimo dias. No décimo dia, também não houve diferenças significativas entre a circularidade dos esferoides controlo e dos esferoides irradiados. Em contrapartida, houve uma diminuição estatisticamente significativa da esfericidade dos esferoides irradiados com 5 280 e com 7 040 Bq/mL de $0,80 \pm 0,06$ para $0,54 \pm 0,02$ ($p = 0,0011$) e de $0,78 \pm 0,04$ para $0,47 \pm 0,03$ ($p < 0,0001$), respetivamente. No décimo dia, apenas houve alterações significativas entre a esfericidade dos esferoides controlo e dos esferoides irradiados com 7 040 Bq/mL

($p=0,0025$). Resumidamente, a irradiação com rádio-223 levou ao decréscimo da circularidade e da esfericidade dos esferoides irradiados com as atividades mais elevadas, ao passo que a forma dos restantes esferoides permaneceu aproximadamente circular e esférica.

Para finalizar, a compacidade inicial dos esferoides foi em média $0,62\pm 0,05$ e, até ao oitavo dia houve, no geral, uma tendência a diminuir. A partir do oitavo dia até ao décimo dia, a compacidade aumentou para as atividades mais pequenas e diminuiu para as atividades mais elevadas. Assim, em comparação com o primeiro dia, apenas houve uma diminuição estatisticamente significativa da esfericidade para os 5 280 Bq/mL, de $0,64\pm 0,09$ para $0,29\pm 0,02$ ($p=0,0021$), e para os 7 040 Bq/mL, de $0,60\pm 0,06$ para $0,22\pm 0,02$ ($p=0,0005$). No décimo dia, observaram-se alterações significativas entre os esferoides controlo e os esferoides irradiados com 3 520 Bq/mL ($p=0,0286$), com 5 280 Bq/mL ($p=0,0009$) e com 7 040 Bq/mL ($p<0,0001$). Deste modo, pode-se afirmar que quanto maior a atividade volúmica inicial adicionada, menos compactos os esferoides.

4.2.2.2. Viabilidade celular

Ensaio de viabilidade *CellTiter-Glo*® 3D

O ensaio de viabilidade *CellTiter-Glo*® 3D permitiu medir, indiretamente, a viabilidade celular dos esferoides de células PC3 após irradiação com rádio-223. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 42, que corresponde à normalização dos valores de luminescência dos sinais medidos no espectrofotómetro ao controlo, a qual se designou por viabilidade celular relativa.

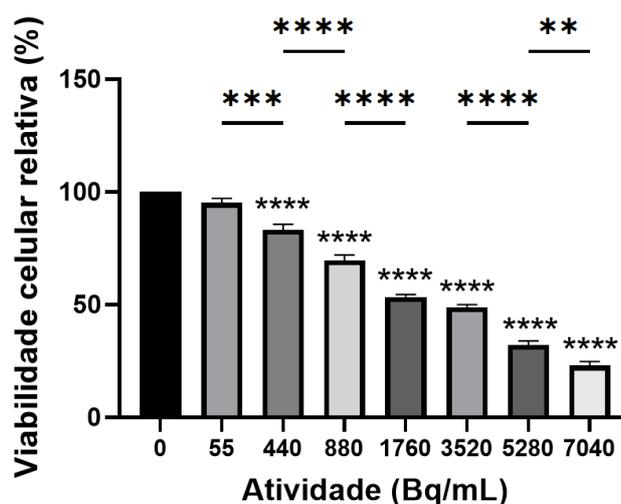


Figura 42: Análise da viabilidade celular relativa (%) das células PC3 constituintes dos esferoides, obtida através do ensaio *CellTiter-Glo*® 3D, realizado 7 dias após irradiação com as atividades volúmicas iniciais entre 0 e 7 040 Bq/mL. Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão de 3 experiências independentes realizadas em triplicado. ANOVA de 1 fator e teste de Tukey (** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$).

Os resultados evidenciam uma diminuição progressiva da viabilidade celular com o aumento da atividade volúmica inicial de rádio-223, a qual foi estatisticamente significativa para todas as atividades, exceto para os 55 Bq/mL. Deste modo, a irradiação com 440, com 880, com 1 760, com 3 520, com 5 280 e com 7 040 Bq/mL levou ao decréscimo significativo da viabilidade celular para $83,1 \pm 2,5\%$ ($p < 0,0001$), para $69,7 \pm 2,4\%$ ($p < 0,0001$), para $53,5 \pm 1,1\%$ ($p < 0,0001$), para $48,9 \pm 1,1\%$ ($p < 0,0001$), para $32,2 \pm 1,7\%$ ($p < 0,0001$) e para $23,1 \pm 1,8\%$ ($p < 0,0001$), respetivamente. Comparando entre atividades volúmicas consecutivas, só não houve uma diminuição significativa da viabilidade celular entre os esferoides irradiados com 1 760 e com 3 520 Bq/mL. Importa ainda realçar que foi necessário irradiar os esferoides com 3 520 Bq/mL para que a viabilidade celular reduzisse para aproximadamente metade. Como este ensaio mede a quantidade de ATP presente nos esferoides, significa que a irradiação com rádio-223 provocou um decréscimo da produção de ATP, ou seja, da atividade metabólica das células PC3 constituintes dos esferoides.

Microscopia confocal

Para além do ensaio *CellTiter-Glo*[®] 3D, recorreu-se à microscopia confocal para avaliar qualitativamente a viabilidade e a morte celular dos esferoides de células PC3 depois de irradiados, através da marcação dupla com AnV e IP, que correspondem à coloração verde e vermelha, respetivamente. Na Figura 43 apresentam-se imagens sequenciais do plano Z e na Figura 44 a reconstrução 3D de esferoides controlo (0 Bq/mL) e de esferoides irradiados com 55, com 3 520 e com 7 040 Bq/mL de rádio-223.

Tendo em conta que a AnV se liga a células em apoptose e o IP se liga a células em necrose, foi possível, através da observação das imagens adquiridas no microscópio confocal, estudar a viabilidade e tipos de morte celular presentes nos esferoides. Comparando as três atividades volúmicas iniciais, verificou-se que quanto maior a atividade administrada, maior a marcação tanto com AnV como com IP, ou seja, maior a indução de morte celular por apoptose e/ou necrose e, como consequência, maior a perda de viabilidade celular. Constatou-se ainda que houve uma maior marcação dos esferoides com AnV do que com IP, sugerindo que a irradiação com rádio-223 provoca a ativação de vias de morte celular, nomeadamente por apoptose. Nos esferoides controlo, apesar destes não terem sido irradiados, também se observou alguma marcação com AnV e com IP.

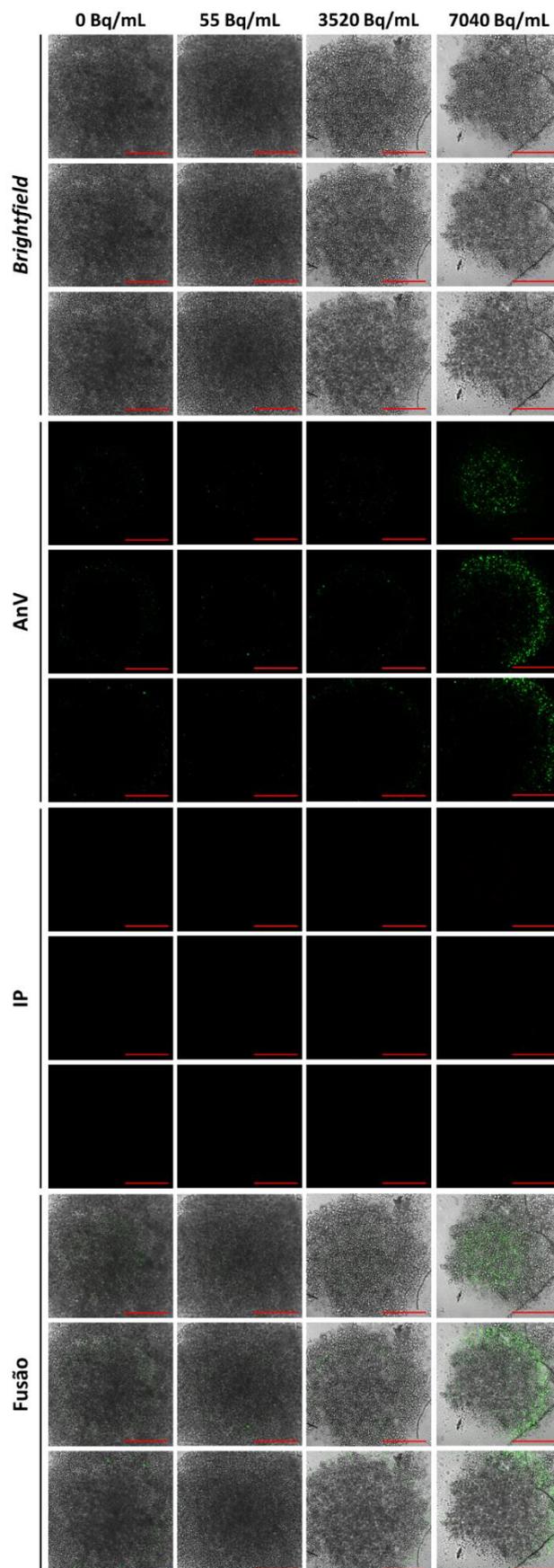


Figura 43: Imagens representativas de planos Z de esferoides de células PC3, irradiados com 0, 55, 3520 e 7040 Bq/mL, marcados com AnV/IP 7 dias após irradiação. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio confocal com uma ampliação de 10X. A escala apresentada corresponde a 500 μm .

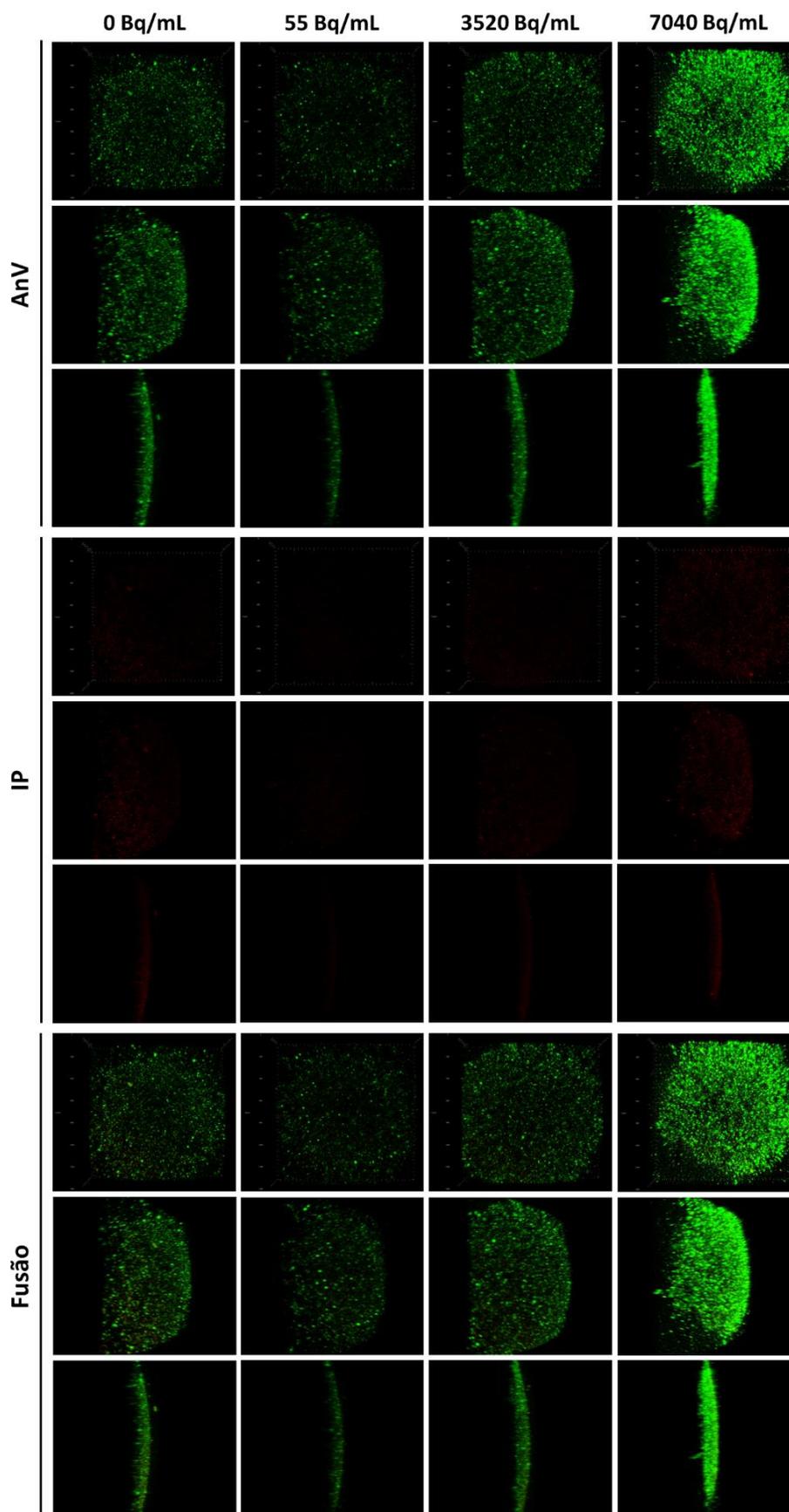


Figura 44: Reconstrução 3D de esferoides de células PC3, irradiados com 0, 55, 3 520 e 7 040 Bq/mL e marcados com AnV/IP 7 dias após irradiação, a partir das imagens dos planos Z. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio confocal com uma ampliação de 10X.

As imagens sequenciais de alguns planos Z dos esferoides também permitiram visualizar, mais pormenorizadamente, a desintegração dos esferoides irradiados, que foram ficando cada vez menos compactos, e a desagregação das células, principalmente na periferia, mais evidentes na irradiação com 3 520 e com 7 040 Bq/mL. As células na periferia dos esferoides ficaram marcadas principalmente com AnV, ou seja, eram maioritariamente células apoptóticas. Como resultado da desintegração dos esferoides expostos ao rádio-223, as imagens obtidas evidenciaram, também, a consequente diminuição do seu tamanho com o aumento da atividade, pelo que no caso dos esferoides controlo e dos esferoides irradiados com 55 Bq/mL, por serem maiores, não couberam no campo de visão do microscópio e não foi possível obter imagens completas.

4.2.2.3. Morfologia celular

Também a caracterização morfológica das células constituintes dos esferoides, irradiados e não irradiados, foi realizada, com o objetivo de estudar os efeitos da irradiação com rádio-223 na morfologia celular. A análise morfológica foi feita com recurso à coloração com o corante *Giemsa*. A Figura 45 mostra quatro imagens representativas da condição controlo e das condições de irradiação com 55, com 880, com 3 520 e com 7 040 Bq/mL.

Existem várias alterações morfológicas que permitem distinguir células apoptóticas de células necróticas. Por exemplo, a condensação da cromatina, os *blebbings*, a fragmentação nuclear e a vacuolização citoplasmática são características da apoptose. Por outro lado, a rotura da membrana plasmática e o extravasamento do citoplasma são indicativos de necrose (Marques *et al.*, 2021).

Analisando as imagens, verificou-se a presença de um grande número de células binucleadas, já que estas são características de células tumorais. Em geral, as células controlo apresentaram uma morfologia arredondada e uma membrana plasmática intacta, sem evidências de rutura, correspondendo a células viáveis. No entanto, em algumas células controlo observou-se a condensação da cromatina e a formação de *blebbings*, ambos sinais precoces de apoptose. Comparando com as diferentes condições de irradiação, as células dos esferoides que foram irradiados apresentaram mais alterações na sua morfologia, muitas delas com indícios de morte celular por apoptose ou necrose. Em contraste com as células controlo, as células irradiadas exibiram uma forma mais irregular e núcleos de tamanho aumentado, designados núcleos gigantes. A transformação morfológica mais comum foi ao nível da membrana plasmática, com o aparecimento de *blebbings*, pelo que se concluiu que existiam mais células apoptóticas do que necróticas. Além destes eventos, observou-se vacuolização citoplasmática e fragmentação nuclear, ambos sinais de apoptose e, em algumas células irradiadas com atividades mais elevadas (3 520 e 7 040 Bq/mL), a rutura da membrana e o consequente

extravasamento do citoplasma, característicos de necrose. Por último, foram detetados micronúcleos em células que tinham sido expostas a radiação ionizante.

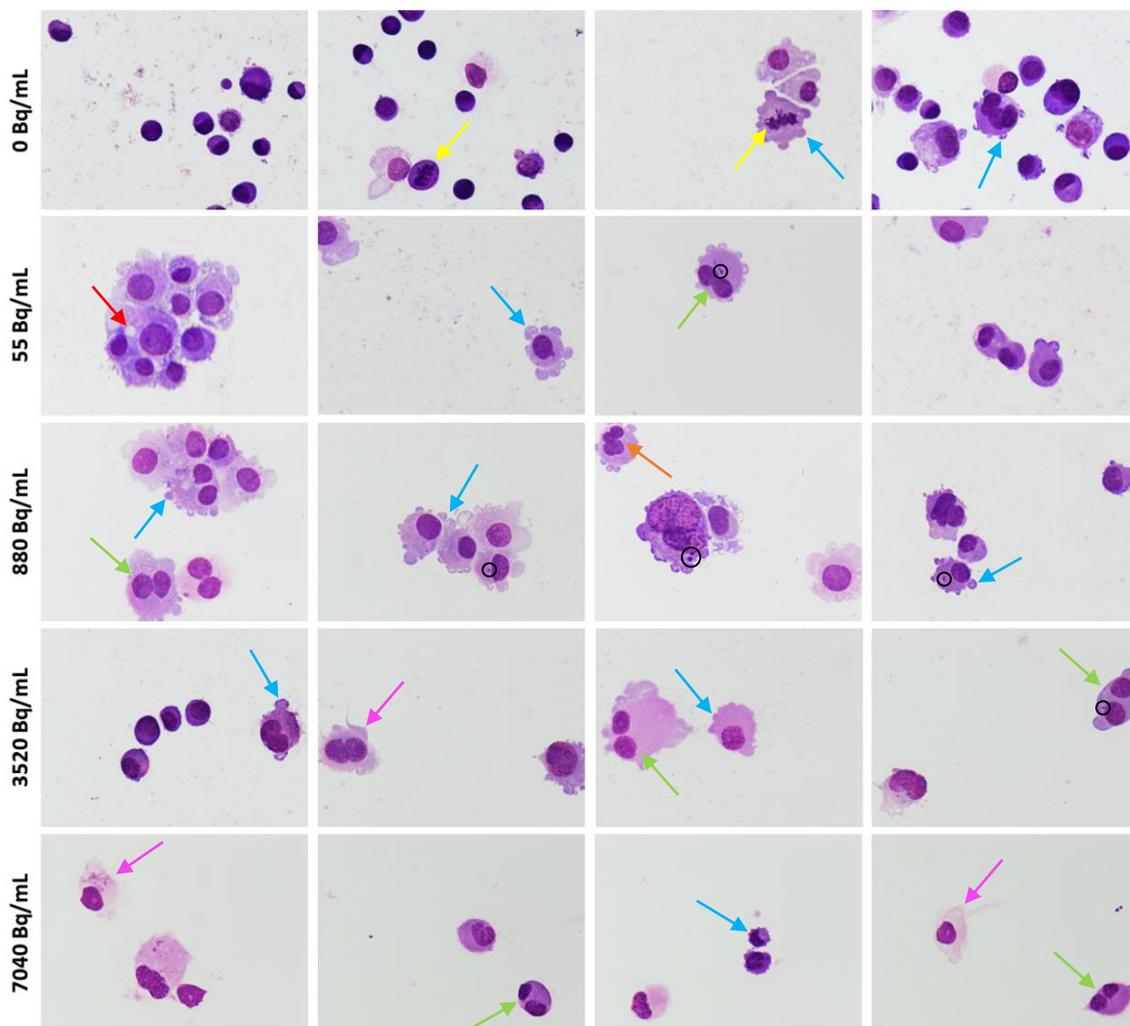


Figura 45: Análise morfológica de células PC3 de esferoides, através da coloração por *Giemsa*, realizada 7 dias após irradiação com 0, 55, 880, 3 520 e 7 040 Bq/mL de rádio-223 durante 24 horas. São apresentadas 4 imagens representativas de cada condição. As setas correspondem a características morfológicas que podem indicar apoptose ou necrose. A seta amarela corresponde à condensação da cromatina. A seta azul corresponde a *blebbings*. A seta verde corresponde a células binucleadas. A seta vermelha corresponde a vacuolização citoplasmática. A seta laranja corresponde a fragmentação nuclear. A seta rosa corresponde ao extravasamento do citoplasma. A preto estão rodeados micronúcleos. Para obtenção destas imagens, recorreu-se a um microscópio ótico, com uma ampliação de 400X.

5. Discussão

Apesar de nos últimos anos ter havido grandes avanços no diagnóstico e no tratamento do cancro da próstata (CaP), esta neoplasia continua a ser das mais incidentes e diagnosticadas no sexo masculino. O cancro da próstata metastático resistente à castração (CPMRC) é o que apresenta pior prognóstico e, atualmente, as estratégias terapêuticas são apenas paliativas. Por estas razões, o estudo aprofundado dos mecanismos responsáveis pelo aparecimento do CaP e evolução até ao CPMRC e o desenvolvimento de novas terapias são cruciais para melhorar o panorama mundial (M. Morris *et al.*, 2019). Devido à elevada prevalência de metástases ósseas em doentes com CPMRC, surgiram terapias dirigidas para o osso, como, por exemplo, o denosumab, os bisfosfonatos e, mais recentemente, o radiofármaco dicloreto de rádio-223 (Wilson & Parker, 2016).

O rádio-223 foi o primeiro emissor de partículas alfa aprovado para fins terapêuticos pela FDA e pela EMA, em específico para o tratamento de doentes com CPMRC e metástases ósseas e que não apresentem metástases viscerais (Marques *et al.*, 2021). Contudo, apesar de estar comprovada a sua eficácia clínica, com o aumento do tempo de sobrevivência dos doentes, ainda existem dúvidas sobre a localização do rádio-223 no interior das células tumorais e a forma como este interage com as respetivas vias moleculares, bem como sobre o processo da sua intercalação entre os vários componentes do nicho metastático. Consequentemente, ainda não se sabe ao certo se os efeitos biológicos observados são induzidos pelas partículas alfa emitidas pelo rádio-223 que foi incorporado na matriz óssea, pelo rádio-223 que foi internalizado pelas células do CaP presentes nas metástases ósseas ou por ambos (Marques *et al.*, 2021; S. Nilsson, 2016; Wilson & Parker, 2016). Estas dúvidas acerca dos mecanismos moleculares e alvos envolvidos na ação do rádio-223 e na resposta à terapia são associadas à eficácia clínica estar aquém do expectável para este radiofármaco (Marques *et al.*, 2021).

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo, com a finalidade de avaliar o perfil cinético do rádio-223 em duas linhas celulares de CaP metastático, a linha PC3 e a linha LNCaP, mostraram haver internalização do radiofármaco por ambas as linhas celulares, inclusive no núcleo, ficando retido ao longo do tempo. Foram também caracterizados, nestas culturas, os efeitos radiobiológicos induzidos pelo rádio-223, tendo-se verificado a diminuição da sobrevivência e da proliferação celular após irradiação, assim como alterações morfológicas características de apoptose e um aumento dos danos no ADN (Marques *et al.*, 2021). No entanto, estes ensaios foram realizados em culturas celulares 2D que não mimetizam por completo o microambiente tumoral *in vivo*, pelo que se decidiu explorar os efeitos do rádio-223 em estruturas 3D. As culturas celulares 3D permitem o estabelecimento de um maior número de interações célula-célula, assim como de gradientes metabólicos e proliferativos, constituindo uma representação mais realista dos tumores *in vivo* e da resposta das células tumorais aos vários tipos de terapêutica (Caleffi *et al.*, 2021; Sakalem *et al.*, 2021).

Deste modo, o nosso grupo desenvolveu anteriormente esferoides de CaP utilizando o modelo de levitação magnética (Tavares, 2019) e a junção das técnicas de *hanging drop* e de

levitação magnética (Silva, 2021). Contudo, foram reportadas algumas limitações, tais como a coloração castanha das nanopartículas magnéticas, que pode, por exemplo, dificultar a análise dos resultados de ensaios de imunohistoquímica (Tavares, 2019), a eliminação das nanopartículas ao fim de oito dias em cultura, assim como a desintegração dos esferoides quando se utilizou a *MagPen* (Greiner Bio-One) para os transferir para outra superfície para a realização de microscopia de fluorescência (Silva, 2021). Outra das necessidades reportadas pela nossa equipa foi a diminuição do tamanho dos esferoides para minimizar a região necrótica, já que, de acordo com Souza-Araújo e seus colaboradores (Souza-Araújo *et al.*, 2020), quanto maior o tamanho do esferoide, maior a dificuldade de difusão dos nutrientes e de oxigénio através do esferoide, fazendo com que as células do seu interior comecem a entrar em hipoxia e em necrose. De acordo com Leek e seus colaboradores (Leek *et al.*, 2016), esferoides com um diâmetro superior a 160 μm começam a desenvolver um núcleo hipóxico e com um diâmetro entre 400 e 500 μm o núcleo torna-se necrótico. Numa das experiências realizadas pela nossa equipa, utilizou-se uma concentração inicial de 200 000 células/esferoide, tendo-se obtido esferoides com um diâmetro superior a 2 mm e uma área por volta dos 4 mm^2 (Tavares, 2019). Num estudo mais recente, foi utilizada uma menor concentração inicial, 20 000 células/esferoide, permitindo obter esferoides mais pequenos, com diâmetros entre 1 e 1,5 mm e uma área de cerca de 1,5 mm^2 (Silva, 2021). Tendo em conta o que foi descrito por Leek e colaboradores (Leek *et al.*, 2016), os esferoides deste tamanho podem, com grande probabilidade, desenvolver uma grande região necrótica, a qual pode influenciar a resposta dos esferoides tumorais aos tratamentos e levar a resultados pouco precisos.

Por estas razões, este projeto teve como um dos objetivos otimizar e estabelecer um modelo 3D de CaP que colmatasse as várias lacunas observadas nos modelos anteriores. No sentido de diminuir o tamanho dos esferoides, foram testadas várias concentrações iniciais, entre as 2 500 e as 20 000 células/esferoide, recorrendo ao método de *hanging drop*, já que este permite uma produção rápida de agregados celulares a três dimensões. No geral, todas as concentrações celulares formaram esferoides uniformes 24 horas após a formação das gotas. Contudo, 24 horas não foram suficientes para as concentrações de 2 500 e de 5 000 células/esferoide gerarem esferoides coesos, provavelmente devido ao facto de o número de células ser mais reduzido e, por isso, as células ficaram mais dispersas na gota, precisando de mais tempo para se agregarem e para estabelecerem as interações célula-célula.

Como a técnica de *hanging drop* não permitiu manter os esferoides em cultura por um longo período, as duas metodologias previamente utilizadas pela nossa equipa, o modelo de levitação magnética e a junção das técnicas de *hanging drop* e de levitação magnética, foram comparadas com outra metodologia, a cultura de sobreposição líquida, que tem tido cada vez mais sucesso na produção de esferoides de CaP para o estudo de agentes terapêuticos.

No modelo de levitação magnética, as células não foram capazes de se agregar nem de formar esferoides, o que pode ter acontecido como consequência da adição de um volume

inadequado da solução de nanopartículas ou por uma ligação ineficaz das nanopartículas às células, já que a eficiência da ligação varia consoante o tipo de células (Haisler *et al.*, 2013). Como foi utilizada uma placa não aderente, ou seja, sem qualquer tratamento, algumas células podem, mesmo assim, ter aderido ao fundo da placa em vez de se agregarem em estruturas 3D.

Os esferoides produzidos com a junção das técnicas de *hanging drop* e de levitação magnética foram visíveis macroscopicamente 24 horas após a formação das gotas, o que está em concordância com o que foi observado por Silva (Silva, 2021). A localização dos esferoides na periferia dos poços poderá ter ocorrido devido à adição do meio e à não aderência dos poços que facilitaram a sua deslocação. Apesar de inicialmente se terem formado esferoides coesos e compactos, com o passar do tempo foram-se desintegrando. A desintegração pode ter ocorrido devido, também, à ineficaz ligação das nanopartículas às células ou devido ao reduzido tempo em que a placa magnética de concentração foi colocada sob os esferoides, podendo não ter sido suficiente para assegurar o estabelecimento de conexões fortes entre as células. No entanto, o tempo de incubação com a placa de concentração não podia ser aumentado, pois promovia a aderência dos esferoides ao fundo dos poços das placas não aderentes. Sabe-se, ainda, que um dos fatores que influencia a produção de esferoides através da cultura de sobreposição líquida é a plataforma de cultura e o biomaterial que reveste a superfície (Costa *et al.*, 2018). Assim, a utilização de placas de baixa aderência, com um revestimento que promovesse a formação de esferoides, poderia constituir uma alternativa vantajosa.

Apesar de as técnicas anteriores não permitirem a realização dos ensaios pretendidos, devido à desintegração dos esferoides ao longo do tempo, permitiram verificar que a concentração ótima para o desenvolvimento de esferoides com o tamanho pretendido, ou seja, com um diâmetro inferior aos obtidos nos trabalhos prévios, era de 5 000 células/esferoide. Além disso, também permitiram constatar que as células necessitavam de uma incubação de 48 horas, após a sua distribuição pelos poços, de modo a produzir esferoides coesos.

Com o intuito de colmatar as lacunas encontradas, desenvolveram-se esferoides, a partir de 5 000 células, através da técnica de cultura de sobreposição líquida, em placas de baixa aderência específicas para o desenvolvimento de esferoides. De acordo com um estudo realizado com células de carcinoma hepatocelular HepG2, verificaram-se diferenças entre os esferoides cultivados em diferentes placas comercializadas para este efeito, especificamente entre as *Nunclon Sphera 3D plates* (ThermoFisher Scientific) e as *Corning® 96-well Black/Clear Round Bottom Ultra-Low Attachment (ULA) Spheroid Microplates* (ThermoFisher, 2020a). Assim, avaliou-se e comparou-se a evolução de esferoides de células PC3, ao longo de 10 dias, em dois tipos de placas específicas para cultura 3D, as *BIOFLOAT™ 96-well plates* e as *Corning® 96-well Black/Clear Round Bottom ULA Spheroid Microplates*, ambas de fundo redondo já que está comprovado que esta configuração geométrica leva à formação de agregados celulares com uma forma mais esférica (Costa *et al.*, 2018). Em geral, os esferoides produzidos nas duas placas formaram-se rapidamente, sendo possível visualizá-los macroscopicamente 24 horas depois da

colocação das células nos poços. Efetivamente, esta rápida agregação já tinha sido verificada, também, nos esferoides produzidos com o método de *hanging drop* e com a junção das técnicas de *hanging drop* e de levitação magnética, evidenciando que uma das características das células PC3 é a sua rápida agregação em estruturas 3D. Foi evidente, ao longo do tempo, que os esferoides produzidos nas placas ULA eram mais coesos, compactos e uniformes, principalmente os que foram produzidos na placa ULA da *Corning*[®], o que está de acordo com o que foi evidenciado por Pinto e colaboradores (B. Pinto *et al.*, 2020), que também verificaram que o uso de placas ULA permitia a obtenção de esferoides compactos, uniformes e reproduzíveis de longa duração, sem a formação de agregados celulares irregulares ao seu redor. O contraste observado entre os esferoides produzidos nas duas placas ULA pode estar relacionado com os diferentes revestimentos antiaderentes e as ligeiras diferenças entre as configurações geométricas dos poços.

Em síntese, os resultados evidenciaram que a cultura de sobreposição líquida era a técnica mais vantajosa, com recurso à placa ULA da *Corning*[®], pelo que foi este o modelo escolhido para o desenvolvimento de esferoides de CaP constituídos por células PC3. A forma arredondada e circular dos esferoides obtidos está em concordância com os estudos realizados por vários autores (Gottfried *et al.*, 2011; Härmä *et al.*, 2010; Uwada *et al.*, 2021), que também obtiveram esferoides de células PC3 com uma estrutura arredondada. Segundo Härmä e colaboradores (Härmä *et al.*, 2010), a exibição de uma estrutura mais redonda pode indicar a presença de contactos célula-célula muito robustos, devido à presença de proteínas responsáveis por *tight junctions*, pelo que poderá ser relevante estudar estes marcadores em estudos futuros. Porém, os esferoides obtidos a partir de células PC3 apresentaram uma superfície mais irregular do que os descritos em (ThermoFisher, 2020a) e (Härmä *et al.*, 2010), o que se poderá dever ao facto destes terem adicionado ao meio as matrizes extracelulares *Geltrex*[™] (Gibco, ThermoFisher Scientific) e *Matrigel*[®] (Corning), respetivamente, cuja função é auxiliar e facilitar a formação dos esferoides.

Os esferoides obtidos tinham, inicialmente, uma área de aproximadamente 1 mm² e um diâmetro de 1 mm, tendo aumentado de tamanho nos primeiros dias e estabilizado a partir do sexto dia. Este padrão de crescimento está em concordância com o reportado em (ThermoFisher, 2020a), onde esferoides, inicialmente com 5 000 células PC3, foram aumentando de tamanho até ao sétimo dia, tendo permanecido com um tamanho praticamente inalterado entre o sétimo e o nono dia. O aumento inicial do tamanho dos esferoides deve-se, provavelmente, à proliferação normal das células PC3, que se vão acumulando e agregando umas às outras. Porém, à medida que os esferoides vão crescendo, a capacidade dos nutrientes e do oxigénio chegarem à zona central do esferoide diminui, levando, conseqüentemente, ao desenvolvimento de *core* necrótico e hipóxico associado a uma diminuição da proliferação celular. As células da zona central dos esferoides, ao perderem capacidade proliferativa, juntamente com a sua crescente compactação, podem resultar na estabilização do tamanho dos

esferoides ou até na sua diminuição, esta última observada anteriormente pela nossa equipa (Silva, 2021; Tavares, 2019).

Em contrapartida, quando o mesmo modelo celular 3D foi aplicado à linha celular LNCaP, não foi possível obter esferoides uniformes e compactos como os que foram obtidos com as células PC3, o que significa que a forma, a morfologia e a estrutura dos esferoides não dependem só da técnica que é utilizada, mas também da linha celular. De facto, o mesmo já tinha sido observado em diversas experiências, tais como a realizada por Souza-Araújo e colaboradores (Souza-Araújo *et al.*, 2020) onde, utilizando o mesmo método de cultura 3D com diferentes linhas celulares, se obtiveram agregados celulares com diferentes formas e compacidades. De acordo com Lee e colaboradores (Lee *et al.*, 2013), as culturas 3D permitem que cada linha celular revele uma certa diferenciação histológica, mesmo depois de serem cultivadas em cultura 2D durante um longo período de tempo, pelo que a estrutura dos esferoides depende, sobretudo, da capacidade intrínseca das células se organizarem no seu “arranjo” final. Num outro estudo, a cultura de sobreposição líquida foi testada em 39 linhas celulares humanas, das quais apenas 26 foram capazes de gerar esferoides, reforçando que a capacidade das células se agregarem em estruturas tridimensionais usando esta técnica não é a mesma para todos os tipos de células (Costa *et al.*, 2018).

Apesar de não ter sido possível formar esferoides de células LNCaP com o mesmo modelo desenvolvido para as células PC3, foram encontrados na literatura alguns estudos em que a sua formação em placas ULA teve sucesso (Eder *et al.*, 2016; Mittler *et al.*, 2017; ThermoFisher, 2020a), sugerindo possíveis ajustes no modelo desenvolvido. As células LNCaP têm uma grande tendência para formar agregados, o que levou à formação de pequenos aglomerados dispersos no meio, logo após colocação das células nos poços, pelo que uma possível solução seria a centrifugação da placa para juntar as células no centro dos poços e ajudar a formar um único esferoide por cada poço. Outro parâmetro que deve ser otimizado é a concentração celular inicial, visto que ao reduzir o número de células que é colocado nos poços poderá diminuir a probabilidade de se formarem agregados dispersos. Por fim, pode ainda ser testada a adição de uma matriz extracelular ao meio de cultura, como a *Geltrex*[™] (Gibco, ThermoFisher Scientific) ou a *Matrigel*[®] (Corning), que estimulam o estabelecimento de interações fortes entre as células e, consequentemente, a coesão e a compactação dos esferoides.

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade do rádio-223, as células de CaP foram irradiadas tanto em cultura 2D como em cultura 3D, permitindo uma melhor correlação com os efeitos *in vivo*. Os efeitos do rádio-223 em culturas de células de metástases ósseas de cancro da mama e de osteoblastos e osteoclastos já tinham sido previamente avaliados por Suominen e colaboradores (Suominen *et al.*, 2013), após exposição *in vitro* a atividades volúmicas de 400, de 800 e de 1 600 Bq/mL do mesmo radiofármaco. Outros dois estudos *in vitro* avaliaram a resposta das linhas celulares de CaP C4-2B-BMP4, Myc-CaP-BMP4 e TRAMP-C2-BMP4 (Rojo *et al.*, 2021) e da linha celular PC3 (Paindelli *et al.*, 2019) às concentrações de rádio-223 de 0, de

50, de 100, de 200, de 400, de 800, de 1 600, de 3 200 e de 6 400 Bq/mL. Tendo em consideração estes estudos e experiências preliminares realizadas pelo nosso grupo de investigação, em que se testaram várias atividades volúmicas iniciais, foram escolhidas sete diferentes atividades de rádio-223, compreendidas entre os 55 e os 7 040 Bq/mL, para avaliar os efeitos citotóxicos deste radiofármaco em modelos celulares de CaP. De realçar que a atividade de dicloreto de rádio-223 atualmente administrada aos doentes com CPMRC é de 55 kBq por kg de massa corporal.

Os efeitos da irradiação com o rádio-223 na proliferação celular de células PC3 foram avaliados indiretamente pelo ensaio de SRB, um ensaio que permite medir o conteúdo proteico celular total e aferir, indiretamente, a proliferação celular. Foram avaliados os efeitos da irradiação com diferentes tempos de exposição, nomeadamente de 4, de 24 e de 48 horas. Os resultados obtidos mostraram, no geral, uma diminuição da proliferação celular com o aumento da atividade volúmica inicial à qual as culturas foram expostas, para todos os tempos de irradiação. Estes resultados estão em concordância com o que está descrito na literatura sobre os efeitos citotóxicos provocados pela exposição à radiação ionizante, cuja relação com a perda da capacidade de proliferação das células já foi comprovada em outros estudos (Marques, 2016; Mendes, 2016). Por exemplo, estudos realizados previamente no nosso laboratório demonstraram uma diminuição estatisticamente significativa da proliferação celular de células PC3 com o aumento da dose média até aos 20 mGy (Marques *et al.*, 2021; Silva, 2021). Também Paindelli e colegas (Paindelli *et al.*, 2019) verificaram uma redução no número de células PC3, cultivadas em 2D, em 20%, em 45% e em mais de 95% para as atividades de 200, de 400 e de 1 600 Bq/mL, respetivamente.

No entanto, é importante salientar que o decréscimo da proliferação celular apenas foi significativo quando as células foram irradiadas com uma atividade igual ou superior a 3 520 Bq/mL, independentemente do tempo de exposição. Tal como já foi referido, a radiação alfa, devido à sua elevada LET, é caracterizada por atuar diretamente nas biomoléculas e induzir quebras na dupla cadeia de ADN. A presença destas lesões conduz a mecanismos de reparação dos danos que, por sua vez, ativam vias de reparação do ADN, o que leva a um aumento da expressão de proteínas envolvidas nestas vias (Elgqvist *et al.*, 2016; Marques *et al.*, 2021). Como o ensaio de SRB mede o conteúdo proteico celular, o aumento da expressão das proteínas relacionadas com a reparação dos danos no ADN poderá ser um dos motivos que explicam os valores elevados de conteúdo proteico com as atividades volúmicas iniciais até aos 1 760 Bq/mL. A partir da irradiação com 3 520 Bq/mL, os mecanismos de reparação poderão ter perdido eficiência, devido ao aumento dos danos provocados nas células, o que levou a uma diminuição considerável do conteúdo proteico e, conseqüentemente, da proliferação celular. Por outro lado, esta tendência para o aumento do conteúdo proteico, quando as células são expostas a atividades mais baixas, pode estar relacionada com a resposta adaptativa, definida como a capacidade de as células expostas a baixas doses de radiação ionizante desenvolverem resistência aos efeitos da radiação, por exemplo, devido à ativação das vias de reparação do ADN e de regulação do ciclo celular (Guéguen *et al.*, 2019). Esta resposta adaptativa pode

justificar a capacidade de as células PC3 conseguirem reparar os danos induzidos pela exposição a atividades volúmicas iniciais até 1 760 Bq/mL, através dos vários mecanismos moleculares que são ativados.

Ademais, sabe-se que os efeitos induzidos pela exposição ao rádio-223 não são dependentes só da radioatividade a que as células são expostas, mas também da duração do período de exposição ao rádio-223 (Bannik *et al.*, 2019). De acordo com Liberal e colaboradores (Liberal *et al.*, 2022), existe uma maior probabilidade de recuperação das células após longa exposição ao rádio-223, o que foi evidenciado pelos resultados obtidos para atividades iguais ou inferiores a 1 760 Bq/mL, em que se observou uma ligeira tendência para o aumento da proliferação celular com o aumento do tempo de irradiação, nomeadamente entre as 24 e as 48 horas. Em contrapartida, na irradiação com uma atividade igual ou superior a 3 520 Bq/mL, observou-se a diminuição significativa da proliferação celular com o aumento do tempo de irradiação, principalmente entre as 4 e as 48 horas. Estes resultados podem também ser explicados com base na resposta adaptativa, ou seja, a longa exposição a atividades mais pequenas permite a reparação dos danos e o desenvolvimento de uma maior resistência à radiação ionizante, levando a um aumento da proliferação das células. Porém, a longa exposição a atividades mais elevadas provoca um grande número de lesões celulares, impedindo as células de ativarem eficientemente os mecanismos de reparação e, conseqüentemente, de se adaptarem à exposição ao rádio-223, levando a uma diminuição da proliferação celular (Bannik *et al.*, 2019; Guéguen *et al.*, 2019).

Tal como aconteceu com as células PC3, os resultados obtidos mostraram uma diminuição da proliferação celular das células LNCaP com o aumento da atividade volúmica inicial, a qual foi estatisticamente significativa para as três atividades administradas. Estes resultados são também semelhantes aos obtidos num estudo anteriormente realizado pelo nosso grupo, no qual se observou uma diminuição significativa da proliferação celular de células LNCaP com o aumento da dose, até aos 10 mGy (Marques *et al.*, 2021). Foi notório que a exposição das células LNCaP ao rádio-223 induziu, de um modo geral, uma maior diminuição na proliferação celular, comparativamente à das células PC3. Estes dados permitiram inferir, indiretamente, uma maior radiosensibilidade da linha celular LNCaP a este radiofármaco. Estes dados vão de encontro com estudos anteriormente realizados pelo nosso grupo, que determinaram que a dose letal média (DL₅₀) destas células era inferior à das células PC3, sendo por isso mais radiosensíveis (Marques, 2016; Marques *et al.*, 2021). A maior radiosensibilidade das células LNCaP poderá estar correlacionada com o facto destas células serem provenientes de gânglios linfáticos o que, juntamente com a dependência androgénica e o crescimento lento, indica que estas células são provavelmente originárias de um estágio mais inicial do CaP metastático, logo, menos agressivo e mais radiosensível. Pelo contrário, as células PC3 provêm de uma metástase óssea de CaP metastático de grau IV e não possuem dependência androgénica, logo, correspondem a um estágio muito avançado da doença e, conseqüentemente, mais agressivo e radorresistente (Namekawa *et al.*, 2019). De facto, também Pinto e colaboradores (C. Pinto *et al.*, 2020)

observaram uma maior radiosensibilidade de duas linhas celulares de CaP dependentes de androgénios, a LNCaP e a 22RV1, em comparação com uma linha celular independente de androgénios, a DU145. Esta particularidade pode ser importante a nível da aplicabilidade terapêutica do rádio-223, pois sugere a possibilidade de um melhor efeito antitumoral se este radiofármaco for administrado numa fase mais precoce da doença, aumentando a probabilidade de maior eficácia clínica (Marques, 2016).

Os efeitos induzidos pela exposição das células ao rádio-223 foram diferentes quando avaliados 5 ou 7 dias após a irradiação. No caso da linha celular PC3, o conteúdo proteico apresentou valores mais aumentados quando avaliado após 7 dias, do que os medidos após 5 dias. Na linha celular LNCaP ocorreu exatamente o oposto, ou seja, o conteúdo proteico teve tendência para diminuir ao fim de 7 dias em relação aos valores obtidos ao fim de 5 dias. Estas diferenças poderão ser explicadas com base na radiosensibilidade dos dois tipos de células. As células LNCaP, como são mais radiosensíveis, não conseguiram reparar os danos e, como consequência, ao fim dos 7 dias o conteúdo proteico diminuiu ainda mais. Em contrapartida, as células PC3, como são mais radiorresistentes, conseguiram recuperar dos danos, levando a um aumento do conteúdo proteico dos 5 dias para os 7 dias.

Os efeitos a longo prazo da exposição da linha celular PC3 ao rádio-223 foram também avaliados através do ensaio clonogénico, o qual permite estudar a capacidade das células sobreviverem e de formarem colónias, designada capacidade clonogénica. Corroborando os resultados obtidos anteriormente pela nossa equipa, verificou-se um decréscimo significativo na sobrevivência celular com o aumento da atividade, para as 4 horas e as 24 horas de irradiação. Tal como aconteceu com os resultados do ensaio de SRB, os do ensaio clonogénico estão igualmente em concordância com o que era expectável, já que está também comprovado que a exposição à radiação ionizante induz a perda da capacidade de sobrevivência das células (Marques, 2016; Mendes, 2016). A diminuição da sobrevivência celular induzida pela exposição a partículas alfa foi também determinada por vários autores, para a linha celular PC3 (Elgqvist *et al.*, 2016; Liberal *et al.*, 2022; J. Nilsson *et al.*, 2015), assim como para outras linhas celulares de tumores ósseos (Bannik *et al.*, 2019; Liberal *et al.*, 2022). A capacidade de sobrevivência das células demonstrou ser influenciada pelo tempo de exposição ao rádio-223, com as células PC3 a apresentarem uma menor capacidade de sobrevivência quando expostas durante 24 horas ao rádio-223, comparativamente à exposição durante 4 horas.

Em suma, os resultados dos efeitos radiobiológicos, avaliados em culturas celulares 2D, permitiram mostrar que o aumento da atividade inicial de rádio-223, assim como do tempo de exposição a este, induziu uma diminuição da capacidade proliferativa e de sobrevivência das células, o que faz sentido, já que ao deixarem de ser capazes de proliferar, deixam de conseguir formar colónias, levando, conseqüentemente, a uma redução da sobrevivência celular. Porém, ao contrário do que aconteceu no ensaio de SRB, em que o decréscimo da proliferação apenas foi estatisticamente significativo a partir dos 3 520 Bq/mL, no ensaio clonogénico o decréscimo

da sobrevivência foi significativo logo a partir da irradiação com 55 Bq/mL. Os valores elevados de conteúdo proteico celular até aos 1 760 Bq/mL poderão ser uma consequência da ativação dos mecanismos de reparação dos danos e aumento da expressão de certas proteínas, o que, no entanto, poderá não significar que as células estão a proliferar e a formar colónias, sendo uma possível explicação para a diminuição da sobrevivência celular logo a partir da irradiação com 55 Bq/mL.

Os efeitos radiobiológicos do rádio-223 foram, também, avaliados em culturas celulares 3D. Como os esferoides são estruturas tridimensionais, coesas e uniformes, a avaliação da citotoxicidade de agentes antitumorais é frequentemente analisada através das alterações no tamanho e na forma destas estruturas 3D (B. Pinto *et al.*, 2020). As imagens adquiridas mostram a progressiva desintegração e a diminuição do crescimento e do tamanho dos esferoides com o aumento da atividade inicial administrada. A desintegração ocorreu principalmente na região periférica dos esferoides, o que pode ser justificado pelo facto de ser a parte mais exposta à radiação alfa, que devido ao seu baixo poder de penetração, depositou grande parte da sua energia nas células da superfície dos esferoides. Quanto maior a atividade de rádio-223, maior o número de danos provocados nas células, o que já tinha sido evidenciado nos estudos em 2D e, conseqüentemente, maior perda das conexões célula-célula, levando à crescente desagregação das células (Marques *et al.*, 2018; Silva, 2021). Como as células se vão separando dos esferoides, estes vão ficando cada vez mais pequenos. A desagregação das células observou-se, principalmente, a partir da irradiação com 1 760 Bq/mL, o que está de acordo com os resultados obtidos na irradiação das células PC3 em cultura 2D, que mostraram uma diminuição muito significativa da sua capacidade proliferativa e clonogénica para atividades superiores a 1 760 Bq/mL. Este resultado já tinha sido observado num estudo recente realizado no nosso laboratório, em que a irradiação de esferoides de células PC3 com doses de 40 mGy também levou à sua desintegração, nomeadamente na periferia (Silva, 2021). Num outro estudo, desenvolvido por Brüningk e colaboradores (Brüningk *et al.*, 2020), esferoides de células de cancro do cólon foram irradiados com doses de 5 e de 20 Gy e analisados ao longo de 20 dias, tendo-se observado igualmente a desagregação das células na superfície dos esferoides e uma maior desintegração, quando expostos à maior dose.

Os gráficos da área, do perímetro e do diâmetro equivalente, obtidos com os softwares *ImageJ* e *AnaSP*, estão, de um modo geral, em concordância com as conclusões retiradas a partir das imagens dos esferoides. Observando a sua evolução ao longo dos dias, verificou-se que até ao quarto dia (1 dia após irradiação), todos os esferoides, irradiados e não irradiados, aumentaram de área, de perímetro e de diâmetro, ou seja, aumentaram de tamanho ao mesmo ritmo. Este comportamento dos esferoides foi também observado por Brüningk e colaboradores (Brüningk *et al.*, 2020) e poderá dever-se ao facto de, nos primeiros dias após irradiação, as células ativarem os mecanismos de reparação dos danos na tentativa de sobreviverem. Porém, os danos vão-se acumulando e nem todas as células são capazes de recuperar. As que acabam por morrer, libertam-se da superfície dos esferoides, contribuindo para a sua progressiva

desintegração ao longo do tempo. Este poderá ter sido um dos motivos para a diminuição do tamanho dos esferoides irradiados ter sido observada apenas a partir do sexto dia (3 dias após irradiação). Tal como constatado por Brüningk e colaboradores (Brüningk *et al.*, 2020), a diminuição destes três parâmetros foi mais acentuada quanto maior a atividade volúmica inicial, o que também tinha sido observado nas imagens de microscopia ótica.

Como era de esperar, os gráficos adquiridos no *ImageJ* e no *AnaSP* da área dos esferoides foram semelhantes, o que valida a utilização do programa de medição automática *AnaSP*. Em contrapartida, os gráficos do perímetro foram bastante diferentes, especificamente a partir do sexto dia, cujo gráfico adquirido no *AnaSP* mostrou uma evolução irregular do perímetro, sem qualquer relação com a atividade administrada. Esta irregularidade poderá estar relacionada com a etapa da segmentação e o estabelecimento incorreto do *threshold*, pois o programa *AnaSP* não consegue diferenciar entre as partes desintegradas, mais evidentes a partir do sexto dia, e o *core* dos esferoides, enquanto no *ImageJ* se realiza o delineamento manual apenas do *core* dos esferoides.

Os gráficos da circularidade adquiridos a partir do *ImageJ* e do *AnaSP* também foram bastante distintos, o que é justificável, tendo em conta que a circularidade depende do perímetro e os gráficos deste parâmetro diferiram entre os dois programas. De acordo com o gráfico do *ImageJ*, a circularidade foi diminuindo ao longo do tempo, até ao sétimo dia, começando depois a aumentar, ou seja, a ficar mais regular, até ao décimo dia. Porém, verificou-se que os esferoides irradiados foram os que apresentaram uma circularidade maior, isto é, mesmo havendo desintegração e perda de integridade, o *core* dos esferoides permaneceu aproximadamente circular. O gráfico do *AnaSP* mostrou a manutenção de uma forma praticamente circular de todos os esferoides, ao longo dos 10 dias, tendo havido apenas uma diminuição ligeira da circularidade dos esferoides irradiados com as atividades mais elevadas. De acordo com estudos já realizados, a circularidade está relacionada com a difusão de solutos, por exemplo, de oxigénio, tendo-se demonstrado que a uniformidade e a força de um gradiente de difusão são diretamente proporcionais à circularidade do esferoide (Leung *et al.*, 2015). Deste modo, seria de esperar que a irradiação dos esferoides levasse a uma diminuição da circularidade e, conseqüentemente, a um gradiente de difusão dos nutrientes e de oxigénio menos uniforme e mais fraco, provocando a morte das células. Todavia, um estudo realizado por Pinto e colaboradores (C. Pinto *et al.*, 2020) mostrou que a irradiação de esferoides de duas linhas celulares de CaP (22RV1 e DU145) não afetava a sua circularidade, pelo que esta questão é ainda controversa e são precisos mais estudos para esclarecer a influência do rádio-223 na circularidade dos esferoides. Para além da circularidade, o programa *AnaSP* estimou ainda a esfericidade dos esferoides, cujo comportamento foi equivalente ao da circularidade, como era de esperar.

A compacidade dos esferoides teve, inicialmente, uma tendência a diminuir. A partir do oitavo dia, aumentou nos esferoides controlo e nos irradiados com atividades mais baixas e

diminuiu nos esferoides irradiados com atividades mais altas. Estes resultados estão em concordância com o que tinha sido anteriormente concluído sobre o aumento da compactação dos esferoides não irradiados após uma primeira fase proliferativa, que leva à estabilização do seu tamanho. Estão ainda em concordância com a desintegração dos esferoides que foi mais evidente a partir do sétimo dia e a partir da irradiação com 1 760 Bq/mL, visto que quanto maior a desagregação das células, menos compactos ficam os esferoides.

Além do impacto que a exposição ao rádio-223 teve na estrutura e no crescimento dos esferoides, avaliou-se, também, se as alterações estavam relacionadas com a perda de viabilidade das células constituintes dos esferoides. Como num estudo anterior o ensaio XTT, que mede a atividade metabólica celular, revelou ser pouco sensível na deteção dos efeitos de grandes doses absorvidas (Silva, 2021), optou-se por realizar esta medição através do ensaio *CellTiter-Glo*[®] 3D. Este método é o mais adequado, sensível e reprodutível para determinar a viabilidade de esferoides de grande tamanho, como os que se obtiveram neste estudo. Com base nos resultados obtidos, verificou-se um decréscimo da viabilidade celular com o aumento da atividade administrada, confirmando a suposição inicial de que as células, ao perderem viabilidade, perdem a capacidade de intercomunicação e de se agregarem umas às outras, levando à desintegração dos esferoides. Estes resultados corroboram ainda o que se observou na irradiação das células PC3 em cultura 2D, dado que a perda da capacidade proliferativa e clonogénica está correlacionada com a perda da viabilidade.

De acordo com (Gottfried *et al.*, 2011), a indução de apoptose é uma das possíveis razões para a inibição do crescimento de esferoides após um determinado tratamento. Deste modo, com o objetivo de avaliar as vias de morte celular induzidas pelo rádio-223, recorreu-se à microscopia confocal com marcação dupla AnV/IP. As imagens obtidas não representam a estrutura completa dos esferoides, devido à sua elevada densidade que não permitiu que o laser atravessasse toda a sua estrutura. No entanto, considera-se que a análise de metade da estrutura, tal como já realizado por outros autores, seja representativa do restante esferoide (Leung *et al.*, 2015). A observação das imagens permitiu concluir que quanto maior a atividade inicial de rádio-223, maior o número de células apoptóticas e necróticas, logo, maior morte celular e menor viabilidade celular, corroborando os resultados obtidos no ensaio *CellTiter-Glo*[®] 3D. Como houve maior marcação com AnV do que com IP, significa que a irradiação com rádio-223 provocou a ativação de vias de morte celular, principalmente, por apoptose. Este tipo de morte também foi observado por outros autores que verificaram que a exposição a este radiofármaco aumenta significativamente os níveis de PARP-1 clivada, que é uma marca da indução de apoptose (Liberal *et al.*, 2022). Apesar dos esferoides controlo não terem sido expostos ao rádio-223, foi observada, também, alguma marcação tanto de células apoptóticas como de células necróticas, o que poderá dever-se ao seu tamanho e, em consequência, ao desenvolvimento de um *core* hipóxico e necrótico. Em síntese, a microscopia confocal evidenciou, com maior detalhe e resolução espacial, a maior desintegração e consequente diminuição do tamanho dos esferoides irradiados com as atividades mais elevadas.

Apesar da maioria das células dos esferoides não irradiados não terem apresentado grandes alterações morfológicas quando avaliadas através de coloração de *Giemsa*, observaram-se alguns sinais de apoptose precoce, o que está em concordância com a marcação de células apoptóticas observada nas imagens de microscopia confocal de esferoides não irradiados. Nas células de esferoides irradiados, foi observado um maior número de alterações morfológicas, comparando com as células controle, como por exemplo a presença de núcleos gigantes. Esta alteração morfológica corresponde a células paradas na fase G2/M e foi também reportada por Liberal e colaboradores (Liberal *et al.*, 2022), que verificaram um aumento muito significativo da percentagem de núcleos gigantes em células PC3 irradiadas com as doses de 0,5, de 1 e de 2 Gy de rádio-223. Observaram-se, de um modo geral, mais alterações morfológicas características de apoptose do que de necrose, permitindo concluir que a exposição ao rádio-223 provoca um aumento da morte celular, principalmente por apoptose, e a consequente diminuição da viabilidade celular, corroborando os resultados obtidos com a microscopia confocal e com o ensaio *CellTiter-Glo*® 3D. Estes resultados, obtidos a partir das culturas 3D, estão ainda de acordo com os resultados de um estudo recente, realizado pela nossa equipa, em que também foi observado um maior número de alterações morfológicas relacionadas com a apoptose em duas linhas celulares de CaP (PC3 e LNCaP), cultivadas em 2D e irradiadas com elevadas doses de rádio-223 (Marques *et al.*, 2021). Foi ainda detetada a presença de micronúcleos em células de esferoides irradiados, o que está em conformidade com os possíveis efeitos da radiação alfa. Os micronúcleos resultam da fragmentação dos cromossomas, que pode ser causada por mutações, as quais, por sua vez, podem surgir através da interação da radiação ionizante com o ADN (Mohr *et al.*, 2021). O rádio-223 emite principalmente radiação alfa, que está associada aos efeitos diretos e, por isso, interage com o ADN das células, podendo levar a mutações (Marques *et al.*, 2018), logo, era expectável a produção dos micronúcleos após exposição dos esferoides ao rádio-223.

No geral, os resultados obtidos na irradiação de culturas 2D e de culturas 3D de CaP estão em concordância, tendo-se observado um aumento dos efeitos citotóxicos com o aumento da atividade de rádio-223. Contudo, o aumento da desintegração e a diminuição da viabilidade celular dos esferoides de células PC3 não foram tão acentuados como a diminuição da sobrevivência celular destas células cultivadas em 2D. Estas diferenças nos efeitos radiobiológicos determinados eram, em parte, expectáveis, tendo em conta o que está descrito na literatura, nomeadamente o facto de que as mesmas células, quando organizadas em estruturas 3D, apresentam uma maior resistência à terapêutica e uma resposta molecular diferente. As células PC3 cultivadas em estruturas 3D apresentaram, assim, uma menor sensibilidade ao rádio-223. Isto poderá estar também relacionado com o facto das partículas alfa apenas conseguirem penetrar cerca de 100 μm nos tecidos biológicos e, como os esferoides produzidos apresentavam diâmetros superiores a 1 mm, as partículas não conseguiram alcançar todas as células constituintes dos esferoides. Em contraste, as células PC3 cultivadas em monocamada ficaram todas igualmente expostas ao rádio-223, levando a uma maior

citotoxicidade. O aumento da radiorresistência das células quando em estruturas 3D contribui para uma mimetização mais realista da resposta *in vivo* aos radiofármacos (B. Pinto *et al.*, 2020).

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

Este projeto teve como principal objetivo estudar os efeitos radiobiológicos do rádio-223 em modelos celulares de cancro da próstata (CaP), com especial interesse em culturas celulares 3D. Para tal, foi utilizado e otimizado um modelo celular 3D de CaP com recurso à cultura de sobreposição líquida em placas de baixa aderência, em específico em placas ULA (*Corning*®), sendo um método simples de executar e que permitiu a rápida obtenção de esferoides compactos, coesos, uniformes e reproduzíveis de células PC3. Os esferoides desenvolvidos por esta metodologia mantiveram-se em cultura durante 10 dias sem se desintegrarem, permitindo realizar ensaios a longo prazo com o radiofármaco rádio-223. Para além disso, apresentaram uma forma aproximadamente circular, com aumento progressivo do tamanho até ao sexto dia de formação, a partir do qual estabilizou. Porém, os esferoides que se formaram têm ainda um tamanho demasiado grande que pode levar ao desenvolvimento de um *core* hipóxico e necrótico, o qual deverá ser estudado e aprofundado em estudos futuros para verificar a sua existência. A aplicação da mesma metodologia para o desenvolvimento de esferoides constituídos por células LNCaP não foi desenvolvida com sucesso, pois não se conseguiram formar esferoides únicos, tendo as células ficado dispersas nos poços em pequenos agregados. Assim, existe a necessidade de, no futuro, otimizar o modelo para esta linha celular.

A avaliação dos efeitos radiobiológicos mostrou que, em geral, a exposição a atividades de rádio-223 entre 55 e 7 040 Bq/mL induziu uma diminuição na proliferação, na viabilidade e na sobrevivência celular, induzindo morte celular principalmente por apoptose. Estes efeitos foram corroborados em ambos os modelos celulares, ou seja, quer quando avaliados em 2D quer em 3D. Em específico, a irradiação de células PC3 e LNCaP, cultivadas em 2D, provocou uma diminuição da proliferação celular, que se acentuou com o aumento da atividade volúmica inicial de rádio-223 e com o aumento do tempo de irradiação. No caso da linha celular PC3, esta diminuição apenas foi significativa a partir da irradiação com 3 520 Bq/mL, enquanto na linha celular LNCaP a diminuição foi significativa para a irradiação com todas as atividades volúmicas de radiofármaco. Além disso, no geral, a proliferação celular das células LNCaP foi sempre inferior à das células PC3, quando expostas às mesmas condições de irradiação, o que permitiu concluir que a linha celular LNCaP é a mais radiosensível ao rádio-223. Estas diferenças na radiosensibilidade poderão estar relacionadas com a origem das duas linhas celulares, já que provém de diferentes metástases e de diferentes estádios de CaP. Para além das metástases ósseas, será relevante estudar a possível aplicabilidade do rádio-223, também, no tratamento de metástases linfáticas de cancro da próstata metastático resistente à castração (CPMRC), de onde derivam as células LNCaP.

Os resultados do ensaio clonogénico com a linha celular PC3, cultivada em 2D, foram concordantes com os resultados do ensaio de SRB, tendo-se observado também uma diminuição da sobrevivência celular com o aumento da atividade de rádio-223 e do tempo de irradiação. Assim, a irradiação de células PC3 com rádio-223 levou à perda da capacidade proliferativa e clonogénica.

A avaliação em estruturas 3D mostrou que a exposição dos esferoides de células PC3 ao rádio-223 provoca a progressiva desintegração dos esferoides ao longo do tempo e, consequentemente, a diminuição da compacidade, da área, do perímetro e do diâmetro equivalente. Relativamente à circularidade e à esfericidade, não houve alterações muito significativas após irradiação com o rádio-223, sendo necessário aprofundar o impacto deste radiofármaco na forma dos esferoides. A desintegração dos esferoides foi tanto maior quanto maior a atividade volúmica inicial de rádio-223 adicionada e observou-se, principalmente, na região periférica, provavelmente devido à maior exposição desta região à radiação ionizante emitida pelo rádio-223. Ao avaliar a viabilidade e a morte celular, verificou-se que a desagregação dos esferoides e a inibição do seu crescimento estavam relacionadas com a perda de viabilidade e com a morte das células, visto que se observou um decréscimo da viabilidade celular e um aumento dos eventos celulares de morte por apoptose e por necrose com o aumento da atividade volúmica inicial de rádio-223. Efetivamente, foi notório um maior número de alterações morfológicas nas células dos esferoides irradiados, principalmente características de morte celular por apoptose, corroborando os resultados obtidos com a marcação dupla AnV/IP.

Tendo em conta que o tamanho dos esferoides apenas estabilizou a partir do sexto dia de formação, seria interessante testar a irradiação dos esferoides neste dia em vez de irradiar no segundo dia de formação e depois comparar os resultados e verificar se existem diferenças significativas entre as duas estratégias. Outra estratégia pertinente seria a administração do rádio-223 em doses fracionadas ao longo de um período temporal, para avaliar a capacidade das células de CaP repararem os danos e simular de uma forma mais real o plano de tratamento dos doentes com CPMRC.

Ao comparar os efeitos do rádio-223 entre os modelos celulares 2D e 3D de CaP, é possível inferir que, de um modo geral, estão em conformidade. No entanto, os esferoides de células PC3 foram mais radorresistentes ao rádio-223 do que as células PC3 cultivadas em monocamada, o que se poderá dever ao baixo poder de penetração das partículas alfa, tornando estas estruturas 3D numa representação mais realista do microambiente *in vivo* que as partículas alfa percorrem.

Em suma, os resultados obtidos demonstraram que o rádio-223 teve um efeito terapêutico nos esferoides de cancro da próstata, para toda a gama de atividades volúmicas, sugerindo que mesmo usando uma atividade mais baixa, esta pode ser suficiente para alcançar uma boa eficácia terapêutica, o que poderá contribuir para a redução da atividade de rádio-223 que é administrada aos doentes e, consequentemente, dos efeitos secundários.

Assim, um dos objetivos futuros será determinar as doses de rádio-223 absorvidas pelas células com base na atividade volúmica inicial adicionada, tendo em conta o volume dos poços e o tempo de irradiação. Uma das opções é o cálculo da dose absorvida média usando o formalismo MIRD, desenvolvido pelo *Committee on Medical Internal Radiation Dose* (Bolch et

al., 2009) e comparar com os valores de dose calculados pela equação do cálculo de dose, desenvolvida anteriormente pelo nosso grupo (Marques *et al.*, 2021). Poderão também ser utilizados programas que modelam a distribuição dos radiofármacos em estruturas 3D (esferoides, organoides, tecidos, entre outros) e, através de simulações de Monte Carlo, calculam a dose absorvida, tais como o programa TOPAS Monte Carlo, o *software* MIRDCell e o *software* SRIM/TRIM.

Tendo em conta os resultados obtidos até à data, uma das principais perspetivas futuras deste projeto será o desenvolvimento de culturas heterotípicas de CaP, constituídas pelas células tumorais e por um ou mais tipos de células do estroma, cuja função é suportar o tecido tumoral, a fim de alcançar uma organização espacial mais semelhante ao microambiente tumoral do nicho metastático de CaP. Por exemplo, a linha celular PC3 poderá ser cultivada juntamente com linhas celulares de osteoblastos, fibroblastos e células endoteliais para mimetizar o microambiente das metástases ósseas de CaP. Contudo, as culturas heterotípicas são muito mais complexas e desafiantes de estabelecer, pois tem de se ter em conta as particularidades específicas de cada linha celular utilizada, nomeadamente das células não tumorais.

Apesar de estar comprovado que a terapia com rádio-223 aumenta o tempo de sobrevivência e a qualidade de vida dos doentes com CPMRC, esta patologia está ainda associada a um prognóstico muito desfavorável. Os avanços na compreensão do CPMRC e do mecanismo de ação do rádio-223 poderão levar ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas baseadas na combinação do rádio-223 com outros tratamentos, com o objetivo de aumentar a eficiência e a aplicabilidade deste radiofármaco, tão promissor. Já foram propostas algumas estratégias de combinação de tratamentos, mais especificamente a combinação do rádio-223 com terapias hormonais, como o acetato de abiraterona e a enzalutamida, com agentes de quimioterapia, como o docetaxel, com imunoterapias, como o atezolizumab e o sipuleucel-T, e com inibidores da reparação dos danos no ADN, como o niraparib e o olaparib (M. Morris *et al.*, 2019). Os ensaios atualmente a decorrer com estas combinações são apenas preliminares, pelo que, no futuro, será uma mais valia estudar os seus mecanismos e efeitos em culturas heterotípicas, não só de cancro da próstata, mas também de outros cancros que metastizam frequentemente para os ossos.

7. Bibliografia

- Aaron, L., Franco, O. E., & Hayward, S. W. (2016). Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urologic Clinics of North America*, 43(3), 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2016.04.012>
- Abou, D. S., Ulmert, D., Doucet, M., Hobbs, R. F., Riddle, R. C., & Thorek, D. L. J. (2015). Whole-Body and Microenvironmental Localization of Radium-223 in Naïve and Mouse Models of Prostate Cancer Metastasis. *Journal of the National Cancer Institute*, 108(5), djv380. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv380>
- American Cancer Society. (2014). *The Science Behind Radiation Therapy*. 5–6(01), 3–9. <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/radiation/basics.html>
- American Cancer Society. (2022). *Treating Prostate Cancer*. <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/treating.html>
- ATCC. (2021a). *LNCaP clone FGC CRL-1740™*. <https://www.atcc.org/products/crl-1740>
- ATCC. (2021b). *PC-3 CRL-1435™*. <https://www.atcc.org/products/crl-1435>
- Bahl, A. (2013). Metastatic castration-resistant prostate cancer. Part 1: the challenges of the disease and its treatment. *European Journal of Oncology Nursing*, 17(SUPPL.1), S1–S6. [https://doi.org/10.1016/S1462-3889\(14\)70002-X](https://doi.org/10.1016/S1462-3889(14)70002-X)
- Bannik, K., Madas, B., Jarzombek, M., Sutter, A., Siemeister, G., Mumberg, D., & Zitzmann-Kolbe, S. (2019). Radiobiological effects of the alpha emitter Ra-223 on tumor cells. *Scientific Reports*, 9(1), 18489. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54884-7>
- Barbeau, J. (2018). *Why Are Prostate Cancer Preclinical Models Hard to Develop?* <https://blog.crownbio.com/prostate-cancer-preclinical-models>
- Barcia, J. J. (2007). The Giemsa Stain: Its History and Applications. *International Journal of Surgical Pathology*, 15(3), 292–296. <https://doi.org/10.1177/1066896907302239>
- Beyzadeoglu, M., Ozyigit, G., & Ebruli, C. (2010). *Basic Radiation Oncology*.
- Bleloch, J. (2020). *Clonogenic assay: what, why and how*. <https://cytosmart.com/resources/clonogenic-assay-what-why-how>
- Bleloch, J. (2021). Cell Culture Basics: Equipment, Fundamentals and Protocols. *Technology Networks*. <https://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/cell-culture-basics-equipment-fundamentals-and-protocols-348413>
- Body, J., Casimiro, S., & Costa, L. (2015). Targeting bone metastases in prostate cancer: improving clinical outcome. *Nature Reviews Urology*, 12(6), 340–356. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2015.90>
- Bolch, W. E., Eckerman, K. F., Sgouros, G., & Thomas, S. R. (2009). MIRD Pamphlet No. 21: A Generalized Schema for Radiopharmaceutical Dosimetry—Standardization of Nomenclature. *Journal of Nuclear Medicine*, 50(3), 477–484. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.056036>
- Borley, N., & Feneley, M. R. (2009). Prostate cancer: diagnosis and staging. *Asian Journal of Andrology*, 11(1), 74–80. <https://doi.org/10.1038/aja.2008.19>
- Bortfeld, T., & Jeraj, R. (2011). The physical basis and future of radiation therapy. *The British Journal of Radiology*, 84(1002), 485–498. <https://doi.org/10.1259/bjr/86221320>
- Boskey, A. L. (2013). Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug

- effects. *BoneKEy Reports*, 2(September), 1–11. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.181>
- 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>
- Bruland, O., Jonasdottir, T., Fisher, D., & Larsen, R. (2008). Radium-223: From Radiochemical Development to Clinical Applications in Targeted Cancer Therapy. *Current Radiopharmaceuticalse*, 1(3), 203–208. <https://doi.org/10.2174/1874471010801030203>
- 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), 1653. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58569-4>
- Calais da Silva, F. (2013). *Recomendações Clínicas no Tratamento do Carcinoma da Próstata* (1ª Edição).
- Caleffi, J. T., Aal, M. C. E., Gallindo, H. de O. M., Caxali, G. H., Crulhas, B. P., Ribeiro, A. O., Souza, G. R., & Delella, F. K. (2021). Magnetic 3D cell culture: State of the art and current advances. *Life Sciences*, 286(June), 120028. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120028>
- Camus, V. L., Stewart, G., Nailon, W. H., McLaren, D. B., & Campbell, C. J. (2016). Measuring the effects of fractionated radiation therapy in a 3D prostate cancer model system using SERS nanosensors. *The Analyst*, 141(17), 5056–5061. <https://doi.org/10.1039/C6AN01032F>
- Cardoso, M. R. J. (2013). *The Role of Hoxb13 in Prostate Cancer*.
- Carvalho, F. P. (2011). *As descobertas científicas de Marie Curie e o seu legado à ciência e à humanidade*. <https://proa.ua.pt/index.php/captar/article/view/14440>
- Carvalho, M. (2016). *Modelos de cultura celular para rastreio de fármacos*. Universidade da Beira Interior.
- Chandrasekar, T., Yang, J. C., Gao, A. C., & Evans, C. P. (2015). Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Translational Andrology and Urology*, 4(3), 365–380. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2015.05.02>
- Chazotte, B. (2011). Labeling Nuclear DNA Using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(1), pdb.prot5556. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5556>
- Clark, C. (1987). Physicians, Reformers and Occupational Disease. *Women & Health*, 12(2), 147–167. https://doi.org/10.1300/J013v12n02_08
- Costa, E. C., de Melo-Diogo, D., Moreira, A. F., Carvalho, M. P., & Correia, I. J. (2018). Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches. *Biotechnology Journal*, 13(1), 1700417. <https://doi.org/10.1002/biot.201700417>
- Costa, E. C., Gaspar, V. M., Coutinho, P., & Correia, I. J. (2014). Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(8), 1672–1685. <https://doi.org/10.1002/bit.25210>
- Crouch, S. P. M., Kozlowski, R., Slater, K. J., & Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 160(1), 81–88. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90011-U](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90011-U)

- Croucher, P. I., McDonald, M. M., & Martin, T. J. (2016). Bone metastasis: the importance of the neighbourhood. *Nature Reviews Cancer*, 16(6), 373–386. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.44>
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., & Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(11), pdb.prot087288. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288>
- Donya, M., Radford, M., ElGuindy, A., Firmin, D., & Yacoub, M. H. (2014). Radiation in medicine: Origins, risks and aspirations. *Global Cardiology Science and Practice*, 2014(4), 57. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2014.57>
- Dunn, M. W., & Kazer, M. W. (2011). Prostate cancer overview. *Seminars in Oncology Nursing*, 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. (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*, 17(9), 1458. <https://doi.org/10.3390/ijms17091458>
- Elgqvist, J., Timmermand, O. V. ihelmsso., Larsson, E., & Strand, S.-E. (2016). Radiosensitivity of Prostate Cancer Cell Lines for Irradiation from Beta Particle-emitting Radionuclide ¹⁷⁷Lu Compared to Alpha Particles and Gamma Rays. *Anticancer Research*, 36(1), 103–109. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26722033>
- Elliott, A. D. (2020). Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Current Protocols in Cytometry*, 92(1), 1–11. <https://doi.org/10.1002/cpcy.68>
- European Medicines Agency. (2013). *XOFIGO - RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xofigo-epar-product-information_pt.pdf
- Fitzgerald, K. A., Guo, J., Tierney, E. G., Curtin, C. M., Malhotra, M., Darcy, R., O'Brien, F. J., & O'Driscoll, C. M. (2015). The use of collagen-based scaffolds to simulate prostate cancer bone metastases with potential for evaluating delivery of nanoparticulate gene therapeutics. *Biomaterials*, 66, 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.07.019>
- Flowers, P., Robinson, W. R., Langley, R., & Theopold, K. (2015). *Chemistry*. OpenStax. <https://openstax.org/books/chemistry/pages/1-introduction>
- Fontana, F., Marzagalli, M., Sommariva, M., Gagliano, N., & Limonta, P. (2021). In Vitro 3D Cultures to Model the Tumor Microenvironment. *Cancers*, 13(12), 2970. <https://doi.org/10.3390/cancers13122970>
- 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), 6806. <https://doi.org/10.3390/ijms21186806>
- Forshier, S. (2009). *Essentials of Radiation, Biology and Protection*. CENGAGE Learning.
- Frieling, J. S., Basanta, D., & Lynch, C. C. (2015). Current and Emerging Therapies for Bone Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Control*, 22(1), 109–120. <https://doi.org/10.1177/107327481502200114>
- Fujita, K., & Nonomura, N. (2019). Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *The*

- World Journal of Men's Health*, 37(3), 288. <https://doi.org/10.5534/wjmh.180040>
- Furesi, G., Rauner, M., & Hofbauer, L. C. (2021). Emerging Players in Prostate Cancer–Bone Niche Communication. *Trends in Cancer*, 7(2), 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.09.006>
- Ghafoor, S., Burger, I. A., & Vargas, A. H. (2019). Multimodality Imaging of Prostate Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, 60(10), 1350–1358. <https://doi.org/10.2967/jnumed.119.228320>
- GLOBOCAN. (2020a). *Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2020, males, all ages (excl. NMSC)*. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars-2?v=2020&mode=cancer&mode_population=regions&population=250&populations=900&key=asr&sex=1&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&g
- GLOBOCAN. (2020b). *Prostate*. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/27-Prostate-fact-sheet.pdf>
- GLOBOCAN. (2020c). *World*. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>
- Goldsmith, S. J. (2020). Targeted Radionuclide Therapy: A Historical and Personal Review. *Seminars in Nuclear Medicine*, 50(1), 87–97. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2019.07.006>
- Good, J. S., & Harrington, K. J. (2013). The Hallmarks of Cancer and the Radiation Oncologist: Updating the 5Rs of Radiobiology. *Clinical Oncology*, 25(10), 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2013.06.009>
- Gottfried, E., Rogenhofer, S., Waibel, H., Reichle, A., Wehrstein, M., Peuker, A., & Peter, K. (2011). *Pioglitazone modulates tumor cell metabolism and proliferation in multicellular tumor spheroids*. 117–126. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1294-0>
- Guéguen, Y., Bontemps, A., & Ebrahimian, T. G. (2019). Adaptive responses to low doses of radiation or chemicals: their cellular and molecular mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(7), 1255–1273. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2987-5>
- Gunderman, R. B., & Gonda, A. S. (2015). Radium Girls. *Radiology*, 274(2), 314–318. <https://doi.org/10.1148/radiol.14141352>
- Haberkorn, U., Eder, M., Kopka, K., Babich, J. W., & Eisenhut, M. (2016). New Strategies in Prostate Cancer: Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Ligands for Diagnosis and Therapy. *Clinical Cancer Research*, 22(1), 9–15. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0820>
- 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>
- Hapach, L. A., Mosier, J. A., Wang, W., & Reinhart-King, C. A. (2019). Engineered models to parse apart the metastatic cascade. *Npj Precision Oncology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s41698-019-0092-3>
- Härmä, V., Virtanen, J., Mäkelä, R., Happonen, A., Mpindi, J.-P., Knuuttila, 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), e10431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010431>
- Harris, W. P., Mostaghel, E. A., Nelson, P. S., & Montgomery, B. (2009). Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nature Clinical Practice Urology*, 6(2), 76–85. <https://doi.org/10.1038/ncpuro1296>
- Henriques, D. M. (2018). *RÁDIO-223 - TRATAMENTO DE METÁSTASES ÓSSEAS DO CARCINOMA DA PRÓSTATA*. Universidade de Coimbra.
- Huggins, C., & Hodges, C. V. (1941). Studies on Prostatic Cancer: I. The Effect of Castration, Of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 22(4), 232–240. <https://doi.org/10.3322/canjclin.22.4.232>
- Ingrosso, G., Detti, B., Scartoni, D., Lancia, A., Giacomelli, I., Baki, M., Carta, G., Livi, L., & Santoni, R. (2018). Current therapeutic options in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Seminars in Oncology*, 45(5–6), 303–315. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2018.10.001>
- Ittmann, M. (2018). Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(5), a030346. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030346>
- Jadvar, H., & Quinn, D. I. (2013). Targeted α -Particle Therapy of Bone Metastases in Prostate Cancer. *Clinical Nuclear Medicine*, 38(12), 966–971. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000000290>
- Jönsson, B.-A. (2021). Henri Becquerel's discovery of radioactivity – 125 years later. *Physica Medica*, 87(March), 144–146. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2021.03.032>
- Joshua, A. M., Evans, A., Van der Kwast, T., Zielenska, M., Meeker, A. K., Chinnaiyan, A., & Squire, J. A. (2008). Prostatic preneoplasia and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1785(2), 156–181. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.12.001>
- Katsogiannou, M., Ziouziou, H., Karaki, S., Andrieu, C., Henry de Villeneuve, M., & Rocchi, P. (2015). The hallmarks of castration-resistant prostate cancers. *Cancer Treatment Reviews*, 41(7), 588–597. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.05.003>
- Kelm, J. M., Timmins, N. E., Brown, C. J., Fussenegger, M., & Nielsen, L. K. (2003). Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(2), 173–180. <https://doi.org/10.1002/bit.10655>
- Kelsey, C., Heints, P., Chambers, G., Sandoval, D., Adolphi, N., & Paffett, K. (2014). *Radiation Biology of Medical Imaging*. WILEY Publishers.
- Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., & Sivas, H. (2017). Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. In *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (pp. 271–297). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8>
- Kuřakowski, A. (2011). The contribution of Marie Skłodowska-Curie to the development of modern oncology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(6), 1583–1586. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4712-1>
- Lee, J. M., Mhawech-Fauceglia, P., Lee, N., Cristina Parsanian, L., Gail Lin, Y., Andrew Gayther, S., & Lawrenson, K. (2013). A three-dimensional microenvironment alters protein

- expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro. *Laboratory Investigation*, 93(5), 528–542. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.41>
- Leek, R., Grimes, D. R., Harris, A. L., & McIntyre, A. (2016). *Methods: Using Three-Dimensional Culture (Spheroids) as an In Vitro Model of Tumour Hypoxia* (pp. 167–196). https://doi.org/10.1007/978-3-319-26666-4_10
- Leenhardt, R., Camus, M., Mestas, J. L., Jeljeli, M., Abou Ali, E., Chouzenoux, S., Bordacahar, B., Nicco, C., Batteux, F., Lafon, C., & Prat, F. (2019). Ultrasound-induced Cavitation enhances the efficacy of Chemotherapy in a 3D Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma with its microenvironment. *Scientific Reports*, 9(1), 18916. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55388-0>
- Leung, B. M., Leshner-Perez, S. C., Matsuoka, T., Moraes, C., & Takayama, S. (2015). Media additives to promote spheroid circularity and compactness in hanging drop platform. *Biomaterials Science*, 3(2), 336–344. <https://doi.org/10.1039/C4BM00319E>
- Lewis, B., Chalhoub, E., Chalouhy, C., & Sartor, O. (2015). Radium-223 in Bone-Metastatic Prostate Cancer: Current Data and Future Prospects. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 29(7), 483–488. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26178336>
- Liberal, F. D. C., Moreira, H., Redmond, K. M., O’Sullivan, J. M., Alshehri, A. H. D., Wright, T. C., Dunne, V. L., Campfield, C., Biggart, S., McMahon, S. J., & Prise, K. M. (2022). Differential responses to 223Ra and Alpha-particles exposure in prostate cancer driven by mitotic catastrophe. *Frontiers in Oncology*, 12(July), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.877302>
- Liepe, K., & Shinto, A. (2016). From palliative therapy to prolongation of survival: 223 RaCl 2 in the treatment of bone metastases. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 8(4), 294–304. <https://doi.org/10.1177/1758834016640494>
- Litwin, M. S., & Tan, H.-J. (2017). The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer. *JAMA*, 317(24), 2532. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7248>
- Louis, K. S., & Siegel, A. C. (2011). *Mammalian Cell Viability* (M. J. Stoddart (ed.); Vol. 740, Issue 1). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6>
- Marques, I. (2016). *Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático - Estudo dos mecanismos de atuação*. Universidade de Coimbra.
- Marques, I., 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>
- Marques, I., Neves, A. R., Abrantes, A. M., Pires, A. S., Tavares-da-Silva, E., Figueiredo, A., & Botelho, M. F. (2018). Targeted alpha therapy using Radium-223: From physics to biological effects. *Cancer Treatment Reviews*, 68(May), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.05.011>
- Mazeron, J. J., & Gerbaulet, A. (1999). Le centenaire de la découverte du radium. *Cancer/Radiothérapie*, 3(1), 19–29. [https://doi.org/10.1016/S1278-3218\(99\)80031-6](https://doi.org/10.1016/S1278-3218(99)80031-6)
- Mendes, F. J. (2016). *Caraterização celular e molecular dos efeitos da radiação em neoplasias - Estudo experimental em linfoma e carcinoma do pulmão de pequenas células*. Universidade

de Coimbra.

- Metzger, W., Sossong, D., Bächle, A., Pütz, N., Wennemuth, G., Pohlemann, T., & Oberringer, M. (2011). The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. *Cytotherapy*, *13*(8), 1000–1012. <https://doi.org/10.3109/14653249.2011.583233>
- Minniti, G., Goldsmith, C., & Brada, M. (2012). Radiotherapy. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 104, pp. 215–228). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52138-5.00016-5>
- Mittler, F., Obeid, 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*, *7*(DEC). <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00293>
- Mohr, L., Toufektchan, E., von Morgen, P., Chu, K., Kapoor, A., & Maciejowski, J. (2021). ER-directed TREX1 limits cGAS activation at micronuclei. *Molecular Cell*, *81*(4), 724–738.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.037>
- Moreira, H. (2020). *Investigating the mechanisms of α -particle therapy in prostate cancer*. Universidade Nova de Lisboa.
- Moreira, H., Guerra Liberal, F. D. C., O’Sullivan, J. M., McMahon, S. J., & Prise, K. M. (2019). Mechanistic Modeling of Radium-223 Treatment of Bone Metastases. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, *103*(5), 1221–1230. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.12.015>
- Morris, M., 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>
- Morris, P., & Perkins, A. (2012). Diagnostic imaging. *The Lancet*, *379*(9825), 1525–1533. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60429-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60429-2)
- Munshi, A., Hobbs, M., & Meyn, R. E. (2005). IN VITRO MEASURES OF CHEMOSENSITIVITY Clonogenic Cell Survival Assay. *Methods in Molecular Biology*, *110*, 20–28.
- Munteanu, V. C., Munteanu, R. A., Onaciu, A., Berindan-Neagoe, I., Petrut, B., & Coman, I. (2020). MiRNA-Based Inspired Approach in Diagnosis of Prostate Cancer. *Medicina*, *56*(2), 94. <https://doi.org/10.3390/medicina56020094>
- Namekawa, T., Ikeda, K., Horie-Inoue, K., & Inoue, S. (2019). Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells. *Cells*, *8*(1), 74. <https://doi.org/10.3390/cells8010074>
- Naskar, N., & Lahiri, S. (2021). Theranostic Terbium Radioisotopes: Challenges in Production for Clinical Application. *Frontiers in Medicine*, *8*(May), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.675014>
- National Cancer Institute. (2021). *Prostate Cancer Prevention (PDQ®)—Patient Version*. <https://www.cancer.gov/types/prostate/patient/prostate-prevention-pdq#section/all>
- Nilsson, J., Bauden, M. P., Nilsson, J., Strand, S.-E., & Elgqvist, J. (2015). Cancer Cell Radiobiological Studies Using In-House-Developed α -Particle Irradiator. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, *30*(9), 386–394. <https://doi.org/10.1089/cbr.2015.1895>
- Nilsson, S. (2016). Radionuclide Therapies in Prostate Cancer: Integrating Radium-223 in the

- Treatment of Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Current Oncology Reports*, 18(2), 14. <https://doi.org/10.1007/s11912-015-0495-4>
- Orellana, E., & Kasinski, A. (2016). Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *BIO-PROTOCOL*, 6(21). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1984>
- Packer, J. R., & Maitland, N. J. (2016). The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(6), 1238–1260. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.02.016>
- Paindelli, C., Navone, N., Logothetis, C. J., Friedl, P., & Dondossola, E. (2019). Engineered bone for probing organotypic growth and therapy response of prostate cancer tumoroids in vitro. *Biomaterials*, 197(January), 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.01.027>
- Pallwein, L., Mitterberger, M., Pelzer, A., Bartsch, G., Strasser, H., Pinggera, G. M., Aigner, F., Gradl, J., zur Nedden, D., & Frauscher, F. (2008). Ultrasound of prostate cancer: recent advances. *European Radiology*, 18(4), 707–715. <https://doi.org/10.1007/s00330-007-0779-7>
- Pandit-Taskar, N., Larson, S. M., & Carrasquillo, J. A. (2014). Bone-Seeking Radiopharmaceuticals for Treatment of Osseous Metastases, Part 1: α Therapy with ^{223}Ra -Dichloride. *Journal of Nuclear Medicine*, 55(2), 268–274. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.112482>
- Paner, G. P., Gandhi, J., Choy, B., & Amin, M. B. (2019). Essential Updates in Grading, Morphotyping, Reporting, and Staging of Prostate Carcinoma for General Surgical Pathologists. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 143(5), 550–564. <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0334-RA>
- Parker, C., Nilsson, S., Heinrich, D., Helle, S. I., O'Sullivan, J. M., Fosså, S. D., Chodacki, A., Wiechno, P., Logue, J., Seke, M., Widmark, A., Johannessen, D. C., Hoskin, P., Bottomley, D., James, N. D., Solberg, A., Syndikus, I., Kliment, J., Wedel, S., ... Sartor, O. (2013). Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 369(3), 213–223. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1213755>
- Parker, Chris, Heidenreich, A., Nilsson, S., & Shore, N. (2018). Current approaches to incorporation of radium-223 in clinical practice. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 21(1), 37–47. <https://doi.org/10.1038/s41391-017-0020-y>
- Piaton, E., Fabre, M., Goubin-Versini, I., Bretz-Grenier, M.-F., Courtade-Saïdi, M., Vincent, S., Belleannée, G., Thivolet, F., Boutonnat, J., Debaque, H., Fleury-Feith, J., Vielh, P., Egelé, C., Bellocq, J.-P., Michiels, J.-F., & Cochand-Priollet, B. (2016). Guidelines for May-Grünwald-Giemsa staining in haematology and non-gynaecological cytopathology: recommendations of the French Society of Clinical Cytology (SFCC) and of the French Association for Quality Assurance in Anatomic and Cytologic Pathology (AFA). *Cytopathology*, 27(5), 359–368. <https://doi.org/10.1111/cyt.12323>
- Piccinini, F. (2015). AnaSP: A software suite for automatic image analysis of multicellular spheroids. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 119(1), 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2015.02.006>
- Pinto, B., Henriques, A. C., Silva, P. M. A., & Bousbaa, H. (2020). Three-Dimensional Spheroids as In Vitro Preclinical Models for Cancer Research. *Pharmaceutics*, 12(12), 1186. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121186>
- Pinto, C., Bucar, S., Alves, V., Fonseca, A., Abrunhosa, A. J., da Silva, C. L., Guerreiro, J. F., & Mendes, F. (2020). Copper-64 Chloride Exhibits Therapeutic Potential in Three-

- Dimensional Cellular Models of Prostate Cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7(December), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.609172>
- Pouget, J.-P., & Constanzo, J. (2021). Revisiting the Radiobiology of Targeted Alpha Therapy. *Frontiers in Medicine*, 8(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.692436>
- Promega. (2015). *CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay*.
- Rafehi, H., Orłowski, C., Georgiadis, G. T., Ververis, K., El-Osta, A., & Karagiannis, T. C. (2011). Clonogenic Assay: Adherent Cells. *Journal of Visualized Experiments*, 49, 15–17. <https://doi.org/10.3791/2573>
- Rawla, P. (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *World Journal of Oncology*, 10(2), 63–89. <https://doi.org/10.14740/wjon1191>
- Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E., Gillissen, S., Van der Kwast, T., & Bristow, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 9. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>
- Rodrigues, S., Dores, M., Metrogos, V., Rodrigues, M., Neto Gomes, P., Cabrita, M., Rosa, G., Coutinho, A., & Neves, J. (2014). Carcinoma da próstata metastático resistente à castração - novas abordagens terapêuticas. *Acta Urológica Portuguesa*, 31(1–2), 36–40. [https://doi.org/10.1016/S2341-4022\(14\)50008-0](https://doi.org/10.1016/S2341-4022(14)50008-0)
- Rojo, R. D., Perez, J. V. D., Damasco, J. A., Yu, G., Lin, S.-C., Heralde, F. M., Novone, N. M., Santos, E. B., Lin, S.-H., & Melancon, M. P. (2021). Combinatorial effect of radium-223 and irreversible electroporation on prostate cancer bone metastasis in mice. *International Journal of Hyperthermia*, 38(1), 650–662. <https://doi.org/10.1080/02656736.2021.1914873>
- Sakalem, M. E., De Sibio, M. T., da Costa, F. A. da S., & de Oliveira, M. (2021). Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities of use in life sciences and medicine. *Biotechnology Journal*, 16(5), 2000463. <https://doi.org/10.1002/biot.202000463>
- Sarkar, S., & Das, S. (2016). A Review of Imaging Methods for Prostate Cancer Detection. *Biomedical Engineering and Computational Biology*, 7s1, BECB.S34255. <https://doi.org/10.4137/beccb.s34255>
- Sathianathen, N. J., Konety, B. R., Crook, J., Saad, F., & Lawrentschuk, N. (2018). Landmarks in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 15(10), 627–642. <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0060-7>
- Sauer, A. K., Vela, H., Vela, G., Stark, P., Barrera-Juarez, E., & Grabrucker, A. M. (2020). Zinc Deficiency in Men Over 50 and Its Implications in Prostate Disorders. *Frontiers in Oncology*, 10(August), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01293>
- Schatten, H. (2018). Brief Overview of Prostate Cancer Statistics, Grading, Diagnosis and Treatment Strategies. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1095, pp. 1–14). https://doi.org/10.1007/978-3-319-95693-0_1
- Sebők, C., Tráj, P., Vörösházi, J., Mackei, M., Papp, M., Gálfi, P., Neogrády, Z., & Mátis, G. (2021). Two Sides to Every Question: Attempts to Activate Chicken Innate Immunity in 2D and 3D Hepatic Cell Cultures. *Cells*, 10(8), 1910. <https://doi.org/10.3390/cells10081910>
- Sehn, J. K. (2018). Prostate Cancer Pathology: Recent Updates and Controversies. *Missouri Medicine*, 115(2), 151–155. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30228708> <http://www.pubmedcentral.nih.gov>

v/articlerender.fcgi?artid=PMC6139855

- Shafi, A. A., Yen, A. E., & Weigel, N. L. (2013). Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, *140*(3), 223–238. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.003>
- Shen, M. M., & Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & Development*, *24*(18), 1967–2000. <https://doi.org/10.1101/gad.1965810>
- Shore, N. D. (2015). Radium-223 Dichloride for Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer: The Urologist's Perspective. *Urology*, *85*(4), 717–724. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2014.11.031>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Silva, C. R. (2021). *RA-223 NO TRATAMENTO DO CARCINOMA DA PRÓSTATA METASTÁTICO*. Universidade de Coimbra.
- Souza-Araújo, C. N. de, Rodrigues Tonetti, C., Cardoso, M. R., Lucci de Angelo Andrade, L. A., Fernandes da Silva, R., Romani Fernandes, L. G., & Guimarães, F. (2020). Three-Dimensional Cell Culture Based on Magnetic Fields to Assemble Low-Grade Ovarian Carcinoma Cell Aggregates Containing Lymphocytes. *Cells*, *9*(3), 635. <https://doi.org/10.3390/cells9030635>
- Sp, I. (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>
- Suckert, T., Nexhipi, S., Dietrich, A., Koch, R., Kunz-Schughart, L. A., Bahn, E., & Beyreuther, E. (2021). Models for Translational Proton Radiobiology—From Bench to Bedside and Back. *Cancers*, *13*(16), 4216. <https://doi.org/10.3390/cancers13164216>
- Suhail, Y., Cain, M. P., Vanaja, K., Kurywchak, P. A., Levchenko, A., Kalluri, R., & Kshitiz. (2019). Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Systems*, *9*(2), 109–127. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.07.003>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Suominen, M. I., Fagerlund, K. M., Rissanen, J. P., Konkol, Y. M., Morko, J. P., Peng, Z., Alhoniemi, E. J., Laine, S. K., Corey, E., Mumberg, D., Ziegelbauer, K., Kähkönen, S.-M., Halleen, J. M., Vessella, R. L., & Scholz, A. (2017). Radium-223 Inhibits Osseous Prostate Cancer Growth by Dual Targeting of Cancer Cells and Bone Microenvironment in Mouse Models. *Clinical Cancer Research*, *23*(15), 4335–4346. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2955>
- Suominen, M. I., Rissanen, J. P., Kähkönen, R., Fagerlund, K. M., Alhoniemi, E., Mumberg, D., Ziegelbauer, K., Halleen, J. M., Kähkönen, S.-M., & Scholz, A. (2013). Survival Benefit With Radium-223 Dichloride in a Mouse Model of Breast Cancer Bone Metastasis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *105*(12), 908–916. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt116>
- Suominen, M. I., Wilson, T., Kähkönen, S.-M., & Scholz, A. (2019). The Mode-of-Action of Targeted Alpha Therapy Radium-223 as an Enabler for Novel Combinations to Treat Patients with Bone Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(16), 3899.

- <https://doi.org/10.3390/ijms20163899>
- Tan, M. E., Li, J., Xu, H. E., Melcher, K., & Yong, E. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, *36*(1), 3–23. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.18>
- Tavares, N. (2019). *Radium-223 in metastatic prostate cancer: effects on metastasis microenvironment*. University of Aveiro.
- ThermoFisher. (2020a). 3D cell culture handbook. In *3D Cell Culture Handbook*. thermofisher.com/3dculture%0AFor
- ThermoFisher. (2020b). *CELL CULTURE BASICS HANDBOOK*. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Handbooks/gibco-cell-culture-basics-handbook.pdf>
- Tobias, C. A., & Silverman, J. (n.d.). *Applications of radiation*. Retrieved March 12, 2022, from <https://www.britannica.com/science/radiation/Applications-of-radiation>
- Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. (2014). Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures. *Current Protocols in Molecular Biology*, *106*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2804s106>
- Uwada, J., Mukai, S., Terada, N., Nakazawa, H., Islam, M. S., Nagai, T., Fujii, M., Yamasaki, K., Taniguchi, T., Kamoto, T., & Yazawa, T. (2021). Pleiotropic effects of probenecid on three-dimensional cultures of prostate cancer cells. *Life Sciences*, *278*(April), 119554. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119554>
- Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, *1*(3), 1112–1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>
- Von Euw, S., Wang, Y., Laurent, G., Drouet, C., Babonneau, F., Nassif, N., & Azaïs, T. (2019). Bone mineral: new insights into its chemical composition. *Scientific Reports*, *9*(1), 8456. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44620-6>
- Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J., & DePinho, R. A. (2018). Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & Development*, *32*(17–18), 1105–1140. <https://doi.org/10.1101/gad.315739.118>
- Wilson, J. M., & Parker, C. (2016). The safety and efficacy of radium-223 dichloride for the treatment of advanced prostate cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *16*(9), 911–918. <https://doi.org/10.1080/14737140.2016.1222273>
- World Health Organization. (2016). *Ionizing radiation, health effects and protective measures*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ionizing-radiation-health-effects-and-protective-measures>
- 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 α -Particle Irradiation. *Cancer Research*, *79*(21), 5640–5651. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0859>
- Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., Santi, S., Polico, R., Bevilacqua, A., & Tesei, A. (2016). 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Scientific Reports*, *6*(1), 19103. <https://doi.org/10.1038/srep19103>