

Maria João da Silva Fernandes Leal Carvalho

# CÉLULAS ESTAMINAIS DO CANCRO DO ENDOMÉTRIO

## Caracterização, resposta à terapêutica e padrão de metastização *in vivo*

Tese de Doutoramento do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina, orientada pelo Professor Doutor Carlos Manuel Domingues Freire de Oliveira e pela Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Maria João da Silva Fernandes Leal Carvalho

**CÉLULAS ESTAMINAIS DO CANCRO DO ENDOMÉTRIO**  
Caracterização, resposta à terapêutica e  
padrão de metastização *in vivo*

Setembro 2015



## CAPA

Imagem das células humanas de adenocarcinoma do endométrio, transformação da segunda geração de esferas, ES2, na segunda geração de derivadas aderentes, G2. Ampliação 400x.

Tese de Doutoramento do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina, orientada pelo Professor Doutor Carlos Manuel Domingues Freire de Oliveira e pela Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, financiada por bolsa de investigação atribuída pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (SFRH/SINTD/60068/2009).



A Faculdade de Medicina não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta tese.  
(Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Artigo 108, parágrafo único)

O trabalho experimental descrito nesta tese foi realizado na Unidade de Biofísica e no Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida - IBILI da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, no Instituto Português do Sangue e da Transplantação e na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

O espectrómetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 600MHz usado nas experiências integra a rede Nacional de RMN (UC-NMR) e foi adquirido no quadro do Programa Nacional para Reequipamento Científico, contrato REDE/1517/RMN/2005 com financiamento do POCI 2010 (FEDER) e da Fundação para a Ciência e Tecnologia.





## PREFÁCIO

O endométrio constitui o revestimento interno da cavidade uterina e possui uma capacidade regenerativa única que está patente ao longo da vida reprodutiva da mulher. Este potencial de renovação foi associado a uma população de células estaminais responsáveis pela reestruturação endometrial que ocorre fisiologicamente durante o ciclo menstrual. A aquisição de alterações genéticas e epigenéticas por esta população celular constitui um dos mecanismos que pode explicar a evolução da patologia endometrial assim como a hierarquia celular que justifica a heterogeneidade tumoral.

As células estaminais do cancro são consideradas células iniciadoras tumorais, com propriedades biológicas intrínsecas semelhantes às das células estaminais e que apresentam capacidade de reconstituir um tumor idêntico ao tumor de origem. Deste modo, a teoria das células estaminais do cancro aponta para a existência de um grupo celular com regulação anormal, crescimento ilimitado, capacidade de autorrenovação, indiferenciação e potencial de diferenciação em células tumorais mais especializadas.

Este projeto surgiu com o principal propósito de caracterização das populações celulares do cancro do endométrio, particularmente das células com propriedades estaminais. Uma das formas de isolamento desta população é através da formação de esferas *in vitro*. Esta metodologia permitiu a estratificação de grupos de populações que foram estudadas *in vitro* e *in vivo*, com a intenção de esclarecer o seu papel na iniciação tumoral, a sua capacidade de diferenciação, as vias moleculares envolvidas na sua regulação, assim como o seu potencial tumorigénico. O isolamento destas células pode ainda permitir a identificação de biomarcadores que poderão ser aplicados na prática clínica no estudo da progressão da patologia endometrial, na avaliação da resposta à terapêutica e no desenvolvimento de terapêuticas dirigidas a alvos moleculares.

Atualmente, a resposta à terapêutica sistémica do cancro do endométrio avançado ainda se revela modesta e as terapêuticas dirigidas apresentaram resultados pouco promissores. As recidivas têm habitualmente respostas clínicas pouco favoráveis à quimioterapia e ocorrem mesmo após terapêutica adjuvante com radioterapia. Esta realidade constituiu a motivação para a avaliação da resposta a estas terapêuticas por parte das populações celulares com propriedades de células estaminais do cancro do endométrio. No futuro, a caracterização individualizada da sensibilidade aos citostáticos pode constituir uma forma de adaptar a cada doente um regime mais adequado. Por outro lado, a identificação de uma

população com potencial de resistência à terapêutica e das vias moleculares envolvidas nestes processos representa uma evolução no conhecimento da biologia tumoral e no desenvolvimento de outras terapêuticas.

O trabalho experimental de investigação que conduziu a esta tese resulta do empenho de uma equipa, com contributos fundamentais que não podem deixar de ser destacados. Este projeto de investigação básica foi conduzido com o pensamento constante na translação clínica e veio permitir o desenvolvimento de várias plataformas para investigação translacional. Associadamente, este projeto congregou diversas técnicas que contaram com a colaboração de centros detentores de especialização que permitiram alargar a análise em diversas vertentes.

Ao orientador deste trabalho, Professor Doutor Carlos Freire de Oliveira, Professor Catedrático reformado da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, que me acompanhou desde o início da minha carreira clínica e que cedo entendeu que o meu percurso incluiria a investigação científica. Saliento a sua visão de investigador clínico, o estímulo e as oportunidades que me proporcionou, a disponibilidade e a partilha de conhecimento científico. Na minha formação clínica e académica tive o privilégio de contar com os seus ensinamentos, a sua visão organizacional e o seu rigor científico que serão para mim um alicerce profissional e pessoal.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Diretora do Serviço de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Professora Catedrática da mesma Faculdade, coorientadora deste trabalho, que me integrou plenamente na sua equipa de investigação, acompanhou todas as etapas deste estudo e permitiu alargar a minha visão médica à investigação básica. Não posso deixar de vincar a sua disponibilidade e apoio constante, paciência, conselhos e críticas que marcarão incondicionalmente o meu pensamento científico.

À Professora Doutora Isabel Torgal, Professora Auxiliar Regente da Área de Ginecologia da Unidade Curricular de Ginecologia e Obstetrícia do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Diretora do Serviço de Ginecologia A do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, que sempre me apoiou e acompanhou nas etapas da minha formação clínica e académica. A sua amizade, confiança e estímulo foram fundamentais para ultrapassar todos os obstáculos e conciliar a atividade clínica, de investigação e de docência.

À Professora Doutora Ana Margarida Abrantes, que acompanhou este projeto, foi sempre paciente, incansável e disponível, destaco todo o apoio particularmente na realização dos estudos *in vivo*.

À Doutora Mafalda Laranjo, por toda a ajuda na execução do estudo experimental, paciente, compreensiva, disponível em todas as fases da investigação e que permitiu que a minha inexperiência não fosse um obstáculo.

Ao Mestre João Casalta Lopes, pelo apoio no estudo estatístico, pela ajuda na interpretação dos resultados

obtidos, pela coordenação das experiências com irradiação, pelo incentivo permanente e incondicional.

Ao Doutor Artur Paiva agradeço pelo apoio na execução e interpretação dos estudos de citometria de fluxo, realizados no Instituto Português do Sangue e da Transplantação.

Ao Professor Doutor Rui de Carvalho agradeço pelo apoio na execução dos estudos de metabonómica realizados na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Ao Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, particularmente ao Dr. Rui Oliveira, agradeço pelo apoio na análise anatomopatológica.

Ao Serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, dirigido pela Dra. Margarida Borrego, que possibilitou a execução dos estudos com irradiação, agradeço pela disponibilidade.

Aos Serviços Farmacêuticos do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra agradeço pela cedência dos citostáticos utilizados neste trabalho.

Agradeço a colaboração prestada na realização do trabalho experimental da Mestre Catarina Mamede, da Mestre Daniela Sarmiento, do Mestre João Encarnação, da Mestre Kathleen Santos, da Mestre Tânia Costa e do Mestre Telmo Gonçalves. À Doutora Ana Brito, à Doutora Siri Paulo, ao Mestre Fernando Mendes e à Mestre Salomé Pires reconheço a partilha de um ambiente de trabalho salutar, os incentivos diários e a ajuda prestada. A todos os alunos do Serviço de Biofísica que sempre apoiaram o meu trabalho laboratorial.

Pelo suporte financeiro individual agradeço o Subsídio de Interno Doutorando atribuído pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia. Ao CIMAGO (Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia) pelo financiamento disponibilizado a este projeto.

Agradeço também aos Docentes da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra que acompanharam o meu percurso, ao Professor Doutor Sousa Barros, ao Professor Doutor Fernando Mota, à Professora Doutora Ana Teresa Almeida Santos, ao Professor Doutor Paulo Moura e à Professora Doutora Margarida Dias, agradeço o apoio ao longo da minha progressão profissional. Saliento também o incentivo da Dra. Vera Ramos e da Dra. Mariana Tavares, Assistentes Convidadas da Área de Ginecologia de Unidade Curricular de Ginecologia e Obstetrícia.

Agradeço a todos os colegas do Serviço de Ginecologia A que me apoiaram neste percurso, que permitiram conciliar a atividade assistencial e foram sábios conselheiros. Não posso deixar de vincar o exemplo de dedicação do Dr. Francisco Falcão, meu orientador durante o internato de Ginecologia, da Dra. Cristina Frutuoso e da Dra. Giselda Carvalho que sempre me fizeram acreditar que conseguiria atingir este objetivo. Agradeço também aos Especialistas da equipa que integro, Dr. Luís Almeida e Sousa, Dr. Carlos Nobre e Dr. João Paulo Marques.

Ao Serviço de Obstetrícia A do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, dirigido pelo Professor Doutor Paulo Moura, vinco o apoio incondicional da minha orientadora de internato Dra. Teresa Sousa

Fernandes e dos membros da minha Equipa de Urgência, Dra. Natália Machado, Dra. Marta Brinca, Dr. António Carlos Lobo, Dra. Teresa Bombas e Dra. Daniela Couto pelo estímulo permanente. Também agradeço a todos os colegas companheiros de internato e aos atuais internos que me ajudaram a conciliar a atividade clínica e a acreditar que este projeto seria possível.

À minha família e aos meus amigos que apoiam todos os desafios a que me proponho.

# ÍNDICE

CAPA .....	iv
PREFÁCIO.....	ix
ÍNDICE .....	13
RESUMO .....	17
PARTE I – CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA .....	23
CAPÍTULO I – FISILOGIA E REGENERAÇÃO DO ENDOMÉTRIO.....	25
Fisiologia do endométrio .....	27
Regeneração endometrial e células estaminais do endométrio .....	30
CAPÍTULO II – CONTEXTUALIZAÇÃO CLÍNICA.....	35
Epidemiologia.....	37
Clínica e diagnóstico .....	40
Estadiamento.....	42
Exames complementares de diagnóstico.....	42
Classificação histológica e fenotípica.....	44
Classificação molecular .....	48
Tratamento cirúrgico .....	50
Radioterapia.....	54
Quimioterapia.....	56
Tratamento hormonal.....	58
Tratamento conservador.....	59
Terapêuticas dirigidas.....	60

CAPÍTULO III — CÉLULAS ESTAMINAIS NO CANCRO DO ENDOMÉTRIO.....	65
Células estaminais do cancro.....	67
Células estaminais do cancro do endométrio .....	75
Resistência ao tratamento e CSC do endométrio .....	83
Metastização e CSC do endométrio .....	86
CAPÍTULO IV — OBJETIVOS.....	89
PARTE II — TRABALHO EXPERIMENTAL.....	93
CAPÍTULO V — CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS .....	95
Material e Métodos.....	97
Culturas celulares.....	97
Protocolo de formação de esferas e de derivadas aderentes .....	98
Capacidade de formação de esferas.....	99
Capacidade de autorrenovação .....	100
Área de projeção ocupada pelas esferas .....	100
Tempo de duplicação .....	101
Ensaio clonogénico .....	101
Citometria de fluxo .....	101
Western blot .....	102
Estudos de captação com <sup>18</sup> F-FDG.....	105
Estudos de ressonância magnética nuclear .....	106
Eletroforese bidimensional .....	112
Modelo heterotópico .....	115
Análise estatística .....	117
Resultados .....	118
Esferas e derivadas aderentes .....	118
Capacidade de formação e de autorrenovação de esferas .....	119
Área de projeção ocupada pelas esferas .....	120

Tempo de duplicação .....	122
Eficiência clonogénica.....	122
Marcadores de células estaminais .....	123
Expressão de recetores hormonais, HER2, P53,e $\beta$ -catenina .....	128
Captação de $^{18}\text{F}$ -FDG.....	132
Análise metabólica por RMN.....	133
Proteómica .....	137
Tumorigénese <i>in vivo</i> .....	140
Discussão .....	143
<b>CAPÍTULO VI — RESPOSTA À TERAPÊUTICA .....</b>	<b>169</b>
Material e Métodos.....	171
Quimioterapia.....	171
Radioterapia .....	172
Atividade metabólica .....	174
Ensaio clonogénico .....	175
Morte celular.....	176
Microscopia de fluorescência.....	176
Western blot .....	178
Danos no DNA .....	178
Análise estatística .....	179
<b>RESPOSTA AOS CITOSTÁTICOS .....</b>	<b>180</b>
Resultados .....	180
Atividade metabólica .....	180
Sobrevivência celular .....	194
Morte celular.....	196
Danos no DNA .....	202
Discussão .....	203

RESPOSTA À IRRADIAÇÃO CELULAR.....	219
Resultados .....	219
Atividade metabólica .....	219
Sobrevivência celular .....	223
Morte celular.....	224
Danos no DNA.....	231
Discussão .....	232
CAPÍTULO VII — MODELO ORTOTÓPICO.....	241
Material e Métodos.....	243
Modelo ortotópico de cancro do endométrio.....	243
Estudos de medicina nuclear.....	246
Necropsia.....	246
Histologia e imunohistoquímica.....	247
Western blot.....	247
Resultados .....	248
Discussão .....	260
PARTE III — CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	269
PARTE IV — REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	273
PARTE V — SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E FÓRMULAS .....	303
PARTE VI — ANEXOS .....	311
ANEXO I — ESTADIAMENTO DA FIGO 2009 .....	313
ANEXO II — APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA .....	317



## RESUMO



O cancro do endométrio é a neoplasia ginecológica mais frequente nos países ocidentais, habitualmente diagnosticado em estádios iniciais e na sexta década de vida. No entanto existe um grupo de doentes com doença recorrente e metastática cujo prognóstico é desfavorável e para as quais estão disponíveis opções terapêuticas com respostas modestas. As células estaminais do cancro (CSC, do inglês *cancer stem cells*) constituem uma população com propriedades de iniciação tumoral, de resistência à terapêutica e potencial de metastização.

O principal objetivo deste estudo foi caracterizar a população de células do cancro do endométrio com propriedades de CSC *in vitro*, relativamente às suas características fenotípicas. Também se pretendeu avaliar a resposta das populações celulares ao tratamento com os citostáticos e com a irradiação. Finalmente foi também objetivo desenvolver um modelo animal ortotópico que permitisse prever o comportamento de cada população celular *in vivo*.

Neste estudo experimental foram utilizadas diversas metodologias que se iniciaram pelo protocolo de formação de esferas *in vitro* e obtenção de populações derivadas aderentes. As populações celulares foram caracterizadas no que respeita à avaliação da expressão de marcadores moleculares por citometria de fluxo, à expressão de proteínas por western blot, à captação da fluordesoxiglicose marcada com flúor-18 ( $^{18}\text{F}$ -FDG, do inglês *fluorine-18-fluorodeoxyglucose*), ao metabolismo por ressonância magnética e ao proteoma por eletroforese bidimensional. O estudo da resposta à terapêutica foi realizada pela avaliação da atividade metabólica, das vias de morte celular por microscopia de fluorescência e da genotoxicidade através do ensaio cometa. O modelo animal ortotópico de cancro do endométrio foi desenvolvido em ratos imunodeprimidos e foi avaliado por imagem molecular e estudos *ex vivo*.

As três populações de esferas e as três populações de células derivadas aderentes foram obtidas a partir da linha celular de cancro do endométrio ECC-1. A capacidade de formação de esferas variou de 2,22% a 2,54% e a capacidade de autorrenovação foi superior na última geração de esferas, a qual também apresentou menor área de projeção. A marcação de CD133, de CD44 e a expressão da aldeído desidrogenase (ALDH, do inglês *aldehyde dehydrogenase*) foi superior nas populações de esferas e a expressão da  $\beta$ -catenina foi também tendencialmente superior nestas células. Enquanto a expressão de recetores de estrogénios  $\alpha$  foi menor nas esferas, a expressão de recetores de estrogénios  $\beta$  e de recetores de progesterona manteve-se inalterada. A expressão de P53 também foi inferior nas populações de esferas comparando com as restantes populações. O estudo do metabolismo da glicose revelou uma maior captação

de  $^{18}\text{F}$ -FDG pela população de esferas que também apresentaram uma produção inferior de lactato e um maior acoplamento da glicólise ao ciclo de Krebs em relação à linha celular parental e à população de derivadas aderentes, o que sugere uma preferência pelo metabolismo oxidativo. A eletroforese bidimensional revelou a sobre-expressão de vários *spots* nas populações de esferas e de derivadas aderentes em relação à linha parental, que poderão ser alvo de identificação de modo a contribuir para o desenvolvimento de biomarcadores e para a identificação de moléculas para terapêuticas dirigidas. A tumorigênese das populações celulares estudadas foi patenteada pelo modelo heterotópico, que revelou um crescimento mais precoce nos tumores com origem nas populações de esferas.

A resposta aos citostáticos revelou uma maior atividade metabólica na população de esferas, particularmente quando submetidas ao tratamento com doxorrubicina ou com paclitaxel. Para este citostático verificou-se um maior fator de sobrevivência na população de esferas. Esta população apresentou a morte por apoptose diminuída no caso do tratamento com carboplatina ou com paclitaxel. A migração do DNA foi menor na população de esferas submetidas ao paclitaxel e não se observou fragmentação do DNA com o tratamento com carboplatina. A resposta à irradiação originou diferenças biológicas reduzidas, em que se salientou a atividade metabólica superior em algumas populações de esferas e de derivadas aderentes. O fator de sobrevivência foi superior nas populações de esferas e de derivadas aderentes irradiadas com 0,5 Gy, mas com as doses de 15 Gy e de 30 Gy as derivadas aderentes apresentaram maior sobrevivência. A morte por apoptose foi menor na população de esferas, no entanto este tipo de morte destacou-se na população de derivadas aderentes. Os danos no DNA foram menores nas populações de esferas e de derivadas aderentes em relação à população parental.

O modelo ortotópico revelou uma metastização mais frequente nos animais injetados com as esferas. O perfil imunohistoquímica para o Ki67, a P53 e a E-caderina foi semelhante entre os tumores primários e as metástases. A expressão de ALDH foi também semelhante nos tumores derivados das diferentes populações celulares e não se observou uma variação em relação às metástases. A  $\beta$ -catenina verificou-se aumentada nas metástases em relação aos tumores.

A população com propriedades de CSC do cancro do endométrio apresentou capacidade de autorrenovação e de diferenciação, expressou marcadores de CSC e demonstrou um fenótipo mais indiferenciado. Esta população apresentou preferência pelo metabolismo oxidativo em detrimento da fermentação láctea, comparando com as populações aderentes, o que poderá representar uma população com menor proliferação. De um modo geral as esferas foram mais resistentes ao tratamento e apresentaram maior potencial metastático. A continuação da caracterização destas populações de células tumorais pode constituir um contributo para o diagnóstico precoce, adequação da terapêutica e desenvolvimento de terapêuticas dirigidas a alvos moleculares.

Endometrial cancer is the most common gynaecological malignancy in western countries and is usually diagnosed in early stages and in the sixth decade of life. However there is a group of patients with recurrent and metastatic disease whose prognosis is poor, for whom treatment options available show modest responses. The cancer stem cell (CSC) constitute a population with properties of tumour initiation, resistance to therapy and metastatic potential.

The aim of this study was to characterize the population of endometrial cancer cells with CSC properties *in vitro*, relative to its phenotypic characteristics. It was also intended to evaluate the response of the cell populations to treatment with chemotherapeutic agents and irradiation. Finally it was also aimed to develop an orthotopic animal model that allowed predicting the behaviour of each cell population *in vivo*.

In this experimental study several methodologies were used, starting with the spheres formation protocol *in vitro* and the obtention of derived adherent populations. The cell populations were characterized regarding the evaluation of the expression of molecular markers by flow cytometry, the expression of proteins by western blot, the uptake of fluorodesoxyglucose labelled with fluorine-18 ( $^{18}\text{F}$ -FDG), the metabolism by magnetic resonance and the proteome by two-dimensional electrophoresis. The evaluation of response to therapy was performed using the evaluation of metabolic activity, of cell death pathways by fluorescence microscopy and of genotoxicity through the comet assay. The orthotopic animal model of endometrial cancer was developed in immunosuppressed rats and evaluated with molecular imaging and *ex vivo* studies.

The three sphere populations and the three derived adherent populations were obtained from the endometrial cancer cell line ECC-1. The spheres formation capability was 2.22% to 2.54%, and self-renewal capacity was higher in the last generation of spheres, which also showed lower projection area. The CD133 and CD44 labelling and the expression of aldehyde dehydrogenase (ALDH) were higher in spheres populations and  $\beta$ -catenin showed tendency to be increased in spheres. While the expression of oestrogen receptors  $\alpha$  was smaller in spheres, the oestrogen receptor  $\beta$  and progesterone receptor expression remained unchanged. P53 expression was also lower in sphere populations compared with the other populations. The glucose metabolism studies showed a higher uptake of  $^{18}\text{F}$ -FDG for the sphere populations, which also showed a lower lactate production and an increased coupling of glycolysis to the Krebs cycle in relation to the parental cell line and the population of adherent derived cells, which suggests a preference for oxidative metabolism. Two dimensional electrophoresis revealed and over-expression of various spots in

the population of spheres and derived adherent cells comparing with parental line, which can lead to the identification of targets to contribute to the development of biomarkers and identification of molecules for targeting therapies. The tumorigenesis of cell populations studied was observed in a heterotopic model, which showed an earlier growth of tumours for the sphere populations.

The response to cytostatics showed an increased metabolic activity in the sphere populations, especially when submitted to treatment with doxorubicin and paclitaxel. For this cytostatic there was a higher survival factor in spheres populations. This population showed decreased apoptosis cell death in the case of treatment with carboplatin and paclitaxel. The DNA migration was lower in the sphere population submitted to paclitaxel and no DNA fragmentation was observed with treatment with carboplatin treatment.

The response to irradiation led to small biological differences, emphasizing higher metabolic activity in some sphere and derived adherent populations. The survival factor was higher in spheres and derived adherent populations with 0.5 Gy, but with the dose of 15 Gy and 30 Gy the derived adherent populations had superior survival. Apoptotic cell death was lower in sphere populations, however this type of death was observed in the derived adherent population. DNA damage was smaller in sphere and derived adherent populations than parental cell line.

The orthotopic model revealed a more frequent metastasis in the animals injected with spheres. The immunohistochemical profiles for Ki67, p53 and E-cadherin were similar in primary tumours and metastasis. The ALDH expression was similar in tumours derived from different cell populations and there was no variation in relation to metastasis. The  $\beta$ -catenin was increased in metastasis compared with the tumours.

The population of endometrial cancer with CSC properties presented self-renewal capacity and differentiation, expressed CSC markers and demonstrated a more undifferentiated phenotype. This population showed preference for oxidative metabolism instead of lactic fermentation, compared with the adherent populations, what can represent a population with decreased proliferation. Generally, the spheres were more resistant to therapy and presented an increased metastatic potential. Continuing the characterization of tumour cell populations may constitute a contribution to the earlier diagnosis, adequacy of treatment and development of targeted therapies.

## PARTE I – CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA





## **CAPÍTULO I – FISILOGIA E REGENERAÇÃO DO ENDOMÉTRIO**



## Fisiologia do endométrio

O endométrio é a mucosa que reveste internamente o útero e é constituído por uma camada epitelial de células cilíndricas que assenta numa camada de tecido conjuntivo, designada por estroma endometrial. O endométrio humano apresenta um processo regenerativo de cerca de 400 ciclos ao longo da vida da mulher. O ciclo ovárico e o uterino ocorrem em paralelo e constituem o ciclo menstrual. O endométrio tem várias etapas evolutivas de crescimento e de regressão que se iniciam na fase menstrual e prosseguem para a fase proliferativa, a fase secretora, preparação para a implantação e a fase de descamação endometrial (Fritz MA, 2011). Do ponto de vista morfológico, o endométrio divide-se na camada funcional, *decidua functionalis*, que representa os dois terços superiores e a camada basal, *decidua basalis*, situada no terço inferior (Berek, 2007). A camada funcional é a sede dos processos de proliferação, de secreção e de regeneração e é nesta camada que se implanta o embrião. A camada basal tem como objetivo regenerar o endométrio após a menstruação (Berek, 2007).

Na fase menstrual a *decidua basalis* é constituída por glândulas primordiais e por estroma denso. Na fase proliferativa verifica-se o crescimento da *decidua functionalis* em resposta ao aumento dos níveis de estrogénios de produção ovárica durante o crescimento folicular. As glândulas endometriais inicialmente são finas, tubulares e revestidas por um epitélio cilíndrico baixo. Como resultado dos estímulos mitóticos, ocorre a pseudo-estratificação do epitélio, as glândulas estendem-se perifericamente e tornam-se mais longas e de estrutura tortuosa, o estroma é denso e as estruturas vasculares são escassas (Berek, 2007).

Após a ovulação que, considerando um ciclo de 28 dias, ocorre por volta do 14º dia, inicia-se a fase secretora com a produção de progesterona a qual antagoniza os efeitos dos estrogénios. Nesta fase as glândulas ficam preenchidas por secreções eosinófilas e as células tornam-se ricas em vacúolos que contêm glicogénio. Na fase secretora tardia, o estroma fica edemaciado e as arteríolas espiraladas tornam-se visíveis e progressivamente mais longas e tortuosas (Berek, 2007).

Se ocorrer fecundação, na fase de preparação para a implantação, 7 a 13 dias após a ovulação, as glândulas são muito proeminentes e tortuosas e o estroma escasso. No final desta fase o endométrio diferencia-se em 3 zonas, a camada basal ou *stratum basalis*, a porção intermédia ou *stratum spongiosum*, composto por estroma sem edema, com vasos espiralados finos e glândulas dilatadas e a camada mais

superficial ou *stratum compactum*, composto por células estromais proeminentes. Este processo constitui a decidualização que corresponde à remodelação endometrial necessária para a preparação de uma gravidez. As células endometriais decidualizadas regulam a invasão do trofoblasto, resistem à inflamação e modulam o sistema imune materno local (Maruyama & Yoshimura, 2008).

O processo de decidualização inclui a produção de vários fatores de crescimento, de citocinas, de neuropeptídeos, de radicais livres e de componentes da matriz extracelular (Dimitriadis *et al*, 2005). Os estrogénios regulam a sobrevivência das células endometriais, a viabilidade e os efeitos mitóticos através do recetor de estrogénios  $\alpha$  que é predominante no endométrio (Gargett *et al*, 2008). O recetor de estrogénios  $\beta$  tem expressão inferior e promove a diferenciação epitelial pela regulação negativa da resposta mediada pelo recetor de estrogénios  $\alpha$ . A progesterona inicia e regula os fenómenos da decidualização através da ação dos recetores de progesterona. O recetor de progesterona corresponde a duas proteínas sintetizadas pelo mesmo gene, do recetor de progesterona A e do recetor de progesterona B, sendo o recetor de progesterona A a isoforma dominante (Gargett *et al*, 2008). A expressão, a atividade transcricional e a regulação dos recetores das hormonas esteróides no epitélio funcional e no estroma influenciam a ativação de genes que regulam mediadores críticos do crescimento cíclico e de diferenciação endometrial (Gargett *et al*, 2008).

Na fase pré-menstrual verifica-se um recrutamento linfocitário que migra do sistema vascular e que culmina no colapso do estroma endometrial com início do fluxo menstrual. Na ausência de implantação embrionária, a secreção glandular cessa e ocorre a descamação da camada funcional, coincidindo com o declínio da produção hormonal ovárica de estrogénios e de progesterona. As enzimas lisossómicas são libertadas no citoplasma das células epiteliais, estromais e endoteliais, levando a ativação de prostaglandinas, a necrose tecidual e a trombose vascular (Fritz MA, 2011). A influência vasoconstritora da prostaglandina  $F2\alpha$  desencadeia espasmo das arteríolas espiraladas levando a isquémia endometrial (Fritz MA, 2011).

Os estrogénios induzem a proliferação das células epiteliais e estromais do endométrio pela sobre-regulação da síntese e da secreção do fator transformador do crescimento  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ , do inglês *transforming growth factor- $\alpha$* ), do fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês *epidermal growth factor*) e do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I (IGF-I, do inglês *insulin-like growth factor-I*) (Gargett *et al*, 2008). As células estromais decidualizadas produzem proteínas de ligação ao IGFBP (do inglês *IGF-binding proteins*) -I e ao IGFBP-3, que limitam a atividade mitogénica do IGF-I. Os estrogénios também regulam os recetores do EGF que medeiam o efeito proliferativo deste fator de crescimento e do TGF- $\alpha$  (Munro *et al*, 2010). O fator de crescimento hepatocitário (HGF, do inglês *hepatocyte growth factor*) é produzido pelas células estromais e estimula a proliferação epitelial através de interações parácrinas, independentes da

influência das hormonas esteroides (Gargett *et al*, 2008). Durante a fase proliferativa, o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF, do inglês *basic fibroblast growth factor*) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF, do inglês *platelet-derived growth factor*) promovem a proliferação estromal através de interações autócrinas com os seus recetores FGF-recetor-1 (FGFR-1) e PDGF-recetor- $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ). Também o fator inibidor da leucemia (LIF, do inglês *leukemia inhibitory factor*) tem um papel importante na preparação da recetividade do endométrio para a implantação do blastocisto.

A angiogénese é um processo que é regularmente repetido na sequência de descamação e de regeneração endometrial. Ao longo do ciclo endometrial ocorrem eventos angiogénicos que são preponderantes nas quatro fases, nomeadamente, a reparação dos vasos sanguíneos que sofreram rotura na menstruação, o alargamento dos vasos durante a fase proliferativa, o desenvolvimento das arteriolas espiraladas durante a fase secretora e a regressão vascular na fase menstrual, conforme representado na Figura 1. A angiogénese endometrial é orientada por uma rede de sinalização molecular e de recetores que incluem membros da família do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) e suas variantes, FGF, angiopoietinas, angiogenina e eferinas e respetivos recetores (Maruyama & Yoshimura, 2008). Os níveis de VEGF-A são maiores na fase menstrual, em resposta a citocinas pró-inflamatórias (Munro *et al*, 2010). Esta expressão preferencial na fase menstrual foi implicada na reparação vascular e na preparação para a angiogénese da fase proliferativa (Munro *et al*, 2010). O papel de outros fatores angiogénicos permanece por estabelecer.

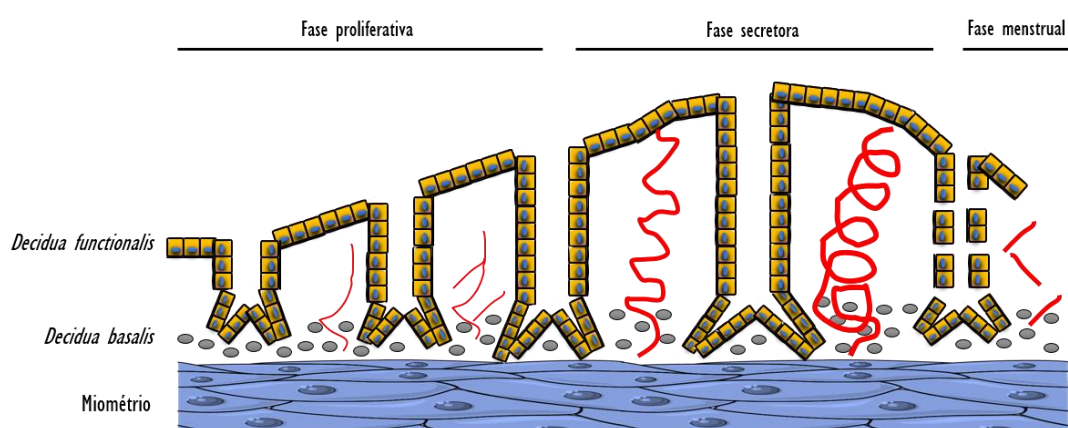


Figura 1: Esquema representativo das alterações vasculares do endométrio ao longo das fases do ciclo menstrual. A *decidua functionalis* apresenta crescimento e alargamento ao longo da fase proliferativa e desenvolvimento de arteriolas espiraladas na fase secretora. Na fase menstrual ocorre regressão vascular. Adaptado de Gargett *et al*, 2008 e de Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

## Regeneração endometrial e células estaminais do endométrio

O endométrio tem uma capacidade regenerativa única que está patente todos os meses e em alguns períodos da vida reprodutiva como o puerpério, após abortamento e na menopausa sob terapêutica hormonal. A reparação endometrial inicia-se com a migração de células epiteliais das glândulas basais nas primeiras 48 horas após a descamação. Este estágio inicial é independente de estrogénios, e ocorre sob concentrações locais baixas (Gargett *et al*, 2008). Após a elevação dos estrogénios, os recetores de estrogénios  $\alpha$  e os recetores de progesterona são expressos no epitélio e no estroma. As glândulas crescem numa proporção superior ao estroma. Quando ocorre a ovulação, a progesterona induz diferenciação da camada funcional, mas não da camada basal. Se a implantação não ocorrer, as células estromais iniciam apoptose com a diminuição dos níveis de progesterona e este processo culmina na menstruação (Salamonsen, 2003).

A capacidade regenerativa do endométrio sugere a existência de células com propriedades estaminais, particularmente na camada basal, o local da génese deste processo. As células estaminais somáticas têm a capacidade de originar células idênticas e mantêm esta capacidade ao longo do tempo, ou seja, apresentam capacidade de autorrenovação (Gargett *et al*, 2008). Uma célula progenitora, derivada das células estaminais do tecido, diferencia-se em células maduras com funções especializadas e responde ao controlo homeostático que regula a decisão entre a autorrenovação ou a diferenciação (Kato *et al*, 2007). A primeira descrição de uma população de células endometriais de mulheres com ciclos ovulatórios, com atividade clonogénica *in vitro* reportou-se a células epiteliais e estromais provenientes de tecido endometrial de mulheres em idade fértil (Chan *et al*, 2004). O número de células que tiveram capacidade de gerar colónias correspondeu a 0,22% nas células epiteliais e 1,25% nas células estromais. Os autores identificaram dois tipos de colónias, designadas também por unidades formadoras de colónias, umas de pequenas dimensões, mais frequentes e outras de maiores dimensões, mais densas. As colónias com origem epitelial corresponderam a fenótipo de grandes dimensões em 37% e nas de origem estromal apenas uma em 60 eram de grandes dimensões. Desta forma surgiu a hipótese das colónias de grandes dimensões representarem células estaminais e progenitoras e as colónias de pequenas dimensões serem células diferenciadas da camada funcional. O EGF e o PDGF com duas cadeias B (-BB, do inglês *two B chains*) são importantes na iniciação da proliferação de células epiteliais clonogénicas, enquanto o EGF, o TGF- $\alpha$ , o FGF, o PDGF-BB e o bFGF têm um papel importante nas células estromais clonogénicas. As células estromais clonogénicas têm um potencial de diferenciação em várias linhas, produzindo miofibroblastos e fibroblastos estromais (Chan *et al*, 2004).

A população lateral, descrita na literatura anglo-saxónica como *side population*, é considerada um marcador universal de células estaminais adultas, e é assim designada uma vez que, num histograma de citometria de fluxo, pode surgir separada da população maioritária por apresentar baixa marcação com

Hoechst 33342 (Gargett & Masuda, 2010). Deste modo, a população lateral tem a propriedade característica de extrusar o corante Hoechst 33342 que se intercala com o ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*), devido à expressão do transportador membranar de ligação à adenosina trifosfato (ABC, do inglês *adenosina trifosfato-binding cassette*) G2 (Kato *et al*, 2007). Este fenótipo é considerado um marcador de células estaminais do adulto. A cultura a longo prazo das células epiteliais endometriais da população lateral apresentou proliferação lenta. Estas células expressam marcador de diferenciação (CD, do inglês *cluster of differentiation*) 9, E-caderina e CD13 e diferenciam-se em estrutura glandular após mais de 5 meses numa cultura apropriada com Matrigel™, que mantém a capacidade de autorrenovação das células estaminais e também disponibiliza células funcionalmente diferenciadas que possibilitam a função do órgão (Kato *et al*, 2007).

Um outro possível marcador de células estaminais adultas endometriais é a bromodesoxiuridina (BrdU). Está descrita uma população de células que retêm bromodesoxiuridina (BrdU+), designada na literatura anglo-saxónica por *label retaining cells* (Chan & Gargett, 2006). Este método identifica células com ciclo celular lento, uma vez que apenas entram em divisão celular durante a renovação do tecido de modo a substituir as células perdidas. As células estaminais com ciclo lento retêm o BrdU no DNA sintetizado, enquanto as células que apresentam uma maior velocidade de divisão o diluem rapidamente, para níveis indetetáveis. As células epiteliais que retêm BrdU, identificadas por imunohistoquímica, representaram 3% das células endometriais do epitélio luminal de rato. Estas células não expressam recetor de estrogénios  $\alpha$ , pelo que podem representar a população responsável pelo início do desenvolvimento glandular.

As células estaminais mesenquimatosas, designadas na literatura anglo-saxónica por *mesenchymal stem cells-like*, são células com plasticidade, capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos *in vitro* (Gargett & Masuda, 2010). Relativamente às células estaminais estromais, foi descrita uma população com capacidade clonogénica que corresponde a 1,25%, com apenas 0,02% de colónias grandes, com diferenciação miofibroblástica (Chan *et al*, 2004). Ambas as colónias, pequenas e grandes, expressam marcadores de fibroblastos e algumas células expressam actina de músculo liso, o que indicia uma diferenciação miofibroblástica. Foi descrita uma subpopulação CD146<sup>+</sup>/PDGF-R $\beta$ <sup>+</sup> de células endometriais estromais que contêm propriedades de células estaminais mesenquimatosas com capacidade de diferenciação adipogénica, miogénica, condrogénica e osteoblástica (Gargett *et al*, 2008). Um estudo que utilizou um modelo animal demonstrou que no endométrio do rato a população que retém BrdU representa 6% a 9% das células estromais localizadas junto dos vasos sanguíneos próximo da zona juncional, na interface entre o miométrio e o endométrio (Chan & Gargett, 2006).

O endométrio normal de peças de histerectomia foi avaliado relativamente à expressão de CD9 e CD13 associados, respetivamente, à diferenciação glandular e estromal. As células da população lateral estavam

presentes na fração CD9<sup>-</sup> e CD13<sup>-</sup> e deram origem a células glandulares (CD9<sup>+</sup>) e estromais (CD13<sup>+</sup>) em culturas prolongadas. Assim, os marcadores CD9 e o CD13 podem ser marcadores negativos de células endometriais imaturas (Kato *et al*, 2007). As células que retêm BrdU foram estudadas no endométrio murino e verificou-se que a fração estromal apresentava alguma marcação CD31 e  $\alpha$ -actina do músculo liso ( $\alpha$ -SMA, do inglês  *$\alpha$ -smooth muscle actin*). Esta fração corresponde provavelmente a células de localização perivascular. O fenótipo estromal desta população correspondeu, na sua maioria, a antigénio 1 de células estaminais (SCA-1, do inglês *stem cell antigen-1*) negativo (SCA-1<sup>-</sup>), CD45<sup>-</sup> e recetor de estrogénios  $\alpha$ , no entanto existe uma pequena proporção SCA-1<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> e recetor de estrogénios  $\alpha$ <sup>+</sup> (Chan & Gargett, 2006).

Os marcadores de células estaminais foram descritos no endométrio humano. O fator de transcrição octâmero ligado ao fator de transcrição 4 (OCT4, do inglês *octamer-binding transcription factor 4*), que é um marcador de pluripotência de células estaminais embrionárias e adultas, foi detetado em amostras endometriais (Cervelló *et al*, 2007). A proteína MUSASHI-1 é uma proteína ligadora de ácido ribonucleico (RNA, do inglês *ribonucleic acid*) e marcador de células estaminais neuronais e de células progenitoras epiteliais que regula as vias de autorrenovação. Este marcador foi isolado no endométrio humano na camada basal durante a fase proliferativa (Gargett & Masuda, 2010). A expressão de MUSASHI-1 foi significativamente superior na fase proliferativa em comparação com a fase secretora, atingindo níveis quatro vezes superiores (Götte *et al*, 2008). A expressão foi superior no estroma (1,5 vezes) e nas glândulas (3 vezes) da camada basal comparando com a camada funcional durante a fase proliferativa (Götte *et al*, 2008). O fenótipo CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> de células estaminais hematopoiéticas foi também identificado no endométrio, no entanto o seu significado permanece por estabelecer (Gargett & Masuda, 2010).

A origem das células endometriais estaminais é uma questão ainda em debate. Alguns autores defendem que as células estaminais endometriais epiteliais e estromais têm origem em células estaminais embrionárias residuais e outros autores referem a origem em células derivadas da medula óssea (Taylor, 2004; Gargett *et al*, 2008). Estudos realizados em transplantados de medula óssea mostraram que células endometriais derivadas do dador de medula óssea foram detetadas em biópsias endometriais do recetor, por tipificação HLA, correspondendo entre 0,2% a 48% das células epiteliais e entre 0,3% a 52% das células estromais (Taylor, 2004). A medula óssea pode ser fonte de células estromais endometriais e contribui numa extensão menor para a componente epitelial, de acordo com estudo em modelo animal (Morelli *et al*, 2013). A população epitelial endometrial com retenção de BrdU não apresenta marcadores hematopoiéticos (CD45), no entanto, estes podem deixar de ser expressos no processo de diferenciação (Chan & Gargett, 2006).

No processo regenerativo endometrial, a influência hormonal pode regular as células estaminais. A expressão do recetor de estrogénios  $\alpha$  foi avaliada em modelo animal utilizando células que retêm BrdU. As células epiteliais e estromais maduras expressam recetores de estrogénios, no entanto, na população estromal



e na epitelial que retêm BrdU o mesmo não se verifica (Chan & Gargett, 2006). Alguns trabalhos demonstraram que a expressão de recetor de estrogénios nas células estromais tem influência parácrina na proliferação epitelial (Cooke *et al*, 1998). As células epiteliais com propriedades estaminais que não possuem recetores de estrogénios podem proliferar em resposta ao estímulo hormonal, no entanto, este processo é mediado pelo nicho de células estromais sensíveis (Gargett *et al*, 2008). Outros fatores podem estar associados à regulação das células estaminais, incluindo diversos fatores de crescimento utilizados em culturas sem soro bovino de colónias endometriais epiteliais e estromais, nomeadamente o EGF, o TGF- $\alpha$  e o PDGF (Chan *et al*, 2004). O IGF-1 e o HGF influenciam o crescimento das colónias de células epiteliais e o bFGF das colónias de células estromais. No entanto, reconhece-se que o bFGF também influencia o crescimento epitelial (Chan *et al*, 2004). Assim, este pressuposto aponta para a importância do microambiente estromal nas células epiteliais, como representado na Figura 2.

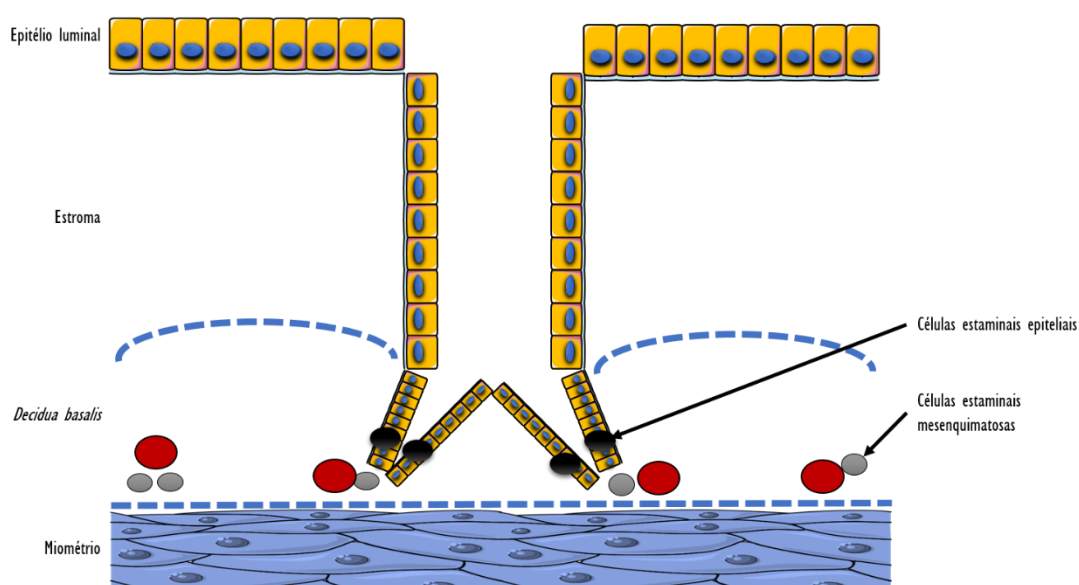


Figura 2: Esquema representativo da possível localização das células estaminais do endométrio. A camada funcional ou *decidua functionalis* é constituída por estroma e por epitélio glandular e é o local onde ocorrem os processos de proliferação, de secreção e de regeneração assim como a implantação embrionária. A camada basal ou *decidua basalis* tem como objetivo regenerar o endométrio após a fase menstrual. Nesta fase a *decidua basalis* é constituída por glândulas primordiais e por estroma denso. As células estaminais epiteliais localizam-se na camada basal na base das glândulas. As células estaminais mesenquimatosas têm uma localização perivascular na camada basal e são reguladas por células endoteliais e perivasculares. Adaptado de Gargett *et al*, 2008 e de Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*)

A hipótese para a regeneração endometrial sugere a presença de células estaminais epiteliais que não expressam recetor de estrogénios e recebem estímulos das células estromais que expressam recetores de

estrogénios, acionando processos sequenciais mediados por EGF e TGF- $\alpha$  por interação com o EGFR das células progenitoras (Gargett *et al*, 2008). As células estaminais mesenquimatosas têm uma localização perivascular, são reguladas pelas células perivascular e endoteliais, sensíveis aos recetores de estrogénios, que regulam a sua proliferação pela produção de PDGF, de EGF, de TGF- $\alpha$  e de bFGF.

## CAPÍTULO II – CONTEXTUALIZAÇÃO CLÍNICA



## Epidemiologia

O interesse da comunidade científica pelo cancro do endométrio tem vindo a aumentar nas últimas décadas uma vez que se tornou a neoplasia maligna ginecológica mais comum nos países ocidentais. O grande desafio da investigação assenta na possibilidade do diagnóstico precoce da lesão maligna ou, idealmente, numa fase pré-neoplásica, pelo menos nas mulheres que apresentam fatores de risco conhecidos. O cancro do endométrio afeta sobretudo mulheres na pós-menopausa na sexta década de vida (Ali, 2014). Nos Estados Unidos foram estimados 52630 novos casos para o ano de 2014 (Burke *et al*, 2014b). As estatísticas europeias mostram para o Reino Unido um aumento de 13,5 para 20,3 por 100000 habitantes considerando os anos entre 1993 e 2010 (Fambrini *et al*, 2014). Na Europa, os dados mais recentes disponíveis, relativos a 2012 sobre neoplasias do corpo uterino, mencionam uma incidência de 14 a 29 por 100000 e uma taxa de mortalidade de cerca de 4 por 100000 (Ferlay *et al*, 2013). O carcinoma do endométrio é a neoplasia mais frequente do corpo uterino. Os sarcomas uterinos incluindo os leiomiossarcomas, os tumores müllerianos e os sarcomas do estroma, contribuem apenas para 8% dos tumores do corpo uterino (Weiderpass *et al*, 2014). A maioria dos cancros do endométrio é diagnosticada em estádios iniciais, como os estádios I e II, de acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetria (FIGO) (Murali *et al*, 2014). As taxas de sobrevivência variam de acordo com o estadiamento da doença. Assim, aos 5 anos, a sobrevivência global para o estágio I e II é de 71% a 91%, enquanto para os estádios avançados III e IV é de 57% a 66% e de 22% a 26%, respetivamente (Murali *et al*, 2014). As mulheres de raça branca apresentam o dobro da incidência observada na raça negra, no entanto as mulheres de raça negra têm pior prognóstico o que se justifica por apresentarem tumores mais agressivos, do tipo seroso (Sorosky, 2012).

Os fatores de risco para o cancro do endométrio são conhecidos e explicam o aumento da incidência nos países ocidentais nos últimos anos, no entanto, este aumento foi acompanhado apenas por um ligeiro aumento da mortalidade (Ali, 2014). Desde 2001 que se verifica uma diminuição da taxa de mortalidade de 1,6% por ano. Este facto pode ser explicado pelo prognóstico favorável da maioria das doentes, uma vez que o diagnóstico é feito em estádios iniciais (Sorosky, 2012).

As diferenças histológicas e o comportamento clínico permitiram dividir classicamente o cancro do

endométrio em 2 tipos. Os tumores do tipo I, que representam a maioria dos câncros, são constituídos por tumores endometrioides em que o principal fator de risco é o hiperestrogenismo. Os tumores do tipo II, que são tumores sobretudo do tipo seroso, são descritos como independentes de estrogénios, associados a endométrio atrófico e derivam de carcinomas intraepiteliais (Setiawan *et al*, 2013). Os tumores do tipo I surgem, habitualmente, num contexto de desequilíbrio de estrogénios em relação à progesterona. Os estrogénios têm um papel iniciador do estímulo mitótico endometrial e, por sua vez, a progesterona reduz a concentração de recetores de estrogénios e aumenta o metabolismo do estradiol dando origem a um estrogénio menos potente, a estrona. O máximo de estímulo mitótico dos estrogénios é atingido na fase secretora inicial por uma concentração plasmática de 50 pg/mL e estímulos superiores não aumentam a atividade (Younis *et al*, 1994).

Os fatores de risco associados com o aumento de risco de cancro do endométrio incluem a menarca precoce, a nuliparidade, a menopausa tardia, a obesidade, a diabetes, a anovulação crónica, frequentemente associada à síndrome do ovário poliquístico, os tumores produtores de estrogénios e exposição ao tamoxifeno. O exemplo clássico do risco estrogénico para o endométrio é a terapêutica hormonal da menopausa com estrogénios isolados que aumenta o risco até 20 vezes (Burke *et al*, 2014b). Este risco reduz-se significativamente com a associação de progestativo em regime contínuo ou intermitente (Pike *et al*, 1997; Burke *et al*, 2014b).

A idade precoce da menarca associa-se a vários câncros ginecológicos, o que acarreta um início prematuro de ciclos ovulatórios e exposição precoce aos estrogénios. A menopausa tardia leva a exposição prolongada aos estrogénios pelo aumento do número de ciclos menstruais. Os efeitos de uma menarca precoce podem ser contrabalançados por uma menopausa mais prematura e por outro lado os efeitos de uma menopausa mais tardia podem ser equilibrados por uma menarca mais tardia (Ali, 2014).

A nuliparidade aumenta o risco de cancro do endométrio em 2 a 3 vezes (Ali, 2014). As nulíparas têm mais ciclos ovulatórios e, conseqüentemente, maior exposição a estrogénios porque não têm o período da gravidez e aleitamento. Contrariamente, a multiparidade pode reduzir o risco de cancro do endométrio até 70% (Parslov *et al*, 2000), contudo este risco é cumulativo com gestações subsequentes em cerca de 10% por nascimento (Pfeiffer *et al*, 2009). A gravidez proporciona uma alteração do equilíbrio hormonal com aumento de progesterona e diminuição dos estrogénios o que, por sua vez, diminui o estímulo mitótico (Pfeiffer *et al*, 2009). Outra teoria sugere o facto de o parto ser sede de eliminação de células com crescimento anormal o que pode explicar a diminuição do risco de cancro do endométrio em 60% para gestações após os 40 anos (Ali, 2014).

A obesidade aumenta o risco de cancro do endométrio devido ao aumento dos níveis circulantes de estrogénios, consequência do aumento da aromatização dos estrogénios endógenos no adipócito, maior

exposição a estrogénios na perimenopausa sem oposição progestativa e diminuição da globulina ligadora das hormonas sexuais (SHBG, do inglês *sex hormone-binding globulin*). O estradiol plasmático liga-se à SHBG e a fração ligada não se encontra biodisponível. As mulheres com índice de massa corporal (IMC) elevado têm níveis de SHBG diminuídos, pois estes não aumentam proporcionalmente ao incremento do IMC e, deste modo, os estrogénios ficam mais biodisponíveis (Sodergard *et al*, 1982; Sherman *et al*, 1997). Estas mulheres também têm frequentemente anovulação crónica, o que aumenta a influência estrogénica sem oposição da progesterona. A incidência de obesidade na população com cancro do endométrio atinge 70% (Courneya *et al*, 2005) e está descrito que o IMC acima de 30 kg/m<sup>2</sup> aumenta duas a três vezes o risco de carcinoma do endométrio assim como a sua mortalidade (Sorosky, 2012). A diabetes e a hipertensão arterial são comorbilidades frequentes nesta população (Soliman *et al*, 2006; Burke *et al*, 2014b). O primeiro estudo epidemiológico sobre fatores de risco para os subtipos histológicos específicos associou a obesidade com tumores endometrioides e não com os serosos (Sherman *et al*, 1997). Os últimos trabalhos demonstraram que o IMC se associa aos tumores do tipo I assim como com os tumores do tipo II (Bjørge *et al*, 2007; Setiawan *et al*, 2013). Apesar de esta associação parecer ser mais forte para os tumores do tipo I, estudos recentes apontam para fatores de risco semelhantes para o tipo I e tipo II, podendo ter vias etiopatogénicas comuns (Setiawan *et al*, 2013).

A diabetes e o hiperinsulinismo são frequentemente associados com o risco de patologia endometrial. A diabetes do tipo 2 aumenta o risco de cancro do endométrio para o dobro em comparação com a população não diabética enquanto a diabetes do tipo I pode aumentar este risco para o triplo (Friberg *et al*, 2007). O hiperinsulinismo está associado ao aumento dos níveis de estrogénios como resultado da diminuição dos níveis de SHBG, e a insulina não só estimula o crescimento do estroma endometrial através dos recetores de insulina das células endometriais como aumenta os níveis de IGF-I livres o que por sua vez estimula a proliferação de células endometriais (Friberg *et al*, 2007; Setiawan *et al*, 2013).

A síndrome do ovário poliquístico é a causa mais comum de anovulação e, consequentemente, exposição a estrogénios sem oposição, acarretando o aumento do crescimento endometrial. O risco de cancro do endométrio nestes casos pode atingir o triplo em comparação com o grupo controlo, sendo que um terço dos cancros do endométrio apresenta síndrome do ovário poliquístico (Ali, 2014). O hiperinsulinismo e a resistência insulínica estão frequentemente associados e levam a aumento da secreção de androgénios, hormona luteinizante (LH, do inglês *luteinizing hormone*) e IGF-I (Setiawan *et al*, 2013).

O tamoxifeno é um modulador seletivo dos recetores de estrogénios utilizado como hormonoterapia no cancro da mama, que tem efeito agonista no endométrio e pode aumentar o risco de cancro do endométrio em 6-8 vezes (Fisher *et al*, 1994). A maioria destes carcinomas do endométrio são endometrioides bem diferenciados e em estádios iniciais, no entanto existem relatos de tumores de alto grau e de sarcomas

(Sorosky, 2012). Este risco é maior em mulheres com mais de 50 anos e mais de 12 meses de descontinuação da terapêutica com tamoxifeno, ocorrendo em média após 33 meses (Ali, 2014).

O risco de cancro do endométrio diminui com a utilização de contraceptivos orais combinados e progestativos, independentemente da via de administração, incluindo a injetável e através do dispositivo intrauterino com progestativo (Zhou *et al*, 2008). A utilização de contraceção combinada por mais de 10 anos relaciona-se com uma redução de 80% do risco de cancro do endométrio e prolonga-se por 20 anos após suspensão (Ali, 2014). Os contraceptivos combinados reduzem o risco de lesões pré-malignas, pela diminuição de ovulações, que poderiam induzir o desenvolvimento de lesões estrogénio-dependentes. Os hábitos tabágicos conferem uma diminuição do risco de cancro do endométrio e os mecanismos que explicam este facto são o aumento do recetor de progesterona e a expressão da proteína *homeobox A10* (Zhou *et al*, 2011b). Esta proteína é essencial para a diferenciação do trato geniturinário, expressando um pico na fase luteínica como resultado da expressão de progesterona.

A doença genética representa uma minoria dos cancros do endométrio e a síndrome de Lynch ou cancro colorretal hereditário não polipoide (HNPCC, do inglês *hereditary nonpolyposis colon cancer*) contribui para cerca de 5% dos casos (Colombo *et al*, 2011; Sorosky, 2012; Burke *et al*, 2014b). Esta síndrome é autossómica dominante e corresponde a uma mutação de genes reparadores MutL homólogo 1 (MLH1, do inglês *MutL homolog-1*), da proteína MutS homóloga-2 (MSH2, do inglês *MutS protein homolog 2*), da proteína de segregação pós-meiótica-2 (PMS2, do inglês *postmeiotic segregation increased 2*) ou da proteína MutS homóloga-6 (MSH6, do inglês *MutS homolog 6*). O risco cumulativo de cancro do endométrio aos 70 anos para cada mutação é de 54% para a MLH1, 21% para a MSH2 e 16% para a MSH6 (Burke *et al*, 2014b). A mutação da fosfatase homóloga à tensina (PTEN, do inglês *phosphatase and tensin homolog*) é uma mutação comum no cancro endometrial esporádico. Esta mutação rara pode ser encontrada na síndrome de Cowden, associada ao risco de cancro da mama, da tiroide e do endométrio (Eng, 2003).

## Clínica e diagnóstico

O cancro do endométrio é habitualmente diagnosticado em estádios iniciais, em cerca de 90% dos casos, uma vez que a deteção de hemorragias uterinas e corrimento vaginal leva as doentes a recorrer aos cuidados médicos (Colombo *et al*, 2011; Burke *et al*, 2014b). Nas doentes mais idosas, a hemorragia de origem endometrial pode não ser exteriorizada por estenose do orifício interno do colo uterino, originando hematometra e pode apresentar-se como um quadro de dor pélvica secundária à contratilidade e aumento do volume uterino (Mota, 2011). O sintoma inicial raramente corresponde a um corrimento vaginal fétido e purulento devido a complicação infecciosa, piometra ou a corrimento com características aquosas, hidrorreia.



Nos estádios mais avançados os sintomas estão habitualmente ausentes ou são inespecíficos, como dor abdominal ou pélvica, distensão abdominal, alterações do trânsito intestinal ou da função vesical (Burke *et al*, 2014b). Nos casos em que as doentes são assintomáticas, a deteção de cancro do endométrio pode suceder após diagnóstico de alteração citológica esfoliativa do colo uterino, particularmente atipia de células glandulares, diagnóstico incidental em peça de histerectomia realizada devido a patologia benigna ou deteção após realização de exames complementares de diagnóstico como ecografia, tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética nuclear (RMN) com imagens suspeitas (Mota, 2011). A idade média ronda os 61 anos com um pico na faixa etária dos 50 aos 60 anos (Sorosky, 2012). Cerca de 20% dos casos são diagnosticados na pré-menopausa e apenas 5% antes dos 40 anos (Sorosky, 2012).

Na suspeita clínica de carcinoma do endométrio, a ecografia ginecológica é a primeira abordagem para a caracterização endometrial. Porém, a ecografia endovaginal, apesar de ser sensível, é pouco específica, com uma taxa elevada de falsos positivos (Fambrini *et al*, 2014). Um espessamento endometrial superior a 5 mm na pós-menopausa tem uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 54% para carcinoma do endométrio (Timmermans *et al*, 2010). Cerca de 96% das mulheres com carcinoma do endométrio tem uma espessura endometrial superior a 5 mm (Smith-Bindman *et al*, 1998).

A curetagem endometrial representa o método mais utilizado na obtenção de amostras endometriais para diagnóstico histológico. Atualmente, o procedimento recomendado para avaliar a cavidade uterina é a histeroscopia de diagnóstico com biópsia dirigida (Burke *et al*, 2014b). A histeroscopia seguida de ressecção endometrial tem uma melhor precisão para a deteção de lesões focais em comparação com a curetagem uterina, em mulheres pós-menopáusicas (Epstein *et al*, 2001). As mulheres que apresentam hemorragia vaginal na pós-menopausa têm maior risco de carcinoma do endométrio associado a pólipos endometriais (Lee *et al*, 2010b). No entanto, a realização de histeroscopia prévia à cirurgia associou-se a citologia peritoneal positiva durante a cirurgia de estadiamento (Chang *et al*, 2011). O significado clínico e o potencial de disseminação após histeroscopia são incertos, no entanto, não se verificaram modificações no prognóstico com este procedimento (Chang *et al*, 2011; Guralp & Kushner, 2011). Contudo, este pressuposto levou à omissão da citologia peritoneal do estadiamento da FIGO, revisto em 2009 (Creasman, 2009). Existem outras técnicas para obtenção de amostras realizadas em ambiente de consultório, como a aspiração com *Pipelle*<sup>®</sup>, a qual pode atingir taxas de deteção para carcinoma de 99,6% (Paul H. L. J. Dijkhuizen *et al*, 2000). No entanto, com este método pode não ser possível a obtenção de material suficiente para estudo, ocorrendo esta situação em 25% a 36% dos casos (Fambrini *et al*, 2014).

## Estadiamento

O estadiamento do cancro do endométrio segue o sistema de estadiamento da FIGO. O estadiamento clínico foi abandonado uma vez que cerca de 22% das doentes com estágio clínico I apresentavam estádios cirúrgicos superiores (Hunn *et al*, 2009). Em 1988 o *Gynecologic Oncology Group* e a *Society of Gynecologic Oncologists* recomendaram que o estadiamento cirúrgico consistisse na colheita de líquido peritoneal, histerectomia, anexectomia, linfadenectomia pélvica e para-aórtica ou biópsias de gânglios linfáticos de acordo com os fatores de prognóstico. Os fatores de prognóstico considerados foram subtipos histológicos raros como os tumores serosos-papilares, os tumores pouco diferenciados e a invasão profunda do miométrio. A disseminação preferencial dos tumores do endométrio é por via linfática através dos gânglios pélvicos e para-aórticos, tendo sido progressivamente estabelecidos algoritmos para a indicação da linfadenectomia. O estadiamento da FIGO foi revisto em 2009 e encontra-se descrito no Anexo I. Com base nesta classificação, os cancros do endométrio são diagnosticados em estágio I em 72% dos casos, no estágio II em 12% dos casos, no estágio III em 13% dos casos e no estágio IV em 3% (Sorosky, 2012).

## Exames complementares de diagnóstico

Os exames imagiológicos e os marcadores tumorais atualmente disponíveis podem ter um papel na avaliação prévia ao estadiamento cirúrgico para estratificar corretamente e planificar a intervenção cirúrgica. O marcador tumoral antigénico do cancro (CA, do inglês *cancer antigen*)-125 pode ser avaliado em pré-operatório na suspeita de doença disseminada, porém tem um valor limitado nos estádios iniciais. Os níveis séricos de CA-125 foram preditivos de doença extrauterina e correlacionou-se, independentemente, com a metastização linfática (Sood *et al*, 1997; Chung *et al*, 2006; Sorosky, 2012). O CA-125 pode ser utilizado em doentes em que não foi possível um estadiamento cirúrgico e em doentes de alto risco para doença extrauterina (Burke *et al*, 2014b). Foram descritos outros marcadores séricos como a calprotectina e o fator de crescimento e diferenciação 15 em doentes com carcinoma do endométrio associado a fenótipos agressivos (Salvesen *et al*, 2012).

Os exames de imagiologia podem ser utilizados para a planificação pré-operatória no cancro do endométrio. Não existe consenso quanto aos exames imagiológicos recomendados para avaliação da extensão local da doença e a avaliação de rotina varia nos diversos países e nas diversas instituições. As recomendações do *National Cancer Network* para neoplasias uterinas consideram apenas, como obrigatória, a radiografia do tórax (Epstein & Blomqvist, 2014). O mesmo grupo sugere a realização de RMN na suspeita de invasão cervical. A tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *positron emission tomography*), TC e RMN são reservadas para os casos de suspeita de disseminação extrauterina. Este tipo de exames permitem

uma estratificação do risco de modo a que as doentes possam ser selecionadas para uma cirurgia mais radical, e podem evitar o sobretratamento em doente de baixo risco. Os métodos imagiológicos permitem a avaliação da doença locorregional, nomeadamente a avaliação da profundidade de invasão do miométrio, da extensão cervical, da invasão de gânglios linfáticos e do envolvimento anexial. A TC e a RMN não são recomendadas por rotina na avaliação pré-operatória (Sorosky, 2012). A RMN pélvica foi recomendada pela *European Society of Radiology* para a planificação do tratamento, no entanto o estudo extemporâneo deve ser realizado para a orientação definitiva do tipo de cirurgia (Lee *et al*, 2015).

Vários estudos avaliaram a utilidade dos métodos imagiológicos. Um desses estudos demonstrou que a RMN, na deteção da profundidade de invasão miometrial, tem uma sensibilidade de 87% e uma especificidade de 58% (Wu *et al*, 2013b). Outro trabalho reportou uma sensibilidade e uma especificidade de 77% e de 88%, respetivamente (Duncan *et al*, 2012). O valor preditivo negativo para invasão miometrial é elevado, no entanto a taxa de falsos positivos correspondentes a ausência de invasão miometrial pode atingir 40% (Sorosky, 2012). A maior limitação da RMN é na avaliação da invasão ganglionar. O critério de identificação de gânglios metastáticos na TC e na RMN é a sua dimensão, considerando-se adenopatia quando o menor diâmetro transversal é superior a 10 mm (Freeman *et al*, 2012). No carcinoma do endométrio, mais de 50% dos gânglios metastáticos têm dimensões inferiores (Sorosky, 2012; Epstein & Blomqvist, 2014), o que confere à TC e à RMN uma sensibilidade de 27% a 66% e uma especificidade de 73% a 99% para a deteção de metastização ganglionar, respetivamente (Burke *et al*, 2014b). Se se considerar apenas o diagnóstico de adenopatia pélvica, a RMN mostrou uma sensibilidade de 64% e uma especificidade de 96% (Duncan *et al*, 2012). Para a invasão do estroma cervical, a RMN teve uma sensibilidade de 42% com uma especificidade de 97% (Duncan *et al*, 2012).

A avaliação pré-operatória por PET realizada com <sup>18</sup>F-FDG para metastização ganglionar é mais sensível do que a TC e que a RMN isoladas (Lee *et al*, 2015). A PET pode ser realizada na suspeita de doença disseminada e a associação da PET a TC permitiram a interposição de duas imagens para melhorar a informação diagnóstica. A PET com <sup>18</sup>F-FDG permitiu inferir acerca da invasão ganglionar com maior precisão que a RMN, 69% *versus* 46% (Park *et al*, 2008b). Uma metanálise recente evidencia que a avaliação dos índices de captação semi-quantitativos, designados por SUV (do inglês *standardized uptake value*), com PET com <sup>18</sup>F-FDG são superiores em doentes de alto risco mas o seu valor ainda é limitado na estratificação do risco (Ghooshkhanei *et al*, 2014).

A taxa de falsos negativos dos meios complementares, incluindo a RMN, a TC e a PET não permite utilizar estas técnicas por rotina de modo a omitir o estadiamento cirúrgico (Burke *et al*, 2014b). O método com melhor precisão para avaliar a invasão miometrial é a RMN, no entanto é limitada para a avaliação de doença extrauterina, assim como os outros meios, que acarretam um acréscimo de custos e cujo benefício é

controverso. Os exames imagiológicos podem ser utilizados na avaliação de doentes que apresentam metastização extrauterina assim como na avaliação da invasão dos gânglios abdomino-pélvicos, quando a cirurgia não é opção como tratamento inicial, o que sucede em 3% a 5% das doentes (Lee *et al*, 2015). Nestas doentes, que já dispõem de diagnóstico histológico de alto risco, a PET com <sup>18</sup>F-FDG pode identificar doença à distância, limitando a morbilidade do estadiamento cirúrgico. Nas doentes com comorbilidades ou com invasão da bexiga ou do intestino, a RMN permite delinear a opção no tratamento inicial.

### Classificação histológica e fenotípica

Os tumores do corpo uterino incluem tumores epiteliais, tumores mistos, tumores mesenquimatosos, doenças do trofoblasto gestacional e tumores não classificados. Os carcinomas epiteliais constituem a maioria dos tumores do corpo uterino e correspondem aos carcinomas do endométrio do tipo endometriode, seroso, de células claras, mucinoso, de células escamosas, de células de transição, de pequenas células e indiferenciados (Murali *et al*, 2014). O grupo dos tumores mistos representa tumores com componentes epiteliais e mesenquimatosos, como os carcinosarcomas e o dos tumores mesenquimatosos inclui os tumores do estroma endometrial e os tumores do músculo liso (Murali *et al*, 2014). A estratificação patológica do cancro epitelial do endométrio, descrita inicialmente por Bokhman, divide os carcinomas do endométrio em dois tipos, os de tipo I e os de tipo II, conforme sistematizado na Tabela I (Bokhman, 1983).

Os carcinomas do tipo I representam adenocarcinomas endometrioides o que corresponde a 80-90% dos carcinomas do endométrio, são bem diferenciados e são constituídos por glândulas endometriais semelhantes ao tecido endometrial normal. Os tumores endometrioides são massas proeminentes na cavidade endometrial, e quanto à sua origem, a maioria tem início no fundo uterino e menos frequentemente junto aos cornos e no segmento inferior (Muggia & Oliva, 2009). Os adenocarcinomas endometrioides são proliferações celulares semelhantes à fase proliferativa com glândulas tubulares, superfície luminal estreita e invasão do estroma. Os carcinomas endometrioides estão associados a diferenciação escamosa em 15% a 25% dos casos (Zaino *et al*, 1991), enquanto a variante fibroglandular, com células dispostas ao longo de eixos fibrovasculares, representa uma escassa percentagem. O carcinoma secretor, muito raro, é constituído por glândulas com vacúolos, com arquitetura glandular uniforme e com rara atipia celular. O grau de diferenciação permite avaliar a distorção arquitetural e a atipia celular. Nos tumores de grau I menos de 5% do componente é sólido, a arquitetura glandular está preservada e a atipia celular é escassa enquanto nos tumores de grau 2 a componente sólida varia de 6% a 50% do tumor e nos de grau 3 mais de 50% do tumor é sólido com poucas estruturas glandulares e atipia citológica extensa (Muggia & Oliva, 2009; Mota, 2011; Sorosky, 2012).

Tabela I: Classificação clínica e patológica dos carcinomas do endométrio. Adaptado de Murali *et al*, 2014.

	Tipo I	Tipo II
Porcentagem	80-90%	10-20%
Idade	61 anos	>70 anos
Patologia endometrial	Hiperplasia	Atrofia
Dependente de estrogénios	Sim	Não
Obesidade, dislipidemia e diabetes	Sim	Não
Tipo histológico	Endometrióide	Seroso e células claras
Grau tumoral	Baixo (G1,2)	Alto (G3)
Invasão miometrial	Superficial	Profunda
Invasão linfovascular	Baixa	Alta
Estádio no diagnóstico	FIGO I-II	FIGO III-IV
Prognóstico	Favorável	Desfavorável
Mutação <i>PTEN</i>	52-78%	1-11%
Mutação <i>PIK3CA</i>	36-52%	24-42%
Mutação <i>PIK3R1</i>	21-43%	0-12%
Mutação <i>KRAS</i>	15-43%	2-8%
Mutação <i>ARID1A</i>	25-43%	6-11%
Mutação <i>CTNNB1</i>	23-24%	0-3%
Mutação <i>P53</i>	9-12%	60-91%
Mutação <i>PPP2R1A</i>	5-7%	15-43%
Amplificação <i>HER2</i>	0	27-44%
Instabilidade dos microssatélites	28-40%	0-2%

Abreviaturas: *PTEN*, fosfatase homóloga à tensina; *PIK3CA*, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-cinase; *PIK3R1*, subunidade reguladora-1 fosfoinositido-3-cinase; *KRAS*, oncogene homólogo do sarcoma do rato Kirsten; *ARID1A*, domínio de interação rico em AT da proteína-1A; *CTNNB1*, gene  $\beta$ -catenina; *PPP2R1A*, serina/treonina proteína fosfatase-2A; *HER2*, recetor-2 do fator de crescimento epidérmico humano.

Os tumores do tipo I são dependentes de estrogénios e derivam de hiperplasias endometriais (Colombo *et al*, 2011). As hiperplasias foram classificadas como hiperplasias simples ou complexas, com ou sem atipia celular, sendo que as hiperplasias complexas com atipia têm um risco de 29% de progressão para carcinoma (Sorosky, 2012). O diagnóstico histológico de hiperplasia endometrial atípica, que inclui as hiperplasia simples e a complexa com atipia, mostrou-se pouco reprodutível, com uma concordância de apenas 40% entre patologistas (Zaino *et al*, 2006). A prevalência de carcinoma em peças de histerectomia, cuja biópsia prévia revelou hiperplasia com atipia, chega a atingir os 40% (Trimble *et al*, 2006). O conceito de neoplasia endometrial intraepitelial foi introduzido para substituir a terminologia prévia e é um precursor de adenocarcinoma do endométrio com uma caracterização histológica distinta (Mutter, 2000; Baak *et al*, 2005).

A classificação utiliza uma avaliação citológica padronizada combinada com a distribuição topográfica e o crescimento monoclonal o que permite melhorar a reprodutibilidade do diagnóstico de hiperplasia complexa com atipia (Mutter *et al*, 2007). Do ponto de vista imunofenotípico, os tumores do tipo I têm expressão de

pancitoqueratinas, do antigénio epitelial de membrana (EMA, do inglês *epithelial membrane antigen*), do CA-125, do Ber-EP4 (do inglês *epithelial antigen antibody*), do B72.3 (do inglês, *tumor associated glycoprotein-72*), da citoqueratina (CK, do inglês *cytokeratin*)-7, da vimentina e normalmente não expressam CK20 e, raramente, mostram marcação citoplasmática difusa para o antigénio carcino-embriónico (CEA, do inglês *carcinoembryonic antigen*) (Chiang & Soslow, 2014). Estes tumores expressam, difusamente, recetores de estrogénios e recetores de progesterona nos tumores de grau I enquanto essa expressão pode ser inferior a 50% nos de grau 3 (Muggia & Oliva, 2009). Quanto à P53, a sua sobre-expressão está descrita em cerca de um terço dos tumores de grau 3 e está praticamente ausente nos de grau I. A expressão da P16 aumenta com o aumento do grau histológico (Muggia & Oliva, 2009).

De acordo com o fenótipo molecular foi descrita a existência de instabilidade dos microssatélites (MSI, do inglês *microsatellite instability*), de mutações dos genes PTEN, da fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinase (PIK3CA, do inglês *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*), do oncogene homólogo do sarcoma do rato Kirsten (KRAS, do inglês *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) e da  $\beta$ -catenina (Murali *et al*, 2014). As proteínas reparadores de DNA, como a MLH1, a MSH2, a MSH6 e a PMS2 podem ter anomalias de expressão em cerca de 30% dos tumores endometrioides (Chiang & Soslow, 2014). O gene promotor de hipermetilação MLH1, também foi descrito em tumores esporádicos e está mutado no HNPC ou síndrome de Lynch (Murali *et al*, 2014).

Os tumores do tipo II, sobretudo os serosos e os de células claras, são independentes de estrogénios e estão associados a atrofia endometrial. Estes tumores traduzem-se por uma espessura normal do endométrio ou espessamento ligeiro e podem estar contidos em pólipos endometriais. Os tumores avançados penetram no miométrio e estendem-se aos tecidos adjacentes. Os tumores do tipo II têm mutações da P53, da serina/treonina cinase-15 (STK15, do inglês *serine/threonine kinase-15*) e apresentam sobre-expressão do recetor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2, do inglês *Human Epidermal growth factor Receptor 2*), sobre-expressão de P16 e subregulação ou perda de E-caderina e perda de heterozigotia (LOH, do inglês *loss of heterozygosity*) (Llauradó *et al*, 2012).

O carcinoma seroso representa 4% a 5% dos carcinomas do endométrio e tem um comportamento semelhante aos carcinomas do ovário e da trompa com disseminação peritoneal (Murali *et al*, 2014). O termo seroso refere-se a características partilhadas com o alinhamento celular das trompas de Falópio e estes tumores possuem eixos fibrovasculares e são circundados por células atípicas com distribuição em coluna e tendência a formar papilas. A superfície luminal é irregular e com indentações e as células apresentam marcada atipia, elevada relação núcleo/citoplasma, núcleo aumentado e irregular, dispõem-se em tufo e destacam-se em pequenos agregados (Muggia & Oliva, 2009). Os carcinomas serosos expressam frequentemente pancitoqueratinas, EMA, CA125, Ber-EP4, B72.3, CK7 e vimentina, são negativos para a CK20

e raramente têm expressão citoplasmática difusa para CEA, do mesmo modo que os carcinomas endometrioides (Chiang & Soslow, 2014). Os recetores de estrogénios e os recetores de progesterona têm uma expressão baixa ou mesmo ausente (Darvishian *et al*, 2004). A expressão de P53 é difusa e descrita em cerca de 90% dos serosos e o índice de proliferação, que pode ser avaliado pela expressão de Ki-67 e da P16, revelam estar habitualmente aumentados (Zannoni *et al*, 2010).

Os carcinomas de células claras representam apenas 2% dos carcinomas do endométrio e podem manifestar espessamento endometrial quando associados ao subtipo endometriode. No entanto, as formas puras ou associadas a tumores serosos encontram-se em pólipos e apresentam invasão profunda do miométrio. Os tumores de células claras são constituídos por células atípicas com núcleo grande e pleomórfico e nucléolo proeminente com citoplasma abundante, claro e em alguns casos eosinófilo (Mota, 2011). A arquitetura está pouco preservada podendo apresentar padrão papilar, tubular, tubulo-quístico, sólido ou misto (Muggia & Oliva, 2009). Do ponto de vista imunofenotípico expressam pancitoqueratinas, vimentina, BCL2 (do inglês *B-cell lymphoma 2*) e o CA-125 e, raramente, marcação difusa citoplasmática para CEA (Chiang & Soslow, 2014). Estes tumores expressam a CK7 e são negativos para a CK20. O padrão de recetor de estrogénios e de recetor de progesterona, embora ainda com dados contraditórios, parece ser fraco ou focal e a P53 tem uma expressão menor que nos serosos, assim como a P16, mas superior à dos endometrioides. A expressão do fator nuclear de hepatócito-1 $\beta$  (HNF-1 $\beta$ , do inglês *hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$* ) no carcinoma de células claras do endométrio é semelhante à dos cancros do ovário, isto é, difusa, com marcação nuclear moderada a intensa (Yamamoto *et al*, 2007).

Os tumores mistos referem-se a um padrão histológico com, pelo menos, dois tipos de tumores endometriais em que um dos componentes constituiu pelo menos 10% do tumor (Muggia & Oliva, 2009). Os carcinomas escamosos, também raros, só podem ser considerados após exclusão de hiperplasia ou de componente endometriode e são indiferenciados e associados a estenose cervical. Os carcinomas de células de transição são extremamente raros e assemelham-se ao carcinoma do urotélio de células de transição, com arquitetura papilar. O carcinoma de pequenas células é idêntico aos carcinomas de pequenas células neuroendócrino com origem noutros órgãos (Muggia & Oliva, 2009). Os carcinomas mucinosos são muito raros e contêm células com mucina no citoplasma. Os restantes carcinomas do endométrio são indiferenciados, com expressão limitada de citoqueratinas, mas com marcação intensa por queratina AE1/AE3, por CAM5.2, por EMA e por CK18 e os recetores hormonais estão frequentemente ausentes (Chiang & Soslow, 2014).

## Classificação molecular

A classificação dualista do cancro do endométrio revelou imperfeições no que concerne à evolução clínica e a fatores de prognóstico. Os tumores do endométrio são heterogêneos e a classificação clássica é claramente limitada, existindo uma falta de correlação com a resposta terapêutica e com o prognóstico. Recentemente foi proposta uma classificação genómica capaz de ultrapassar estas limitações. O objetivo é existir um sistema de classificação capaz de proporcionar um tratamento individualizado efetivo. Os genes e as vias moleculares candidatos à classificação molecular do cancro do endométrio foram sobretudo estudados para tumores endometrioides devido à sua prevalência. As alterações moleculares descritas para os carcinomas endometrioides incluem a MSI, mutações dos genes *PTEN*, *KRAS*, *PIK3CA* e da  $\beta$ -catenina (Llauradó *et al*, 2012). Estas alterações podem estar envolvidas na transformação maligna, já que foram detetadas em lesões pré-malignas e parecem ser responsáveis pela progressão tumoral (Llauradó *et al*, 2012).

As alterações dos genes reparadores de DNA e a MSI estão descritas nos tumores endometrioides, particularmente a hipermetilação do promotor MLH1 (Murali *et al*, 2014). As primeiras mutações destes genes foram reportadas no HNPCC. As mutações das linhas celulares germinativas hMLH-2, MLH-1 e hMLH-6 foram associadas com carcinomas endometrioides (Llauradó *et al*, 2012). Alguns proto-oncogenes foram descritos no cancro do endométrio, como o *KRAS*, o *HER2/neu*, o *PIK3CA* e da  $\beta$ -catenina. O gene *KRAS*, está envolvido em mais de 30% dos tumores endometrioides (Llauradó *et al*, 2012). Esta mutação deriva da transformação da hiperplasia simples em complexa, sendo um marcador de progressão para carcinoma. O HER2, membro da família de recetores de tirosina cinase, é importante no processo de proliferação celular considerando a via da cinase Ras-Raf-MAP e PI3K e subregulação das proteínas da via serina/treonina cinase, particularmente a proteína cinase B (AKT, do inglês *protein kinase B*). Esta associação é descrita em cerca de 30% dos tumores não endometrioides, incluindo os serosos e os de células claras (Llauradó *et al*, 2012). A perda de expressão da E-caderina foi descrita em até 50% dos tumores endometrioides e em próximo de 80% dos carcinomas serosos (Murali *et al*, 2014), salientando-se alterações na transcrição devido à sua acumulação nuclear (Schlosshauer *et al*, 2002; Moreno-Bueno *et al*, 2003). A perda de E-caderina leva a diminuição da expressão de  $\beta$ -catenina livre no citoplasma.

Os genes supressores tumorais protegem as células do crescimento descontrolado. As células tumorais possuem mutações em diversas vias que envolvem este tipo de genes, como a via PI3K/AKT/mTOR, descrita na Figura 3, que regula o crescimento celular e a sobrevivência e a via de sinalização WNT/ $\beta$ -catenina (Murali *et al*, 2014). O gene PTEN é um regulador negativo na via de sinalização PI3K/AKT/mTOR e está mutado em cerca de 80% dos carcinomas endometrioides (Cheung *et al*, 2011; McConechy *et al*, 2012). Esta alteração funcional está inclusivamente associada com hiperplasia endometrial atípica e com eventos precoces da patogénese do cancro.



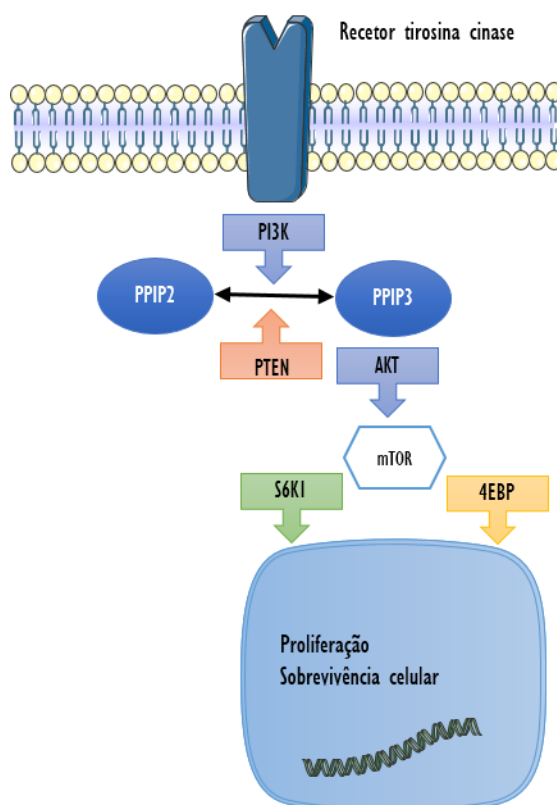


Figura 3: Via de sinalização PI3K/AKT/mTOR. A PI3K fosforila o PIP2 em PIP3 que recruta e fosforila AKT que é um ativador mTOR. O mTOR é um ativador da S6KI e da 4EBP que regulam a proliferação celular. Abreviaturas: PI3K, fosfatidilinositol 3-cinase; PTEN, fosfatase e tensina homóloga; PIP2, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PIP3, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato; AKT, proteína cinase B; mTORc, proteína alvo da rapamicina; 4EBP, do inglês *elF4E binding protein*; S6KI, do inglês *ribosomal protein S6 kinase  $\beta$ -1*. Adaptado de Umene et al. 2013, Westin e Broaddus 2012 e de Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

O gene supressor tumoral *TP53* está frequentemente mutado nos tumores serosos, atingindo os 90% e em cerca de 30% dos endometrioides de alto grau (Tashiro *et al*, 1997; Jia *et al*, 2008). A mutação do gene supressor tumoral *ARID1A* (do inglês *AT-rich interactive domain-containing protein 1A*) origina perda de expressão da proteína BAF250a, por este codificada, que está presente em cerca de 40% dos tumores endometrioides (Llauradó *et al*, 2012). Este perfil foi também verificado em outros tumores ginecológicos, particularmente nos tumores endometrioides e nos de células claras do ovário assim como nos tumores gástricos. O gene da serina/treonina proteína fosfatase-2A (*PPP2RIA*, do inglês *serine/threonine-protein phosphatase-2A*) foi associado a mais de 40% dos tumores serosos (Murali *et al*, 2014).

O *Cancer Genome Atlas Research Network* desenvolveu um estudo em que integrou tecnologias de genômica, transcriptômica e proteômica para avaliar uma série de carcinomas do endométrio. Foram utilizadas técnicas de sequenciação de última geração que analisaram a metilação de DNA, assim como um

array de proteínas de fase reversa e a MSI (Network *et al*, 2013). O estudo incluiu 373 carcinomas do endométrio, dos quais 307 eram endometrioides, 53 eram serosos e 13 eram mistos, endometrioides e serosos. A classificação genómica estratificou quatro categorias, descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Classificação molecular definida pelo *Cancer Genome Atlas Research Network* para os carcinomas endometrioides e serosos.

	POLE (ultramutado)	POLE (hipermutado)	Número de cópias baixo (endometriode)	Número de cópias elevado (seroso)
Aberrações de número de cópia	Baixo	Baixo	Baixo	Alto
MSI/ metilação MLHI	MSI mista, alta baixa e estável	MSI alta	MSI estável	MSI estável
Taxa mutações	Muito alta	Alta	Baixa	Baixa
Genes mutados (prevalência)	<i>POLE</i> (100%) <i>PTEN</i> (94%) <i>PIK3CA</i> (71%) <i>PIK3RI</i> (65%) <i>FBXW7</i> (82%) <i>ARIDIA</i> (76%) <i>KRAS</i> (53%) <i>ARID5B</i> (47%)	<i>PTEN</i> (88%) <i>RPL22</i> (37%) <i>KRAS</i> (35%) <i>PIK3CA</i> (54%) <i>PIK3RI</i> (40%) <i>ARIDIA</i> (37%)	<i>PTEN</i> (77%) <i>CTNNB1</i> (52%) <i>PIK3CA</i> (53%) <i>PIK3RI</i> (33%) <i>ARIDIA</i> (42%)	<i>TP53</i> (92%) <i>PPP2R1A</i> (22%) <i>PIK3CA</i> (47%)
Tipo histológico	Endometriode	Endometriode	Endometriode	Seroso, endometrioides e mistos
Grau do tumor	Misto (grau 1-3)	Misto (grau 1-3)	Grau 1 e 2	Grau 3
Prognóstico	Favorável	Intermédio	Intermédio	Desfavorável

Abreviaturas: MSI, instabilidade dos microssatélites; MLHI, MutL homólogo 1; PTEN, fosfatase homóloga à tensina; PIK3CA, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-cinase; PIK3RI, subunidade reguladora-I fosfoinositido-3-cinase; FBXW7, domínio F-box/WD repetido contendo proteína 7; KRAS, oncogene homólogo do sarcoma do rato Kirsten; ARIDIA, domínio de interação rico em AT da proteína-1A; ARID5B, domínio de interação rico em AT da proteína-5B; CTNNB1, gene  $\beta$ -catenina; PPP2R1A, serina/treonina proteína fosfatase-2A.

## Tratamento cirúrgico

O tratamento de primeira linha para o cancro do endométrio é cirúrgico, sendo fundamental para um estadiamento adequado da doença e estratificação da necessidade de terapêutica adjuvante. A histerectomia total com remoção das trompas e dos ovários tem sido a base do tratamento cirúrgico do cancro uterino. Desde o final da década de 80 do século XX que a linfadenectomia integrou o estadiamento cirúrgico, com implicações prognósticas importantes. Os objetivos do estadiamento cirúrgico são o diagnóstico, o prognóstico

e a seleção de doentes para tratamento adjuvante. Mesmo após a revisão da classificação da FIGO de 2009, a recomendação para a abordagem do cancro do endométrio continua a ser a histerectomia total associada a anexectomia bilateral e a linfadenectomia pélvica e para-aórtica. A histerectomia extra-fascial é a técnica recomendada associada à anexectomia de modo a excluir a metastização anexial e os tumores primários síncronos, para além da eliminação da fonte de estrogénios que estimulam o crescimento endometrial (Hunn *et al*, 2009). A linfadenectomia pélvica consiste na remoção dos gânglios da metade caudal da artéria e da veia ilíacas externas e da metade caudal da gordura obturadora anterior ao nervo obturador. As cavidades abdominal e pélvica devem ser exploradas, incluindo as goteiras parieto-cólicas, o fígado, o diafragma, o baço, o epíploon, os gânglios para-aórticos e a avaliação do intestino, devendo ser biopsadas todas as lesões suspeitas. A linfadenectomia para-aórtica consiste na remoção dos gânglios da parte caudal da veia cava inferior e remoção dos gânglios entre a aorta e o ureter esquerdo até à artéria ilíaca comum (Burke *et al*, 2014b).

A via de abordagem clássica para o estadiamento cirúrgico é a laparotomia, no entanto nos últimos anos a abordagem laparoscópica tem sido uma opção vantajosa. A histerectomia vaginal e anexectomia bilateral assistida por laparoscopia (LAVH, do inglês *laparoscopic assisted vaginal hysterectomy*) assim como a histerectomia total laparoscópica (TLH, do inglês *total laparoscopic hysterectomy*) com anexectomia bilateral têm sido progressivamente mais utilizadas no carcinoma do endométrio. O *Gynecologic Oncology Group* promoveu um ensaio clínico randomizado que comparou a laparoscopia com a laparotomia no estadiamento cirúrgico do cancro do endométrio (Walker *et al*, 2009). O tempo operatório foi superior na laparoscopia e a conversão ocorreu em 25,8% dos casos por fraca exposição. A laparoscopia associou-se a menos complicações graves ou moderadas no pós-operatório e as complicações intraoperatórias foram semelhantes, com menor tempo de internamento, menos analgesia e melhoria da qualidade de vida (Colombo *et al*, 2011). A taxa de recorrência não mostrou inferioridade da laparoscopia e a taxa de sobrevivência do cancro do endométrio também não foi influenciada pela via de abordagem (Palomba *et al*, 2009). A cirurgia robótica parece ter as mesmas vantagens da laparoscopia em relação à laparotomia, no entanto é uma técnica disponível em pouco centros e que necessita de estudos randomizados mais consistentes, nomeadamente em termos de custo-benefício. A histerectomia vaginal pode ser uma opção em doentes com elevado risco cirúrgico e comorbilidades que não tolerariam a cirurgia laparoscópica ou laparotómica (Burke *et al*, 2014b).

O *National Comprehensive Cancer Network* considerou que a remoção dos gânglios é recomendada e que a remoção seletiva de acordo com avaliação macroscópica e palpação não tem precisão uma vez que podem existir poucos gânglios mas estarem maciçamente envolvidos (Hunn *et al*, 2009; Burke *et al*, 2014b). O *American College of Obstetrics and Gynecology* e a *Society of Gynecologic Oncologists* recomendaram que

todas as doentes com cancro do endométrio devem ser submetidas a linfadenectomia, no entanto este procedimento apenas foi realizado em 30% das doentes (Roland *et al*, 2004; ACOG practice bulletin, 2005). As indicações definitivas para a linfadenectomia no cancro do endométrio não são claras e permanece em discussão se todas as doentes devem realizar linfadenectomia ou apenas as de alto risco. A grande controvérsia surge em doentes em estádios iniciais em que a morbilidade do procedimento não justifica a intervenção (Hidaka *et al*, 2007). A linfadenectomia integra o estadiamento do cancro do endométrio, mas não está claramente definida como procedimento com intuito terapêutico (Hunn *et al*, 2009). Classicamente os fatores de estratificação do risco são o alto grau, o subtipo histológico de alto risco e a invasão miometrial avaliada no estudo extemporâneo. Um estudo demonstrou que os gânglios para-aórticos podem estar envolvidos em 1% a 1,6% quando os pélvicos são negativos, independentemente do grau do tumor (Abu-Rustum *et al*, 2009a). No entanto, o risco de invasão ganglionar está associado com os tumores de alto risco e com metastização para-aórtica sem metastização pélvica foi descrita em 16%, mencionando a necessidade de progredir com a linfadenectomia até à emergência dos vasos renais (Mariani *et al*, 2008). Os autores deste estudo concluíram que os tumores de baixo risco não beneficiam de linfadenectomia sistemática, incluindo os tumores endometrioides de grau I e de grau 2, com invasão miometrial inferior a 50% e tumores com dimensões inferiores a 2 cm. Outro estudo demonstrou não haver benefícios na sobrevivência com a realização de linfadenectomia em tumores de grau I no estágio I (Chan *et al*, 2006). A sobrevivência absoluta e relativa, respetivamente, aos 5 anos foi de 85% e 93,7% sem linfadenectomia e 88,2% e 93,9% com linfadenectomia para a doença de baixo risco; a taxa de recorrência foi de 8,5% *versus* 5,6%, respetivamente sem linfadenectomia e com linfadenectomia (Zuurendonk *et al*, 2006). Um estudo randomizado com mais de 500 mulheres com cancro do endométrio no estágio I demonstrou sobrevivência e intervalo livre de doença semelhantes entre o grupo de mulheres submetidas a linfadenectomia pélvica e o grupo sem linfadenectomia (Panici *et al*, 2008). Mais tarde, como resultado de um ensaio clínico realizado em vários centros da Europa, recomendou-se que a linfadenectomia pélvica sistemática no estágio I não deve ser realizada por rotina (Barton *et al*, 2009). A avaliação pré-operatória e intraoperatória do grau tumoral também pode não ter precisão suficiente, constatando-se maior grau histológico em 30% dos casos após a análise da peça operatória (Hunn *et al*, 2009). Este dado pode levantar controvérsia relativamente à adequada catalogação pré-operatória de um tumor de baixo risco.

A extensão anatómica é outra questão controversa na linfadenectomia retroperitoneal. A presença de gânglios pélvicos invadidos pode indiciar metastização para-aórtica em 40% a 57% dos casos, no entanto, a metastização para-aórtica isolada pode estar presente sem gânglios pélvicos envolvidos (Mariani *et al*, 2008; Hunn *et al*, 2009). A literatura tem mencionado que a disseção para-aórtica deve ser executada até à emergência da artéria mesentérica inferior (Hunn *et al*, 2009). No entanto, a presença de metastização

acima desta emergência pode escapar à deteção na linfadenectomia em cerca de 40%, justificada pela drenagem dos vasos ováricos (Mariani *et al*, 2008).

A linfadenectomia pélvica está associada a complicações como o linfedema, que podem atingir 6% dos casos (Burke *et al*, 2014b). A técnica do gânglio sentinela, já aprovada para outros tumores como os da mama e o da vulva, permite limitar esta complicação assim como um estudo mais detalhado do gânglio sentinela de modo a melhorar a deteção de metástases. O gânglio sentinela é definido como o gânglio com maior probabilidade de envolvimento pelo tumor primário e a sua negatividade associa-se à ausência de metastização ganglionar. A biópsia do gânglio sentinela no cancro do endométrio, utilizando injeção cervical de um radiofármaco para linfocintigrafia e de corante azul para linfografia, foi associada a uma taxa de deteção de 84% (Abu-Rustum *et al*, 2009b). A injeção histeroscópica de um radiofármaco para linfocintigrafia foi testada e comparada com a injeção cervical, sendo este último local de injeção mais sensível para a deteção do gânglio sentinela (Niikura *et al*, 2013). No entanto a via histeroscópica parece permitir a identificação do gânglio sentinela nos gânglios para-aórticos (Solima *et al*, 2012). Esta técnica pode ser uma solução para tumores em estágio inicial, e representou um estadiamento superior em 10% das doentes de baixo risco e 15% com risco intermédio (Ballester *et al*, 2011). O aperfeiçoamento de todos os pormenores técnicos e a seleção das doentes são aspetos que necessitam de mais dados (Burke *et al*, 2014b).

Os estádios avançados são habitualmente tratados com cirurgia, quimioterapia e radioterapia. A cirurgia citorrredutora mostrou melhorar a sobrevivência e a progressão livre de doença, sendo considerada um fator independente de prognóstico (Barlin *et al*, 2010). A dimensão da doença residual influencia a sobrevivência. Assim, a doença residual inferior a 1 cm correspondeu a uma sobrevivência de 15 meses, enquanto a doença microscópica correspondeu a 40 meses (Bristow *et al*, 2000). A sobrevivência no estágio IV foi de 40 meses sem doença residual e de 19 meses com algum tipo de doença residual, sendo que a sobrevivência foi semelhante em situações de doença macroscópica com mais de 2 cm e menos de 2 cm (Shih *et al*, 2011).

Os carcinomas serosos e de células claras devem ser alvo de estadiamento semelhante ao do cancro do ovário, isto é, a omentectomia e as biópsias do abdómen superior devem estar incluídas. O carcinoma seroso pode ser multifocal e a doença à distância pode ser detetada na ausência de invasão miometrial (Sorosky, 2012).

A avaliação do risco após o estadiamento cirúrgico permite estratificar a necessidade de tratamento adjuvante. O grupo de baixo risco incluiu os adenocarcinomas endometrioides de grau 1 e de grau 2 e infiltração miometrial inferior a 50%; o grupo de risco intermédio corresponde a adenocarcinomas endometrioides de grau 1 e de grau 2 e infiltração miometrial superior a 50% ou adenocarcinomas

endometrioides de grau 3 com infiltração miometrial inferior a 50%; no grupo de alto risco surgem os adenocarcinomas não endometrioides, os adenocarcinomas endometrioides de grau 3 com infiltração miometrial superior a 50% (Salvesen *et al*, 2012). Para além destes fatores, a presença de gânglios metastáticos após o estadiamento cirúrgico e invasão cervical agravam o prognóstico.

### Radioterapia

A radioterapia é utilizada para destruir as células tumorais ou alterar a arquitetura do binómio tumor/estroma, com intuito curativo ou paliativo. A utilização da radioterapia no cancro baseia-se no princípio de que a radiação ionizante origina lesões no DNA que ultrapassam a capacidade celular de reparação, que é inferior nas células tumorais (Hubenak *et al*, 2014). A radioterapia atua segundo dois tipos de efeitos, o efeito direto em que a radiação ionizante provoca diretamente a lesão do DNA, e o efeito indirecto em que a lesão do DNA se deve à produção de radicais livres como espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), sendo este último o efeito predominante. A eficácia da radioterapia é determinada pela relação entre os danos no tecido tumoral e no tecido normal. A resposta das células à radiação ionizante depende de fatores como a proliferação celular, a hipoxia tecidual, a percentagem de células estaminais, o microambiente tumoral, a diferenciação tumoral e a radiosensibilidade das células tumorais (Belka *et al*, 2004).

No cancro do endométrio a parte superior da vagina e a cúpula vaginal são o primeiro local de recorrência e a radioterapia adjuvante pós-operatória pode reduzir este risco (Kong *et al*, 2012a). A radioterapia externa e a braquiterapia têm sido utilizadas com este intuito. A primeira consiste na administração de radiação ionizante utilizando um acelerador linear, sendo assim a fonte externa ao corpo da doente. Utiliza mais do que um campo de irradiação (na técnica conformacional tridimensional são utilizados frequentemente 4 campos, planeamento designado por *box*) de modo a conformar a dose prescrita ao volume-alvo e minimizar a dose administrada aos órgãos em risco. A braquiterapia consiste na colocação de uma fonte selada com um radionuclídeo na proximidade do tecido a irradiar, nestes casos a técnica consiste na colocação de um aplicador vaginal com um cateter. Nas doentes submetidas a histerectomia é realizada braquiterapia com alta taxa de dose, utilizando-se maioritariamente como radioisótopo o irídio-192. Devido à rápida diminuição da dose em profundidade, a braquiterapia permite a administração de doses elevadas à cúpula vaginal com doses baixas nos órgãos em risco envolventes (Halperin *et al*, 2013).

Os fatores de risco associados a recorrência da doença não estão claramente definidos mesmo perante um estadiamento cirúrgico adequado. Alguns dos fatores associados a alto risco de recorrência são a idade avançada, tumores de alto grau, a presença de invasão linfovascular e a invasão profunda do miométrio. A

radioterapia tem sido recomendada como terapêutica adjuvante em doentes com alto risco de recorrência. O estudo promovido pelo *Gynecologic Oncology Group* apelidado de *Post Operative Radiation Therapy in Endometrial Cancer* (PORTEC-1) mostrou que a radioterapia externa reduzia a recorrência em câncros do endométrio de risco intermédio de 12% a 15% para 3% a 6% (Creutzberg *et al*, 2000). No grupo de alto risco, a radioterapia externa reduziu o risco de 18% a 26% para 5% a 6% e nas doentes de baixo risco a recorrência reduziu-se de 5% a 6 para 2% (Creutzberg *et al*, 2000; Harkenrider *et al*, 2015). A radioterapia tem sido associada a controlo da recorrência locorregional dos estádios I, no entanto, sem impacto na sobrevivência (Creutzberg *et al*, 2000; Montejo *et al*, 2009; Kong *et al*, 2012a). Nas doentes com invasão miometrial e fatores de risco de recorrência, a radioterapia mostrou diminuir esse risco, mas também sem impacto na sobrevivência global (Straughn *et al*, 2003). Uma metanálise recente demonstrou que a irradiação externa pélvica reduz a taxa de recorrência em 64% no estágio I, mas, mais uma vez, não se demonstrou impacto na sobrevivência e associou-se a maior morbilidade e a redução da qualidade de vida (Kong *et al*, 2012b).

A recorrência vaginal pode ser o único local de recorrência do cancro do endométrio em cerca de 70% dos casos (Harkenrider *et al*, 2015). A recorrência associada ao cancro do endométrio em estágio inicial após braquiterapia vaginal é de 0% a 3,1%, sendo esta recomendada pelo PORTEC-2 em doentes de risco intermédio e de risco elevado (Harkenrider *et al*, 2015). A braquiterapia está associada a pouca toxicidade gastrointestinal e geniturinária aguda e crónica, e a poucas neoplasias secundárias, no entanto apresenta como toxicidade primária característica associada a esta técnica, a estenose e atrofia vaginal (Burke *et al*, 2014a).

Na doença avançada, a radioterapia reduz a recorrência locorregional, mas muitos estudos não mostraram modificações na sobrevivência global. Um dos estudos publicados mostrou que a sobrevivência aos 5 anos no estágio IIIC diminuiu de 81% para 71% com radioterapia externa, no entanto o grupo era muito heterogéneo para tirar conclusões consistentes (Nelson *et al*, 1999). Muitos dos trabalhos são difíceis de avaliar relativamente a resultados de radioterapia isoladamente uma vez que nestes estádios os grupos que são submetidos a radiação também realizam quimioterapia associada. O estudo do *Gynecologic Oncology Group* relativamente aos estádios avançados III e IV reportou uma taxa de sobrevivência global de 34,5%, não mostrando potencial curativo para a radioterapia (Sutton *et al*, 2005). A radioterapia primária pode ser utilizada em doentes que não podem ser submetidas a tratamento cirúrgico para controlo locorregional da doença, com sobrevivências aos 5 anos de 39% a 71% (Burke *et al*, 2014a).

De um modo geral a toxicidade da radioterapia externa é de 26%, sobretudo de natureza gastrointestinal, tendo sido também significativamente associada a toxicidade hematológica, geniturinária e cutânea. Durante o seguimento, cerca de 20% das doentes continuam a ter complicações ligeiras como

urgência miccional, cólicas abdominais, diarreia, secura vaginal e estenose, que podem afetar a qualidade de vida. Podem surgir outras complicações mais graves como a retite rádica e a cistite rádica (Kong *et al*, 2012b). As complicações graves a longo prazo são sobretudo gastrointestinais e podem afetar cerca de 3% das doentes. A radioterapia foi ainda associada a um ligeiro aumento do risco de neoplasias secundárias (Kong *et al*, 2012b).

## Quimioterapia

Os regimes de quimioterapia descritos para o cancro do endométrio incluem a doxorrubicina, os derivados da platina como a cisplatina ou a carboplatina, o paclitaxel e a ciclofosfamida. Os primeiros citostáticos aprovados para o cancro do endométrio na década de 70 do século XX foram o 5-fluorouracilo, a ciclofosfamida e a doxorrubicina. Os primeiros trabalhos do *Gynecologic Oncology Group* tentaram avaliar a resposta de diversos fármacos incluindo as antraciclina, concretamente a doxorrubicina e a epirrubina, os derivados da platina como a cisplatina e a carboplatina, os taxanos como o paclitaxel, os alcaloides da vinca como a vincristina e os anti-metabólitos como o 5-fluorouracilo (Tate Thigpen *et al*, 2004). Os agentes com melhor taxa de resposta foram a doxorrubicina e os derivados da platina. Durante as últimas décadas o *Gynecologic Oncology Group* e a *European Association for Research and Treatment of Cancer* realizaram vários ensaios clínicos randomizados para identificar a melhor combinação terapêutica (Johnson *et al*, 2014).

O potencial citotóxico dos derivados da platina foi aplicado como terapêutica antineoplásica e a cisplatina foi o primeiro composto utilizado na prática clínica. O mecanismo de ação principal é a indução da apoptose das células tumorais como resultado da ligação covalente ao DNA, interferindo com a transcrição e com a replicação de DNA (Hato *et al*, 2014). Recentemente foram descritas moléculas alvo não-DNA que indicam que estas interações podem contribuir para o efeito antitumoral. Entre estes referem-se os efeitos imunogénicos, que incluem a sinalização de vias moleculares que regulam a resposta imune e a morte celular descrita para este grupo de fármacos (Hato *et al*, 2014).

A doxorrubicina, que pertence ao grupo de compostos denominados antraciclina, foi isolada da *Streptomyces peucetius*. O mecanismo de ação da doxorrubicina consiste na indução de morte celular através da inibição da topoisomerase II, da ligação ao DNA e do stresse oxidativo (Yang *et al*, 2014). O principal efeito secundário é a cardiotoxicidade, levando à investigação de metodologias que a pudessem limitar, nomeadamente a utilização do fármaco encapsulado em lipossomas (Vejpongsa & Yeh, 2014).

Os taxanos são um grupo de fármacos cuja atividade antitumoral se baseia na estabilidade dinâmica dos microtúbulos e, por isso, originam disrupção do ciclo celular (de Weger *et al*, 2014). O docetaxel e o paclitaxel são os fármacos utilizados em oncologia. O paclitaxel foi originalmente extraído da árvore do teixo



(*Taxus spp.*) (Yared & Tkaczuk, 2012). Nos últimos anos têm sido desenvolvidos taxanos de segunda geração e fármacos não-taxanos que têm como alvo os microtúbulos. Também se desenvolveram estratégias para criar novas formulações como as nano-partículas de albumina, os fármacos análogos, os pró-fármacos, entre outras (Yared & Tkaczuk, 2012).

A ciclofosfamida é um agente alquilante que está incluído em esquemas de quimioterapia para vários cânceros e, também, como imunomodulador quando utilizado em doses baixas, sendo aplicado em várias doenças autoimunes (Hassan & Andersson, 2013). A ciclofosfamida, que apresenta uma variação individual em termos de eficácia e de toxicidade, é um pró-fármaco que é ativado e inativado pelo citocromo P450 hepático (Hassan & Andersson, 2013).

A quimioterapia tem igualmente sido utilizada como terapêutica paliativa na recorrência e na doença inoperável. As doentes que foram submetidas a cirurgia citorrredutora, mesmo que a ressecção tenha conduzido a doença residual microscópica, assim como a doença metastática, beneficiam de terapêutica médica. Apesar da aplicação da radioterapia para reduzir a recorrência pélvica, o efeito da radiação está limitado aos volumes irradiados e a associação de quimioterapia adjuvante pode melhorar os resultados (Burke *et al*, 2014a).

Os trabalhos que permitem comparar estes resultados são pouco uniformes, combinam terapêuticas distintas e diferentes tipos de tumores. Nos tumores serosos, a combinação de quimioterapia com radioterapia parece ser benéfica (Zanotti *et al*, 1999). A radioterapia associada à quimioterapia com doxorrubicina e com cisplatina no cancro do endométrio avançado mostrou melhorar a sobrevivência em relação à radioterapia isolada, em valores de 42% *versus* 53% (Randall *et al*, 2006; Burke *et al*, 2014a). Um estudo da *European Association for Research and Treatment of Cancer* em doentes em estádios I a III submetidas a radioterapia randomizou grupos com e sem quimioterapia sequencial e demonstrou redução do risco de recorrência e de morte em 36% (Hogberg *et al*, 2010). Os resultados de um ensaio semelhante patrocinado pelo *Gynecologic Oncology Group* chegaram a conclusões semelhantes, no entanto sem significância estatística (Hogberg *et al*, 2010). Assim, a quimioterapia adjuvante associada à radioterapia melhora a progressão livre de doença em doentes sem tumor residual mas não melhora a sobrevivência aos 5 anos (Burke *et al*, 2014a). A quimioterapia associada à irradiação para-aórtica correspondeu a uma sobrevivência de 75%, superior à da radioterapia isolada, sugerindo um benefício desta abordagem (Onda *et al*, 1997). A última revisão da *Cochrane* sobre tratamento adjuvante no cancro do endométrio para tumores dos estádios III e IV, apesar de com evidência moderada, considera que a quimioterapia melhora a sobrevivência em 25% após cirurgia comparando com radioterapia isolada (Galaal *et al*, 2014).

No cancro do endométrio em estágio avançado, a associação da cisplatina com a doxorrubicina teve melhores taxas de resposta, no entanto sem melhoria da sobrevivência comparando com a doxorrubicina em

monoterapia (Aapro *et al*, 2003; Tate Thigpen *et al*, 2004). O regime que associa o paclitaxel, a doxorrubicina e a cisplatina em estádios III e IV, independentemente do tipo histológico, obteve melhores resultados em termos de sobrevivência e de progressão livre de doença (Fleming *et al*, 2004). No entanto, foi reportada neurotoxicidade periférica moderada a grave em 39% das doentes com associação de paclitaxel. A associação de paclitaxel com carboplatina em estádios III e IV após citorredução ótima teve uma taxa de sobrevivência aos 5 anos de 56%, mas os resultados são difíceis de interpretar pela heterogeneidade do tratamento de radioterapia (Sovak *et al*, 2006). O regime de combinação de cisplatina com doxorrubicina e com ciclofosfamida foi comparado com o regime de paclitaxel e carboplatina, sem diferenças estatisticamente significativas para a sobrevivência global e para a progressão livre de doença, no entanto a toxicidade foi menor com o último (Hidaka *et al*, 2006). Este regime tem sido adotado pela experiência adquirida no tratamento do cancro do ovário e melhor tolerabilidade que outras combinações descritas (Montejo *et al*, 2009; Sorosky, 2012). Nos tumores serosos, o regime de associação de paclitaxel com carboplatina teve uma taxa de recorrência de 73,7%, salientando o mau prognóstico destes tumores (Vaidya *et al*, 2006).

O risco de recorrência nos estádios I e II em doentes de alto risco e de risco intermédio, levou à consideração da quimioterapia como terapêutica adjuvante. A radioterapia e a quimioterapia foram comparadas em doentes de alto risco e de risco intermédio, sem melhoria da sobrevivência no grupo da quimioterapia comparando com a radioterapia (Maggi *et al*, 2006; Susumu *et al*, 2008). Está a decorrer um outro estudo, o PORTEC-3, que vai comparar a radioterapia pélvica com a radioterapia associada a quimioterapia em doentes de alto risco e de risco intermédio numa tentativa de melhor esclarecer aquela associação (Wright *et al*, 2012).

### Tratamento hormonal

Os progestativos, dado a sua função no controlo do crescimento do endométrio normal, têm sido apontados para o tratamento da recorrência e da doença metastática. Os recetores de progesterona são subregulados pelos progestativos e os componentes estrogénicos aumentam os recetores de progesterona, sendo este o racional para a aplicação de tamoxifeno associado com os progestativos. O acetato de medroxiprogesterona e o acetato de megestrol assim como o tamoxifeno e os inibidores da aromatase foram incluídos em alguns estudos. Estima-se que cerca 15% a 30% das mulheres respondem a este tratamento e os fatores preditivos desta resposta são os tumores bem diferenciados, com expressão de recetor de estrogénios e de recetor de progesterona, com intervalo livre de doença longo e com metastização local ou extra-pélvica extensa (Montejo *et al*, 2009). O tamoxifeno foi testado num ensaio clínico de fase II associado

a acetato de medroxiprogesterona cíclico tendo sido reportadas taxas de resposta de 33% e média de sobrevivência global de 13 meses em doentes com tumores avançados (Burke *et al*, 2014a). Os resultados com este tipo de tratamento são habitualmente associados a respostas de curta duração, apesar de terem poucos efeitos adversos em comparação com a quimioterapia convencional.

## Tratamento conservador

A incidência do cancro do endométrio em mulheres com menos de 45 anos representa 5% a 30%, com variações entre diferentes instituições, no entanto destaca-se que indubitavelmente o cancro do endométrio tem aumentado na mulher em idade fértil, o que levanta questões relativas à preservação da fertilidade (Arora & Quinn, 2012). Nas mulheres entre os 20 e os 34 anos foram diagnosticados 1,6% de todos os cancros do endométrio e entre os 35 e os 44 anos cerca de 6,1% (Arora & Quinn, 2012). Muitos destes tumores são do tipo I, hormonodependentes e associados a hiperplasia endometrial.

As opções de preservação da fertilidade não são uma abordagem habitual, uma vez que a maioria dos cancros são diagnosticados na pós-menopausa e por isso os dados disponíveis são limitados. A avaliação destas doentes incluiu um diagnóstico histológico com material frequentemente obtido por curetagem uterina, avaliação histeroscópica e estudo imagiológico para avaliar a presença de invasão miometrial e de doenças ganglionar e extrauterina. A RMN é considerada o método ideal para prever o grau de invasão miometrial (Burke *et al*, 2014a). As doentes com tumores de grau I que não invadem o miométrio e sem doença extrauterina são as candidatas ideais ao tratamento conservador.

Os progestativos são utilizados como tratamento hormonal no contexto do tratamento conservador do cancro do endométrio. As taxas de resposta são de cerca de 70% mas aproximadamente um terço das doentes não responde. Estes valores referem-se a amostras pequenas e a estudos não randomizados (Arora & Quinn, 2012). Um estudo multicêntrico prospetivo com mulheres com carcinoma do endométrio e com hiperplasia atípica avaliou a ação da associação acetato de medroxiprogesterona com aspirina em baixas doses durante 26 semanas e com avaliação histológica cada 8 a 16 semanas (Sorosky, 2012). A taxa de resposta completa foi de 55% para os carcinomas e de 82% para a hiperplasia atípica com uma taxa de recorrência de 47%. O acetato de medroxiprogesterona e o acetato de megesterol orais têm sido utilizados no tratamento conservador do cancro do endométrio por períodos variáveis e com obtenção de amostras endometriais em intervalos de 3 a 6 meses. Mais recentemente o sistema intrauterino com levonorgestrel (SIU-LNG) foi utilizado em situações clínicas com contra-indicação cirúrgica e com taxas de resposta semelhantes (Arora & Quinn, 2012). Outra opção é a ressecção histeroscópica da lesão seguida de administração de progestativo, no entanto, está descrita num número restrito de doentes (Sorosky, 2012).

O maior risco do tratamento conservador é a progressão da doença durante o tratamento ou após uma resposta inicial ao tratamento médico. Outra questão é a preservação dos ovários que podem ser local de metastização oculta e cuja remoção retira a fonte mais importante de estrogénios que estimulam o crescimento da neoplasia endometrial. O risco de tumor síncrono pode atingir 19%, no entanto verificou-se que não havia risco de morte associado com a preservação dos ovários (Arora & Quinn, 2012). Relativamente aos resultados obstétricos, têm sido reportadas taxas de gravidez de 35,7%, com 18% dos casos necessitando de técnicas de procriação medicamente assistida (Burke *et al*, 2014a).

## Terapêuticas dirigidas

O conhecimento das vias envolvidas no crescimento do cancro do endométrio permitiu identificar potenciais terapêuticas dirigidas a alvos moleculares, apesar de estas terapêuticas ainda não estarem disponíveis na prática clínica. Existem várias vias com potenciais fármacos dirigidos que podem ser aplicadas no cancro do endométrio, conforme esquematizado na Figura 4.

Uma das vias mais estudadas é a via PI3K/AKT, a qual está envolvida na sobrevivência e no crescimento celular e evita a apoptose (Westin & Broaddus, 2012). Esta via é estimulada pelo recetor do EGF (EGFR, do inglês *EGF-receptor*), pelo recetor-1 do IGF-1 (IGFR1, do inglês *IGF receptor-1*) e pelo recetor-2 FGF (FGFR2, do inglês *EGF receptor-2*) e também se correlaciona com outras vias como RAS/RAF/MEF. No cancro do endométrio a ativação desta via PI3K/AKT ocorre por perda da atividade do gene supressor tumoral PTEN ou pela ativação da mutação PIK3CA que codifica a subunidade PI3K. A mutação AKT e a sobre-expressão de recetores tirosina cinase também estimulam esta via. A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR, do inglês *mammalian target of rapamycin*) é dirigida à via PI3K/AKT pela subregulação AKT e pela ativação da proteína cinase 6K que regula o ciclo celular e a sua progressão (Hill & Dizon, 2012). Os inibidores das vias PI3K/AKT/mTOR, isoladamente ou em combinação com outros fármacos, melhoraram a taxa de resposta em 35% nos tumores sólidos em estágio avançado, incluindo o cancro do endométrio (Janku *et al*, 2011). A resposta aos inibidores mTOR parece ser influenciada pela mutação PIK3CA (Salvesen *et al*, 2012). O temsirolimus, um éster da rapamicina, foi avaliado no cancro do endométrio recorrente e metastático num ensaio clínico de fase II e a taxa de resposta parcial e de doença estável no grupo de quimioterapia foi de 14% e de 69% respetivamente. O grupo que já tinha recebido quimioterapia teve respostas parciais piores, de 4% e doença estável em 25% (Oza *et al*, 2011). Estes resultados foram independentes da presença de mutações do *PTEN*, perda do *PTEN*, do mTOR fosforilado, da pAKT ou da pS6K avaliados nos tumores primitivos (Oza *et al*, 2011).

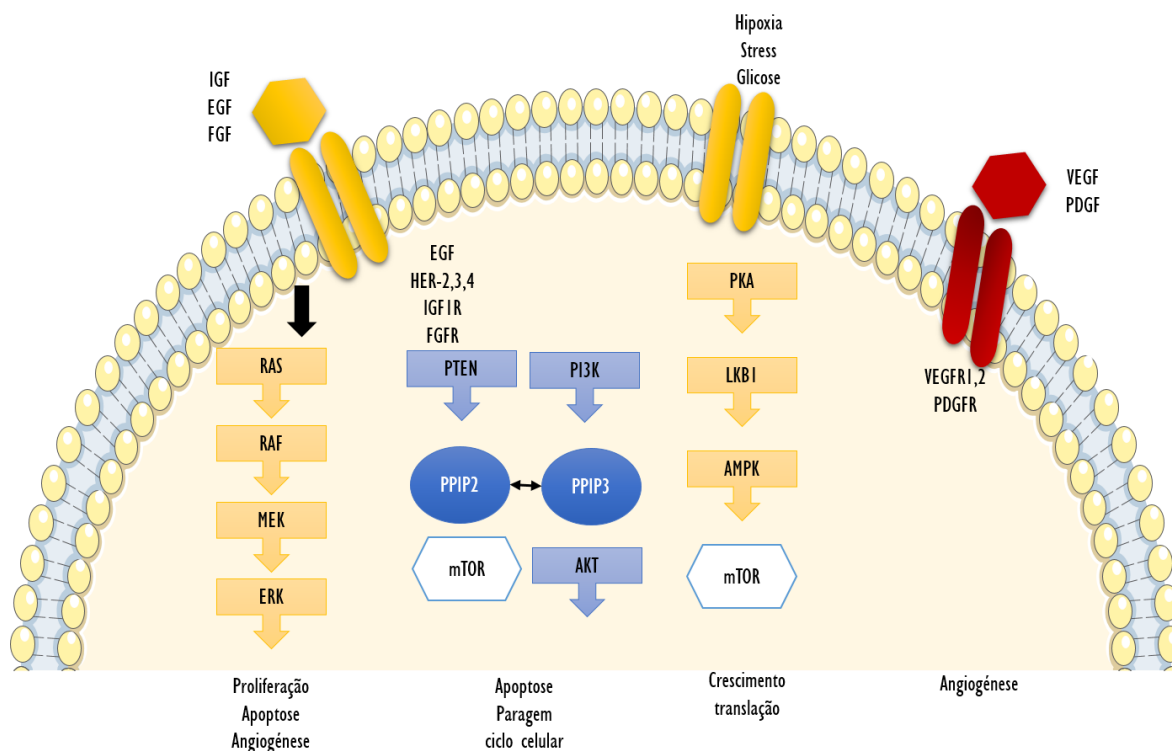


Figura 4: Vias moleculares envolvidas no cancro do endométrio e possíveis alvos para terapêutica dirigida. As vias RAS-RAF e PI3K-AKT-mTOR são ativadas por receptores tirosina cinase como EGFR, IGFR, FGFR. A PI3K fosforila a PPIP2 para originar PPIP3. O PTEN hidrolisa PPIP3 em PPIP2. O PPIP3 recruta e fosforila a AKT e é ativada por mTOR. Estão descritas interações entre a via PIK3CA e KRAS à custa de um retrocontrolo RAS/RAF/MEK. A via RAS ativada fosforila ERK e desencadeia processos de proliferação. A AMPK ativa stress celular e a disponibilidade de nutrientes. A angiogénese pode ser influenciada por fatores de crescimento pro-angiogénicos como o VEGF e o PDGF. Abreviaturas: EGF, fator de crescimento epidérmico; IGF, fator de crescimento insulina-*like*; FGF, fator de crescimento fibroblástico; HER, recetor do fator de crescimento epidérmico humano; EGFR, recetor do fator de crescimento epidérmico; IGF1R, recetor-I do fator de crescimento insulina-*like*; FGFR, recetor do fator de crescimento fibroblástico; VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular; PDGF, fator de crescimento derivados das plaquetas; VEGFR, recetor do VEGFR; PDGFR, recetor do PDGFR; RAS, oncogene homólogo do sarcoma de rato; Raf, V-raf-1, oncogene homólogo-1 murino leucemia viral; MEK, proteína cinase mitogénica ativada; ERK, *extracellular signal-regulated kinases*, PI3K, fosfatidilinositol 3-cinase; PTEN, fosfatase e tensina homóloga; PPIP2, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PPIP3, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato; AKT, proteína cinase B; mTORc, proteína alvo da rapamicina. Adaptado de Myers 2013; Umene et al. 2013; Westin e Broaddus 2012 e de Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

O everolimus, um inibidor mTOR oral, foi testado no cancro do endométrio recorrente, verificando-se uma estabilização da doença em 21% às 16 semanas (Slomovitz *et al*, 2010). Parece haver uma tendência para a mutação KRAS ser preditiva da resposta a esta terapêutica, sem resultados relevantes para a expressão do PTEN e da pS6K (Westin & Broaddus, 2012). O ridaforolimus também foi testado no cancro do endométrio,

com taxas de controlo da doença em 33% a 58% e num ensaio de fase II em associação com quimioterapia convencional ou com hormonoterapia teve um alargamento de 2 meses da progressão livre de doença (Westin & Broaddus, 2012). O everolimus foi testado com o letrozol no cancro do endométrio recorrente com taxa de resposta de 21% (Westin & Broaddus, 2012). Estão descritos outros estudos ainda em fase I e em fase II com fármacos inibidores da AKT e inibidores da PI3K em cancro do endométrio recorrente (Westin & Broaddus, 2012).

A metformina é um antidiabético oral com efeito antitumoral descrito à custa da ativação da via proteína cinase ativada pela adenosina monofosfato (AMPK, do inglês *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) através da serina/treonina cinase I (LKB1, do inglês *serine/threonine kinase I*) assim como a redução dos níveis de insulina (Westin & Broaddus, 2012). A insulina pode induzir paragem do ciclo celular e de apoptose, assim como reverter a resistência à progesterona e induzir a expressão de recetores de progesterona em linhas celulares (Westin & Broaddus, 2012). Esta utilização de antidiabéticos orais no cancro do endométrio ainda não tem resultados clínicos que perspetivem a sua aplicação.

A via RAS/RAF/MEK é outra das possibilidades no desenvolvimento de terapêuticas dirigidas para o cancro do endométrio. O inibidor da MEK-AZD6244 foi testado com resultados favoráveis no cancro do endométrio num ensaio clínico de fase II onde se pretendeu avaliar a possibilidade de associação com inibidores da PI3K/AKT (Westin & Broaddus, 2012). O IGF é um fator mitogénico para a via PI3K/AKT e para a RAS/RAF/MEK. O IGFRI está sobre-expresso na hiperplasia endometrial e no carcinoma do endométrio e o seu inibidor mostrou aumentar a apoptose em linhas celulares de cancro do endométrio. Desta forma, existe a possibilidade de associar inibidores do IGFRI com inibidores da mTOR mas ainda sem resultados em ensaios clínicos (Westin & Broaddus, 2012).

A angiogénese é um fator primordial para o crescimento tumoral e que pode ser regulada por uma série de passos complexos que influenciam as células do endotélio vascular. A sobre-expressão do VEGF desregula o crescimento das células endoteliais, o que constitui um marcador de mau prognóstico no cancro do endométrio, associando-se a invasão miometrial e a metastização ganglionar (Westin & Broaddus, 2012). O bevacizumab é o anticorpo monoclonal dirigido ao VEGF-A e foi estudado em ensaios clínicos de fase II no cancro do endométrio recorrente, com taxas de resposta de 13,5% aos 6 meses e uma sobrevivência de 10,5 meses (Kamat *et al*, 2007b). O sunitinib é um inibidor dirigido a vários recetores tirosina cinase como o recetor do VEGF (VEGFR, do inglês *VEGF receptor*) e o recetor do PDGF (PDGFR, do inglês *PDGFR recetor*), o que constitui outra possibilidade em estudo no cancro do endométrio, no entanto no ensaio clínico de fase II a média de progressão foi de 2,5 meses e a resposta parcial de 12,5%, correspondendo apenas a 2 doentes. O FGF também está envolvido na angiogénese, e o cedirinib e o brivaniv, que são dirigidos a esta via FGFR-2, foram testados em estudos piloto de fase II para cancro do endométrio. Até ao momento a

avaliação de biomarcadores preditivos de resposta a antiangiogénicos não foi bem sucedida (Hill & Dizon, 2012).

A via da polimerase poli (ADP-ribose) (PARP, do inglês *poly (ADP-ribose) polymerase*), envolvida na reparação do DNA, pode ser inibida originando pontos de dupla quebra na cadeia do DNA após o processo de replicação. Estes inibidores foram aplicados no cancro do ovário e no cancro da mama com mutações do gene BRCA (gene de suscetibilidade do cancro da mama, do inglês *breast cancer susceptibility gene*). No cancro do endométrio, a perda de PTEN cria suscetibilidade celular aos inibidores da PARP *in vitro* e *in vivo* (Dedes *et al*, 2011). Relativamente a este tipo de fármacos não estão disponíveis resultados de estudos clínicos.

A família EGFR inclui o EGFR ou ErbB1, o HER2/neu ou ErbB2, o HER-3 ou ErbB3 e o HER-4 ou ErbB4 e tem um papel fundamental na regulação do crescimento e na diferenciação celular. O EGFR foi também testado em terapêutica dirigida a alvos moleculares no cancro do endométrio através do erlotinib que bloqueia a porção tirosina cinase do EGFR. No cancro do endométrio recorrente a taxa de progressão foi de 12,5% e de doença estável de 47% (Oza *et al*, 2008). A sobre-expressão de HER2 foi associada aos tumores serosos e com pior prognóstico no cancro do endométrio. O trastuzumab, um anticorpo monoclonal anti-HER2, foi avaliado num ensaio clínico de fase II em cancros do endométrio avançados ou recorrentes com sobre-expressão HER2, e não se verificou resposta clínica (Fleming *et al*, 2010). Um estudo com o lapatinib, apesar de ter mostrado atividade *in vitro* em linhas celulares do cancro do endométrio, não foi testado pela atividade modesta que se verificou (Hill & Dizon, 2012).

A via E-caderina/ $\beta$ -catenina é responsável pela manutenção da arquitetura normal, pela diferenciação celular e faz parte da via WNT que está implicada na tumorigénese. A perda de E-caderina e a localização de  $\beta$ -catenina no núcleo das células estão associados à transição de epitelial para mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial-to-mesenchymal transition*) que promove a invasão e a metastização. Não existem ainda fármacos disponíveis para esta via, que poderá também estar implicada na disseminação de células estaminais do cancro (Westin & Broaddus, 2012).

Os mecanismos epigenéticos têm sido propostos para novos alvos terapêuticos, particularmente no contexto dos microRNAs que são pequenas moléculas de RNA que regulam a expressão de DNA. A expressão de microRNAs foi avaliada no cancro do endométrio, verificando-se expressão diferencial de algumas moléculas em relação ao endométrio normal (Umene *et al*, 2013). Os microRNAs são frequentemente inibidos pela hipermetilação do DNA no cancro do endométrio. O microRNA-152 foi identificado como um novo supressor tumoral que inibe *in vivo* a tumorigénese endometrial. O mecanismo deste efeito ainda não está esclarecido e são necessários mais estudos para o desenvolvimento de terapêuticas baseadas na atividade de microRNAs (Umene *et al*, 2013).

As desacetilases das histonas e as acetil-transferases pertencem a mecanismos de homeostase para a acetilação destas proteínas. O butirato de sódio, um inibidor das desacetilases das histonas, reduz a capacidade de autorrenovação e a supressão de formação de colónias da população lateral da linha celular de endométrio de rato RK12V, que expressa o [12Val]-KRAS humano. Este fármaco aumentou as ROS e os danos no DNA e pode ser uma opção na resistência à terapêutica (Kato *et al*, 2011).

A utilização de terapêuticas dirigidas a alvos moleculares no cancro do endométrio é uma ideia promissora para melhorar a resposta à terapêutica e a sobrevivência do cancro avançado e recorrente. No entanto a elegibilidade de biomarcadores e a estruturação de ensaios clínicos ainda não permitiram a aplicação com sucesso destas novas abordagens terapêuticas.



## **CAPÍTULO III — CÉLULAS ESTAMINAIS NO CANCRO DO ENDOMÉTRIO**



## Células estaminais do cancro

Os tumores são constituídos por uma população celular heterogénea, que difere em termos de morfologia, de expressão de genes, de capacidade de proliferação e de invasão. Esta heterogeneidade é justificada por uma hierarquia de organização celular que tem origem nas células estaminais do cancro (CSC, do inglês *cancer stem cells*), população que está no vértice desta ordenação (Clarke *et al*, 2006). As CSC são uma população minoritária de células tumorais que têm capacidade de autorrenovação, de originar progenitores que se diferenciam de forma aberrante e que não respondem adequadamente aos controlos homeostáticos. Assim, a teoria das CSC aponta para a presença de uma subpopulação que inicia, desenvolve e perpetua os tumores, sendo responsável pelos processos de tumorigénese, de diferenciação, de manutenção tumoral, de disseminação e de recorrência tumoral (Allegra *et al*, 2014).

A capacidade de autorrenovação das CSC é assegurada pela sua capacidade de adotar uma divisão simétrica, conforme descrito na Figura 5. Além desta, a divisão assimétrica origina as células progenitoras responsáveis por iniciar e por manter as células diferenciadas que constituem o tumor (Visvader & Lindeman, 2008; Lee *et al*, 2011). O modelo inicial das CSC era considerado estático, no que respeita à origem destas células e reconhecido como unidirecional, no entanto atualmente é consensual o modelo considerado dinâmico (Islam *et al*, 2015). Deste modo admite-se que as CSC podem, por diferenciação, originar os vários tipos celulares que constituem o tumor, assim como, as células progenitoras podem adquirir a capacidade de autorrenovação por desdiferenciação.

A teoria da CSC para a génese do tumor teve origem na hipótese do “descanso embrionário” (do inglês, *embryonic rest hypothesis of cancer origin*) postulada no século XIX por Virchow e Cohnheim (Islam *et al*, 2015). Na década de sessenta do século XX foi sugerida a existência de células estaminais hematopoiéticas com origem na medula óssea pela evidência do efeito protetor de células com esta origem em ratinhos submetidos a dose letal de radiação. Outros trabalhos em modelos animais que mostraram que apenas algumas das células tumorais foram capazes de iniciar tumores (Islam *et al*, 2015). Estudos em tumores sólidos, nomeadamente do pulmão, do ovário e do cérebro, demonstraram ter características similares às células hematopoiéticas no que respeita à capacidade de apenas uma população minoritária iniciar tumores (Islam *et al*, 2015). Estas e outras evidências levaram à hipótese dos tumores terem origem numa única

população, as CSC. Um marco importante na identificação das CSC foi o trabalho de Lapidot em 1994, que consistiu na transplantação de uma subpopulação selecionada de células de leucemia mieloide aguda em ratos SCID (do inglês, *severe combined immunodeficiency*) (Lapidot *et al*, 1994). Mais tarde Bonnet e Dick demonstraram que as CSC apresentam características funcionais de células estaminais pelo isolamento da população  $CD34^+/CD38^-$  e posterior transplantação em ratos SCID/NOD (do inglês, *severe combined immunodeficiency/nonobese diabetic*), que reconstituíram o fenótipo deste tipo de leucemia (Bonnet & Dick, 1997). A existência de CSC em tumores sólidos foi mais tarde comprovada pelo isolamento de uma população de células tumorais da mama  $CD44^+/CD24^{low}$  que apresentou propriedades tumorigênicas em modelo animal (Al-Hajj *et al*, 2003). Mais recentemente outros estudos têm focado a identificação de CSC noutros tumores sólidos como nos do cérebro, do pulmão, do cólon, da próstata e do pâncreas e têm sugerido também a existência de uma subpopulação de CSC com capacidade de autorrenovação, capaz de iniciar e de manter o crescimento do cancro (Islam *et al*, 2015).

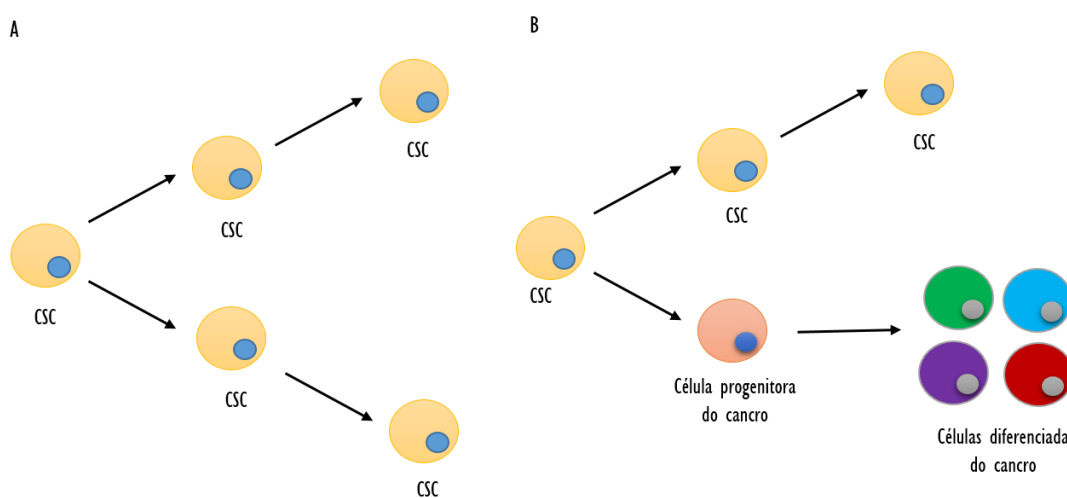


Figura 5: Esquema representativo da divisão simétrica (A) e assimétrica (B) das CSC. Estes processos asseguram a capacidade de autorrenovação e diferenciação. Abreviaturas: CSC, células estaminais do cancro. Adaptado de Tang, 2012 e de Visvader & Lindeman, 2008.

As hipóteses postuladas para a origem das CSC incluem a proveniência de células estaminais normais, de células cancerígenas maduras que sofreram um processo de dediferenciação, particularmente a EMT, e de processos de indução de células pluripotentes, mecanismos cuja relação está representada na Figura 6. A primeira hipótese é a transformação maligna das células estaminais adultas, designada como modelo clonal evolutivo, em que a tumorigênese tem na sua origem a acumulação de alterações genéticas e epigenéticas (Islam *et al*, 2015). Neste modelo as células tumorais com superioridade de crescimento são selecionadas e

propagadas (Visvader & Lindeman, 2008).

As CSC podem apresentar localização semelhante à das células estaminais adultas e os sinais do nicho das células estaminais normais podem atrair as CSC para este nicho (Hubbard & Gargett, 2010). Alguns autores mostraram que o fenótipo CSC pode ser adquirido por células tumorais que anteriormente tinham marcadores de células estaminais negativos (Allegra *et al*, 2014). A dediferenciação celular em CSC constitui um fenómeno semelhante ao descrito em células somáticas que podem tornar-se pluripotentes (Tang, 2012). Um exemplo deste fenómeno de dediferenciação é a EMT, um processo reversível através do qual as células tumorais podem adquirir um fenótipo de invasão, de sobrevivência em circulação e de colonização de locais distantes. Este processo biológico foi recentemente associado às vias do TGF- $\beta$ , NOTCH e WNT, capazes de promover a EMT, e esclarecida uma assinatura de 30 microRNAs ligada a este processo (Zoni *et al*, 2015).

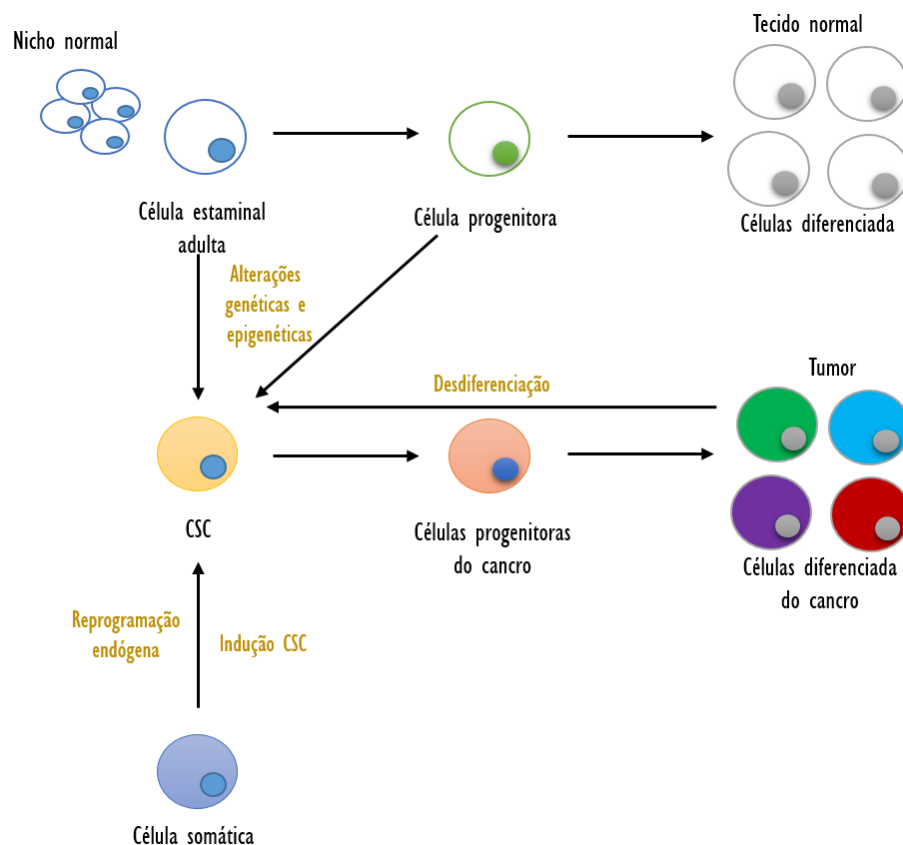


Figura 6: Esquema representativo das três hipóteses para a origem das células estaminais do cancro. As CSC podem ter origem em células estaminais adultas normais que adquirem alterações genéticas e epigenéticas. As células diferenciadas tumorais podem ser outra possível fonte, apontando-se um processo de dediferenciação. Por último, a reprogramação endógena de células somáticas pode induzir propriedades de CSC. Estas hipóteses devem ser interpretadas de forma dinâmica. Adaptado de Islam *et al*, 2015.

A indução de células estaminais pluripotentes é a terceira hipótese para a origem de CSC, que admite que, pela indução de genes específicos, ocorre reprogramação através da transdução de fatores transcricionais conhecidos como fatores de Yamanaka que são o OCT3/4, o SOX2 (do inglês, *sex determining region Y-box 2*), o c-MYC e o KIF4 (do inglês, *kinesin superfamily proteína member 4*) (Yamanaka, 2008). Assim, esta hipótese aponta para reprogramação endógena como fonte de CSC. Na sua globalidade os modelos de origem das CSC não se excluem, as populações de células tumorais podem atuar de modo diferente e são influenciadas pelo microambiente (Islam *et al*, 2015).

A proporção de CSC no tumor é uma questão que permanece por esclarecer. Alguns estudos apontam para uma pequena proporção que demonstrou capacidade tumorigênica, com valores até 2% (Islam *et al*, 2015). Considerando as CSC de leucemia mieloide, foi descrita também uma proporção pequena com capacidade de formação de tumores *in vivo* (Hope *et al*, 2004). Estudos experimentais mostraram que no cancro do cólon apenas uma pequena proporção de células CD133<sup>+</sup> tiveram capacidade de gerar tumores após xenotransplantação em ratos SCID (O'Brien *et al*, 2007; Todaro *et al*, 2007). No entanto outros trabalhos indicam que as CSC não são assim tão raras, pelo menos em alguns tipos de tumores. Nos tumores hematológicos foram descritas proporções de uma em dez e no melanoma foram referidos valores de 2,5% a 41% (Kelly *et al*, 2007; Boiko *et al*, 2010). De notar que o isolamento de CSC foi realizado por metodologias diversas, o que pode explicar a disparidade na avaliação desta proporção. Nos tumores sólidos, onde a prevalência de CSC em relação à população tumoral apresentou uma variação entre 0,07% e 38%, esta proporção pode ser correlacionada com o grau do tumor e com os resultados clínicos (Visvader & Lindeman, 2008).

As vias de sinalização embrionárias típicas das células estaminais, nomeadamente, a NOTCH, a HEDGEHOG e a WNT, foram implicadas nas CSC, conforme descrito na Figura 7 (Takebe *et al*, 2011; Allegra *et al*, 2014).

A via de sinalização NOTCH regula a comunicação intercelular durante a embriogénese, a proliferação, a diferenciação e a apoptose (Takebe *et al*, 2011). Os ligandos NOTCH consistem em duas famílias estruturalmente distintas, os ligandos *delta-like* (DLLs, do inglês, *delta-like ligands*) e os *jagged* que interagem com os quatro recetores transmembranares NOTCH (Takebe *et al*, 2011). A região extracelular dos recetores apresenta vários domínios EGF-*like* que medeiam a interação com os ligandos NOTCH. Após ligação ao recetor NOTCH, este sofre alterações conformacionais que expõem um local previamente protegido da clivagem proteolítica por metaloproteases e pela secretase- $\gamma$  que libertam fragmentos extracelulares e intracelulares, respetivamente. Este passo cliva o domínio membranar NOTCH e liberta o domínio intracelular ativo no citoplasma que, por sua vez, se liga ao complexo de iniciação transcricional e ao fator de ligação *core-1*, iniciando a expressão de genes *NOTCH* (Takebe *et al*, 2011).

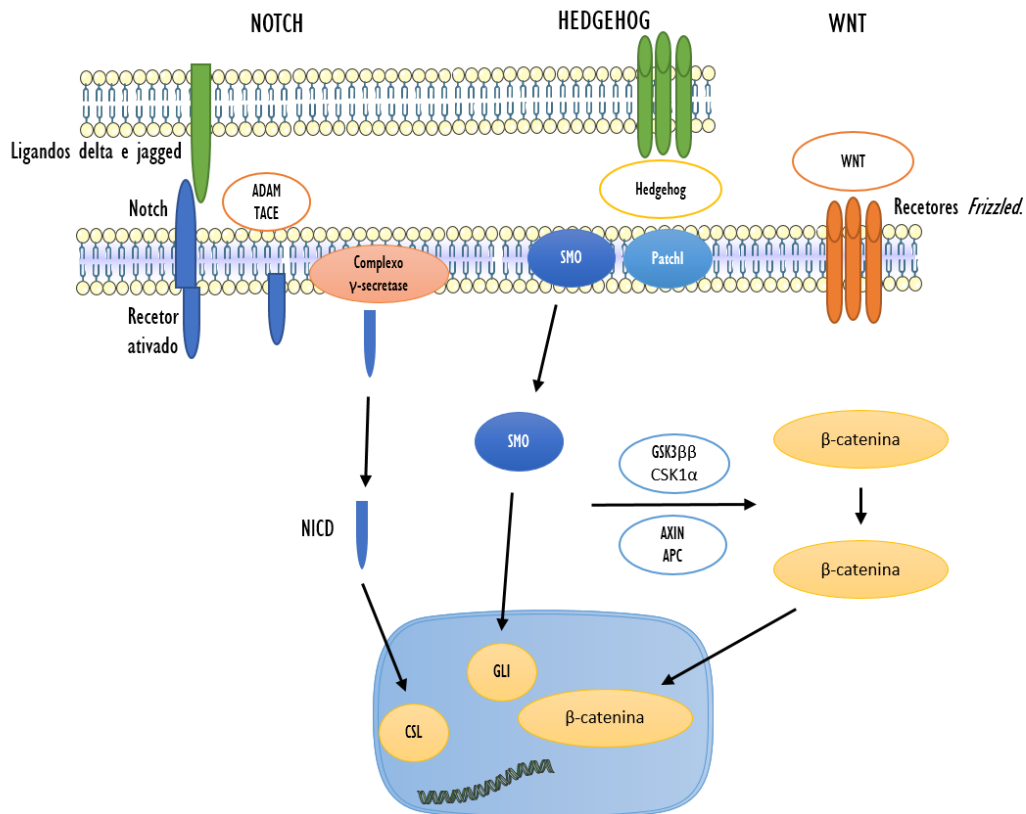


Figura 7: Vias de sinalização de células estaminais. A via NOTCH é ativada por ligandos delta e jagged, durante o contacto intercelular. O receptor NOTCH é absorvido e sofre proteólise pela ADAM e pelo complexo  $\gamma$ -secretase, consequentemente o heterodímero do receptor NICD é libertado no citoplasma e translocado para o núcleo onde ativa o fator transcripcional CSL. Na via HEDGEHOG ativada o HEDGEHOG é secretado por células adjacentes e liga-se ao receptor PATCH-1 que ativa o SMO. O GLI 1 e 2 são libertados e translocados para o núcleo. A ativação da via WNT ocorre pela ligação do WNT aos receptores *frizzled* que permitem a libertação de  $\beta$ -catenina do complexo de destruição multiproteico e a  $\beta$ -catenina livre é libertada para o núcleo. Abreviaturas: NICD, *intracellular domain of NOTCH*, CSL, CBF1, *suppressor of hairless, lag-1*; Smo, receptor *smoothened*, CSK1 $\alpha$ , *casein kinase-1 $\alpha$* . Adaptado de Takebe *et al*, 2011 e Allegra *et al*, 2014.

A via HEDGEHOG controla a polaridade dos tecidos, a manutenção de padrões e a manutenção das células estaminais durante o desenvolvimento embrionário (Takebe *et al*, 2011). A sobreativação desta via, por mutação ou por desregulação, é causa de tumorigénese em diversos tecidos. O N-terminal do HEDGEHOG é acilado pela enzima *RASP* do retículo endoplasmático e é libertado da célula através do transportador transmembranar, liga-se ao receptor PATCH1 e inicia a via de sinalização. Posteriormente o receptor PATCH1 inibe o receptor *Smoothened* (SMO) e o complexo HEDGEHOG-PATCH-1 é internalizado, o que permite a ativação de receptor SMO. A localização de SMO no cílio primário, uma projeção sem motilidade presente na maioria das células de vertebrados, em vez da membrana plasmática leva à ativação da família de fatores transcripcionais GLI. A sinalização HEDGEHOG está dependente do balanço das formas ativadoras e repressoras GLI (Takebe *et al*, 2011).

A via WNT está implicada em vários passos do desenvolvimento embrionário e regula o desenvolvimento de vários órgãos como os do sistema cardiovascular, os do sistema nervoso central e o pulmão. No adulto, a via WNT é fundamental à renovação dos tecidos particularmente das criptas intestinais, dos folículos do cabelo e das placas epifisárias (Takebe *et al*, 2011). A via WNT é constituída por 19 glicoproteínas altamente conservadas que servem de ligação ao recetor transmembranar *frizzled*. A ativação canónica da via leva à acumulação de  $\beta$ -catenina no núcleo e, subsequente, à ativação transcripcional de genes alvo (Takebe *et al*, 2011). Nas CSC, as vias NOTCH e WNT canónica parecem cooperar na manutenção do fenótipo de células estaminais (Allegra *et al*, 2014). Existem ainda outras vias moleculares envolvidas no desenvolvimento embrionário e que podem estar implicadas no cancro e nas CSC, em especial a via JAK/STAT, a via MAP-Kinase/ERK, a via PI3K/AKT, a via NF $\kappa$ B, e a via TGF- $\beta$  (Allegra *et al*, 2014).

As CSC, como já referido, caracterizam-se por propriedades de autorrenovação, de plasticidade e de resistência à terapêutica. A capacidade de autorrenovação é confirmada pela tumorigénese *in vivo* através de utilização de modelos de xenotransplantes em animais imunodeprimidos (Visvader & Lindeman, 2008). Em condições de homeostase e desenvolvimento normal, as células estaminais originam células progenitoras com proliferação rápida que se diferenciam em células com vários tipos de funções (Tang, 2012). Associadamente o fenótipo é parcialmente regulado pelo microambiente, além da determinação genotípica. Recentemente foi demonstrado que as CSC permanecem quiescentes, resistem à quimioterapia dirigida às células em divisão e à radioterapia (Visvader & Lindeman, 2008). Nos tumores, as CSC mantêm a população mutada com propriedades estaminais (Rosen & Jordan, 2009). A identificação de CSC na heterogeneidade tumoral constitui um desafio e pode ser preditiva do prognóstico, da resposta ao tratamento e do desenvolvimento de terapêuticas dirigidas. As CSC podem ser isoladas por marcadores de superfície, podem formar colónias esféricas *in vitro* e são tumorigénicas mesmo com uma pequena população de células (Visvader & Lindeman, 2008; Allegra *et al*, 2014; Skidan & Steiniger, 2014). Na última década têm sido publicados diversos estudos com o objetivo de reconhecer marcadores de superfície capazes de identificar estas células e várias proteínas foram apontadas como potenciais marcadores em diferentes tipos de tumores. No entanto, nenhum dos marcadores descritos para as CSC é exclusivo para um tipo específico de tumor, conforme descrito na Tabela 3, perspetivando-se mais estudos que possam identificar marcadores individuais específicos ou mesmo as suas combinações.

O fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup> foi consistentemente associado a CSC da mama, com tumorigénese comprovada com a inoculação de apenas 100 células (Al-Hajj *et al*, 2003; Visvader & Lindeman, 2008; Charafe-Jauffret *et al*, 2009). Mais recentemente foram descritos outros marcadores no cancro da mama, nomeadamente a ALDH-1, o CD133 o CD49f e o ITGA6 (subunidade  $\alpha$ -6 da integrina) (Allegra *et al*, 2014). A indução de EMT, um processo que origina o fenótipo de células mesenquimatosas a partir de células



epiteliais, foi associado a um aumento de percentagem de células CD24<sup>+</sup> (Morel *et al*, 2008).

Tabela 3: Marcadores de superfície de CSC e tipo de tumor associado (Visvader & Lindeman, 2008; Allegra *et al*, 2014).

Marcador	Marcador adicional	Tipo de tumor	Expressão (%)
CD44 <sup>+</sup>	CD24 <sup>-low</sup> EpCAM <sup>hi</sup> CD24 <sup>+</sup> ESA <sup>+</sup>	Cabeça e pescoço	0,1-42
		Mama	11-33
		Cólon	0,003-38
		Pâncreas	0,2-0,8
		Ovário Próstata	
CD49 <sup>f<sup>high</sup></sup>	EpCAM <sup>-</sup>	Mama	
CD133 <sup>+</sup>		Glioblastoma	19-29
		Meduloblastoma	6-21
		Cérebro	2-3
		Cólon	1,8-25
		Pâncreas	1-3
		Pulmão	0,32-22
		Ovário Mama	
		Endométrio	
ITGA6		Mama	
CD166		Pulmão	
c-Kit		Ovário	
ALDH1 <sup>+</sup>		Mama	3-10
		Cólon	
		Próstata Pulmão	
		Fígado	0,03-6
ABC5 <sup>+</sup>		Melanoma	1,6-20
População lateral		Mesenquimatoso	0,07-10
		Endométrio Ovário	

Abreviaturas: ALDH1, aldeído desidrogenase-1; ABC5, cassete de ligação ao ATP (adenosina trifosfato), subfamília B membro 5; CD, marcador de diferenciação; EpCAM, molécula de adesão das células epiteliais, ESA, antígeno epitelial específico.

No cancro do pulmão têm sido estudados, principalmente, o CD133 e o CD166 como marcadores de CSC (Allegra *et al*, 2014). O fenótipo CD133<sup>+</sup> no carcinoma primário do pulmão de pequenas células e não-pequenas células teve a capacidade de formar esferas *in vitro* (Eramo *et al*, 2008). A população com expressão CD166<sup>+</sup> destacou-se por formar tumorosferas com capacidade de autorrenovação e pela transplantação *in vivo* que recapitulou a heterogeneidade do tumor primitivo (Zhang *et al*, 2012).

Considerando os marcadores de CSC hepáticas, foram descritos o CD90, o CD133, molécula de adesão das

células epiteliais (EpCAM, do inglês *epithelial cell adhesion molecule*) e CD44 (Allegra *et al*, 2014). O fenótipo CD133<sup>+</sup> foi associado ao desenvolvimento do tumor e à resistência ao tratamento. A população EpCAM<sup>+</sup> de células de carcinoma hepatocelular apresentou capacidade de autorrenovação e de diferenciação (Yamashita *et al*, 2010).

No caso do cancro da próstata, o CD44 e a ALDH identificaram o fenótipo de CSC e a população CD44<sup>+</sup> apresentou-se com maior capacidade clonogénica, maior índice de proliferação e maior capacidade de metastização que a CD44<sup>-</sup> (Allegra *et al*, 2014).

Os estudos no cancro do ovário associaram o c-Kit, o CD44 e o CD133 com a população de CSC e, inclusivamente, as células CD133<sup>+</sup> mostraram capacidade clonogénica e tumorigénica superiores (López *et al*, 2013). A população com expressão positiva de CD133 e, simultaneamente, com expressão positiva de ALDH apresentou capacidade de iniciar tumores (Silva *et al*, 2011).

A identificação de marcadores para as CSC parece ter grande potencial para o desenvolvimento de terapêuticas para este grupo de células, que escapam ao tratamento convencional. Assim, uma estratégia futura poderá ser o direcionamento terapêutico a estas células. As abordagens direcionadas às CSC podem passar pelo tratamento dirigido a marcadores de superfície, pela promoção da diferenciação das CSC, pelo bloqueio de componentes de vias de sinalização relevantes das CSC, pela destruição do nicho e por mecanismos epigenéticos (Allegra *et al*, 2014). A indução da diferenciação das CSC em células tumorais mais suscetíveis pode permitir a irradiação destas células e reduzir a probabilidade de recorrência. De fato, alguns estudos já realizados mostraram que a exposição das CSC de glioblastoma a proteínas osteogénicas (BMP, do inglês, *bone morphogenetic proteins*) promoveu a diferenciação e reduziu a frequência de células CD133<sup>+</sup> (Piccirillo *et al*, 2006). Igualmente células CD44<sup>+</sup> de cancro da mama também foram diferenciadas com sucesso por *knockdown* deste marcador, com perda das propriedades estaminais (Pham *et al*, 2011).

As estratégias dirigidas às vias de regulação das CSC podem incluir as vias HEDGEHOG, NOTCH e WNT. Em relação à via HEDGEHOG está descrita a utilização de ciclopamina, que melhorou os resultados dos inibidores tirosina cinase e a depleção de CSC (Dawood *et al*, 2014). A inibição da via NOTCH foi conseguida em CSC da mama pelo antagonismo do ligando delta-like 1 ou NOTCH1 e melhorou a resposta aos taxanos (Dawood *et al*, 2014). Estão descritos inibidores da via de sinalização WNT/ $\beta$ -catenina, assim como da via da IL8 que regula os recetores de quimiocina 1 e 2 (Dawood *et al*, 2014). Outra possibilidade nesta via são os inibidores da secretase-gama, que reduziram não só alguns marcadores de CSC como também o crescimento tumoral *in vivo* (Dawood *et al*, 2014). A via AKT, através do ativador e transdutor de sinal de transcrição 3 (STAT3, do inglês *signal transducer and activator of transcription 3*) pode ser outra alternativa já descrita em gliomas (Allegra *et al*, 2014).

O nicho de CSC está protegido da quimioterapia pela presença de fatores do microambiente que limitam

a apoptose, os estímulos de diferenciação e os fatores agressores do ambiente. Assim, uma das estratégias pode assentar na disrupção das comunicações celulares e, potencialmente, interferir com o crescimento celular (Allegra *et al*, 2014). Por outro lado, as células do nicho tendem a localizar-se na região perivascular. Esta circunstância promoveu estudos em modelos animais que mostraram que a terapêutica antiangiogénica em combinação com fármacos citotóxicos provocam uma redução significativa da população de CSC (Folkins *et al*, 2007).

Estão igualmente em investigação outras terapêuticas dirigidas aos mecanismos epigenéticos, que incluem a metilação do DNA, a modificação das histonas e a remodelação da cromatina. Estas estratégias poderão ser promissoras uma vez que as alterações epigenéticas podem ser reversíveis (Allegra *et al*, 2014).

As principais limitações são o facto de os marcadores de CSC identificados não serem exclusivos destas células, a plasticidade do fenótipo que não implica uma biologia definida e a resistência variável aos citostáticos da quimioterapia convencional.

## Células estaminais do cancro do endométrio

O primeiro estudo que considerou a presença de CSC em tumores do corpo uterino foi em carcinossarcomas, em que os autores verificaram que as células que formavam colónias mantinham essa capacidade ao longo de séries de 50 passagens e originavam morfologia semelhante à das células de origem (Gorai *et al*, 1997). Este estudo também esclareceu a origem destes tumores müllerianos mistos, onde coexiste um componente epitelial e mesenquimatoso, e suportou que tanto o componente epitelial como o mesenquimatoso têm origem numa célula estaminal e que o componente epitelial é o dominante (Gorai *et al*, 1997).

O perfil funcional considerado nas CSC endometriais incluiu a capacidade clonogénica, a população lateral e as tumorosferas e encontra-se detalhado na Tabela 4 (Carvalho *et al*, 2015b). Hubbard e colaboradores realizaram um estudo com carcinoma do endométrio humano primário para demonstrar que existem células com propriedades de CSC, nomeadamente com capacidade clonogénica, de autorrenovação, de diferenciação e de tumorigenicidade que podem ser responsáveis pela iniciação, pela manutenção e pela progressão do carcinoma do endométrio (Hubbard *et al*, 2009). A maioria dos tumores originou unidades formadoras de colónias que aderiram após o isolamento e produziram colónias em 7 dias, com uma eficiência clonogénica de 0,24%. Associadamente verificou-se a expressão de genes de autorrenovação, nomeadamente o local de integração-1 do vírus da leucemia Moloney murina específica de células B (*BMI1*, do inglês *B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1*), o *CTNNB1*, o *SOX2* e o *NANOG*. As unidades formadoras de colónias obtidas a partir de amostras de hiperplasia, de tumores de grau 1, de grau 2, de grau 3 e de

tumores do tipo 2 foram submetidas a subcolonização seriadas *in vitro*, com resultados que corroboram a capacidade de autorrenovação (Hubbard *et al*, 2009).

Tabela 4: Caracterização funcional e respetivos marcadores de CSC do endométrio

Perfil funcional	Marcador	Referências
Unidades formadores de colónias	BM11, CTNNB1, SOX2 e NANOG	(Hubbard <i>et al</i> , 2009)
População lateral		(Friel <i>et al</i> , 2008)
Fração SP Hoechst <sup>Low</sup>		(Kusunoki <i>et al</i> , 2013)
	vimentina, $\alpha$ -SMA e colagénio II	(Yusuf <i>et al</i> , 2014)
	MUSASHI-I	(Kato <i>et al</i> , 2010)
	ALDH1	(Götte <i>et al</i> , 2011)
Tumorosferas	NANOG	(Rutella <i>et al</i> , 2009)
		(Zhou <i>et al</i> , 2011a)
	OCT4	(Zhou <i>et al</i> , 2011a)
		(Rutella <i>et al</i> , 2009)
	OCT4	(Wu <i>et al</i> , 2011)
	ALDH	(Rahadiani <i>et al</i> , 2011)
		(Mamat <i>et al</i> , 2011)
	CD133	(Rutella <i>et al</i> , 2009)
		(Friel <i>et al</i> , 2010)
		(Nakamura <i>et al</i> , 2010)

Abreviatura: ALDH, lactato desidrogenase; BM11, local de integração I do vírus leucemia murina Moloney específico de células B; CTNNB1, gene da  $\beta$ -catenina; SOX2, box-2 da região do Y determinante sexual;  $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -actina do músculo liso; OCT4, fator de transcrição octâmero ligado ao fator de transcrição 4.

As células da população lateral foram avaliadas em linhas celulares de carcinoma do endométrio (Ishikawa, AN3CA, HEC-1) e em células obtidas de amostras tumorais humanas (Friel *et al*, 2008). As linhas celulares foram incubadas com Hoechst 33342 na presença e na ausência do inibidor de resistência a multifármacos (MDR, do inglês *multidrug resistant*), o verapamil. Nas linhas celulares AN3CA e Ishikawa foi possível identificar uma população lateral Hoechst<sup>low</sup> sensível ao verapamil que varia de 0,02% a 0,08% da população total. Nos carcinomas endometriais primários a população lateral atingiu 3,4% das células. O crescimento *in vitro* das células da linha celular AN3CA revelou uma elevada percentagem de células em fase G1, de 80,3% na população lateral *versus* 4,53% na população maioritária, salientando a renovação celular inferior na população lateral (Friel *et al*, 2008). Na linha celular de adenocarcinoma endometrial HEC-50B, a população lateral correspondeu a 0,5% e apresentou maior expressão de KRAS, o que contribui para a manutenção das propriedades estaminais (Tomiyasu *et al*, 2014). A população lateral endometrial apresentou

uma expressão diminuída de marcadores de diferenciação, de capacidade de proliferação a longo prazo, de capacidade de autorrenovação *in vitro* e um aumento da migração, da formação de *lamellipodia* e de *uropodia* e aumento da capacidade tumorigênica (Kato *et al*, 2010). A proliferação a longo prazo e a capacidade de autorrenovação, das células da população lateral e das células da população maioritária, derivadas da linha celular HEC-1 foram comparadas e verificou-se que as primeiras mantiveram as divisões durante 2 meses e capacidade de originar colônias secundárias e terciárias. A expressão de vimentina, de  $\alpha$ -SMA e de colagénio do tipo II surgiram aumentados na população lateral apontando para a capacidade de diferenciação no padrão celular mesenquimatoso (Kato *et al*, 2010). Outro trabalho que estudou a população lateral na linha celular HEC-50B revelou uma percentagem representativa deste fenótipo, de 0,5%, percentagem essa que se manteve após renovação da cultura da população lateral durante 3 semanas. Estudos realizados ao longo do tempo mostraram que a capacidade de proliferação foi superior à da população maioritária às 72 horas (Tomiyasu *et al*, 2014). A população lateral da linha celular RK12V apresentou 450 genes sobre-regulados comparando com a população maioritária, entre os quais se destacam os genes de regulação do desenvolvimento da EMT (Kusunoki *et al*, 2013).

No contexto das CSC endometriais foram avaliados marcadores relacionados com o desenvolvimento embrionário como o *MUSASHI-1*, o *NANOG* e o *OCT4*. O *MUSASHI-1*, um marcador relevante de células estaminais, é uma proteína com 39 kDa que se liga a RNA envolvido na manutenção e na divisão assimétrica das células progenitoras e que, nas CSC, foi associado ao crescimento e à progressão tumoral (Götte *et al*, 2011). Nas células progenitoras neuronais, o *MUSASHI-1* constitui um repressor da transcrição do *mNumb* (do inglês *mammalian Numb*) e da *P21* (inibidor-1 da cinase dependente da ciclina, do inglês *cyclin-dependent kinase inhibitor 1*) e um regulador da via de sinalização *NOTCH-1* (Götte *et al*, 2011). O *MUSASHI-1* está sobre-regulado no cancro do endométrio (Götte *et al*, 2008) e aumentado na população lateral da linha celular de cancro do endométrio Ishikawa (Hubbard *et al*, 2009; Götte *et al*, 2011). O *knockdown* do RNA mensageiro (mRNA) do *MUSASHI-1* levou à alteração da via de sinalização do *NOTCH-1*, do fator de transcrição *Hes-1*, da *P21* e da ciclina *B1* e, através destas vias, pode modular a apoptose e a progressão no ciclo celular (Götte *et al*, 2011). O *MUSASHI-1* foi avaliado em cancros do endométrio de 46 mulheres através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR, do inglês *quantitative real-time polymerase chain reaction*), da imunohistoquímica e da microscopia confocal, para avaliar a colocalização *NOTCH-1* e da telomerase (Götte *et al*, 2008). A distribuição das células *MUSASHI-1* foi difusa no tecido glandular em cerca de 75% dos carcinomas endometrioides. A comparação entre amostras de endométrio e de miométrio evidenciou aumento da expressão de *MUSASHI-1* no primeiro, presença de mRNA da telomerase em 63% das amostras de endométrio e expressão equivalente do mRNA do *NOTCH-1* (Götte *et al*, 2008). Foi observada colocalização de *MUSASHI-1* com *NOTCH-1* e a expressão com telomerase foi detetada no estroma

endometrial, na vizinhança das glândulas endometriais e nas próprias glândulas (Götte *et al*, 2008).

O NANOG é reconhecido como marcador de células estaminais e nas CSC foi associado à transformação, à tumorigênese e à metastização. Os níveis de mRNA do NANOG, do SOX-2 e do OCT4 são superiores em células de esferas derivadas de tecido endometrial em relação a células diferenciadas (Zhou *et al*, 2011a). O SOX-2 e o NANOG foram expressos em células derivadas de colônias de tumor endometrial e em amostras do mesmo tipo de tumores indicando que as células com capacidade clonogénica têm maior capacidade de autorrenovação (Hubbard *et al*, 2009).

O OCT4 é um oncogene que está associado com a autorrenovação de células estaminais embrionárias e que pode também causar desdiferenciação de células somáticas com consequente aparecimento de células estaminais pluripotentes, tanto em modelos animais como em humanos (Park *et al*, 2008a). O OCT4, conforme descrito anteriormente, está aumentado nas tumorosferas de endométrio (Zhou *et al*, 2011a) e a sua expressão foi positiva em 90% das células Ishikawa, enquanto no modelo tumorigénico esta percentagem representou cerca de 5%. Esta redução da expressão *in vivo* foi correlacionada com os estádios diferenciados das células tumorais (Wu *et al*, 2011).

A ALDH1 pertence à superfamília da ALDH e é considerada um potencial marcador de células estaminais do tecido tumoral e do tecido normal (Ginestier *et al*, 2007; Rahadiani *et al*, 2011). A ALDH oxida os aldeídos intracelulares em ácidos carboxílicos o que vai contribuir para a síntese de ácido retinoico e do neurotransmissor ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA, do inglês  *$\gamma$ -amino butyric acid*) e lhe permite ter um papel na manutenção e na diferenciação de células estaminais normais e de CSC. A ALDH tem uma região promotora CCAAT que é reconhecida pelo fator de transcrição nuclear YA (NFYA, do inglês *nuclear factor YA*). A população ALDH<sup>high</sup> de adenocarcinoma endometrial expressou preferencialmente a isoforma *short* do NFYA, enquanto a população ALDH<sup>low</sup> expressou predominantemente a isoforma longa do NFYA (Mamat *et al*, 2011). A expressão de MUSASHI foi semelhante considerando populações ALDH positivas e ALDH negativas em células de cancro do endométrio, o que aponta este marcador como não exclusivo das células iniciadoras tumorais (Götte *et al*, 2011). A expressão de ALDH1 foi detetada em amostras de tecido normal e em cancros do endométrio de 98 doentes. Os estudos imunohistoquímicos revelaram ausência de ALDH1 no tecido normal, quer na fase proliferativa quer na fase secretora. A positividade citoplasmática verificou-se num pequeno grupo de células tumorais em alguns casos e expressão difusa noutros casos. A expressão de marcadores de diferenciação como o CD9, e a presença de recetor de estrogénios e de recetores de progesterona foi negativa nas células ALDH positivas, definidas por marcação superior a 10% (Rahadiani *et al*, 2011). A expressão de ALDH em células tumorais foi correlacionada com o tamanho do tumor, a presença de invasão ganglionar, a resistência à quimioterapia, a recidiva e o pior prognóstico, incluindo a sobrevivência livre de doença e a sobrevivência global (Rahadiani *et al*, 2011).

O CD133 foi o primeiro marcador descrito para células estaminais no cancro do endométrio e tem sido também o mais estudado. O CD133 ou prominina-1 é uma glicoproteína com 120 kDa que pertence à família da prominina, família de proteínas integrais com 5 segmentos membranares (Mizrak *et al*, 2008). As células que expressam CD133 também expressam a glicofórmula Tn-MUC1 e são potencialmente suscetíveis ao sistema imune (Rutella *et al*, 2009). As células CD133<sup>+</sup> foram isoladas de tumores do endométrio por citometria de fluxo e apresentaram nessa amostra uma mediana de 18,1% de uma variação entre 1,3% e 61,6% (Rutella *et al*, 2009). Estas células (CD133<sup>+</sup>) foram mantidas em cultura durante 12 semanas e formaram esferas *in vitro*, o que salienta a sua capacidade de autorrenovação. Esta população apresenta um perfil de expressão de genes peculiar, consistente com maiores níveis de expressão de metaloproteinases da matriz, *interleucina-8*, *CD44*, *CXCR4* (do inglês, *C-X-C chemokine receptor type 4*) (Rutella *et al*, 2009). Noutro estudo com amostras de cancro do endométrio primário humano, a percentagem da população CD133<sup>+</sup> variou de 5,7% a 27,4% (Friel *et al*, 2010). As linhas celulares de carcinoma do endométrio Ishikawa e MFE280 apresentaram uma frequência de células CD133<sup>+</sup> de 15,5% e 9,3%, respetivamente, no entanto esta percentagem foi inferior a 1% nas células das linhas celulares HEC-1A, AN3CA e RL95-2 (Nakamura *et al*, 2010). A importância *in vitro* do CD133 levou a que o seu impacto prognóstico fosse avaliado em mulheres com carcinoma do endométrio (Nakamura *et al*, 2010). Deste estudo resultou que a expressão de CD133 não foi associada com as características clinicopatológicas do tumor, incluindo a idade da doente, o estágio FIGO, a presença de metastização ganglionar, a invasão profunda do miométrio, o grau histológico, a menopausa ou o índice de massa corporal, mas correlacionou-se com a sobrevivência global (Nakamura *et al*, 2010).

O oncogene *BMI1* regula genes homeostáticos e influencia a repressão da transcrição (Honig *et al*, 2010). Este gene foi descrito em vários tumores sólidos incluindo o cancro da mama e cancros ginecológicos como cancro do ovário e do endométrio (Honig *et al*, 2010; Dong *et al*, 2013). O gene *BMI1* regula diretamente a proteína TWIST1 que é essencial para promover a EMT (Yang *et al*, 2010). O estudo da expressão deste gene no cancro do endométrio mostrou que a população CD133<sup>+</sup> teve uma expressão aumentada de *BMI1* a qual estava ausente na população CD133<sup>-</sup> (Nakamura *et al*, 2010).

A expressão de genes relacionados com o desenvolvimento embrionário foi correlacionada com o prognóstico do cancro do endométrio. Os cancros do endométrio avançados apresentaram sobre-expressão de 26 genes associados a células estaminais epiteliais (EpiSCs, do inglês *epithelial stem cells*) (Chang *et al*, 2009). Alguns destes genes foram o da desintegrina A e da metaloproteinase A-17 (*ADAM17*, do inglês *A disintegrin and A metalloproteinase 17*), o da proteína-1 associada com adenilato ciclase (*CAPI*, do inglês *adenylate cyclase-associated protein 1*), o da proteína-10 da morte celular programada (*PDCD10*, do inglês *programmed cell death protein 10*), o da presenilina-1 (*PSENI*, do inglês *presenilin 1*) e o da

protease-2 SUMO-específica (SENP2, do inglês *SUMO-specific protease 2*) (Chang *et al*, 2009).

O processo EMT, que está associado às propriedades de CSC, promove a degradação da matriz extracelular e, como consequência, ocorre migração de células, nomeadamente CSC (Mirantes *et al*, 2013). A via Wnt/ $\beta$ -catenina foi descrita em tumores endometrioides e a ativação da via HEDGEHOG e WNT/ $\beta$ -catenina foi associada com um comportamento tumoral mais agressivo e com indução de EMT (Dong *et al*, 2013). A expressão de CD44, a jusante da via WNT/ $\beta$ -catenina, está presente tanto na hiperplasia como em tumores bem diferenciados do endométrio. Esta expressão foi induzida pelos estrogénios e foi inibida pela progesterona de forma semelhante no endométrio normal e no cancro do endométrio (Wang *et al*, 2009). A mutação e a desregulação dos genes *PTEN*, *PIK3CA*, *CTNNB1* e *KAS* influenciam as vias associadas com a EMT (Mirantes *et al*, 2013). Vários genes relacionados com a EMT foram associados à população lateral, como o da fibronectina, da TWIST, do fator de transcrição PU.1 (SPI1, do inglês *transcription factor PU.1*), do FOXC2 e do SNAIL, tanto em células da linha HEC-1 e como da linha RK12V (Kusunoki *et al*, 2013).

A sobre-regulação do gene da proteína secretada, ácida e rica em cisteína (*SPARC*, do inglês *secreted protein acidic and rich in cysteine*) foi associado à EMT (Yusuf *et al*, 2014). A SPARC é uma proteína da matriz extracelular que modula as interações das células com a matriz extracelular durante o desenvolvimento, a remodelação e a reparação tecidual. A expressão desta proteína foi verificada no tecido tumoral endometrial, particularmente em adenocarcinomas endometrioides pouco diferenciados, enquanto no tecido normal não se detetou a sua expressão. A migração celular foi avaliada em células da linha Ishikawa transfectadas com o gene SPARC e verificou-se que a migração estava aumentada nas células transfectadas e que diminui quando a expressão foi reprimida (Yusuf *et al*, 2014). A expressão de fibronectina, marcador da EMT, também aumentou nas células que sobre-expressam SPARC (Yusuf *et al*, 2014).

As alterações epigenéticas, incluindo a metilação e a expressão de micro-RNAs, são processos importantes do desenvolvimento tumoral. O processo de metilação varia com o tipo de tecido e, inclusivamente, dentro do próprio tecido glandular uterino (Kim *et al*, 2005). Porém, apesar de no endométrio existir um aumento da metilação relacionado com a idade, este processo não só estabiliza na menopausa como ocorre significativamente menos metilação em mulheres múltiparas e magras com mais de 52 anos (Kim *et al*, 2005). O CD133, descrito em CSC do cancro do endométrio, pode ser regulado por fenómenos epigenéticos. O gene tem uma região promotora P1 a P5, mas as regiões P1 e P2 são inativadas por metilação (Friel *et al*, 2010). Nos tumores endometriais primários, a região P1 do gene CD133 apresenta taxa de metilação significativamente menor do que no endométrio benigno o que determina que a metilação influencia a regulação epigenética do CD133, como foi demonstrado pelo promotor da metilação da 5-aza-2'-deoxicitidina (Friel *et al*, 2010).

Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA não-codificante que intervêm no controlo epigenético da



transcrição gênica (Dong *et al*, 2014). Os microRNAs apresentam uma expressão diferencial no endométrio normal e no cancro do endométrio e foram correlacionados com a via PTEN-PI3K-AKT-mTOR, que está envolvida nas CSC endometriais e na progressão tumoral (Dong *et al*, 2014). O microRNA-145 está presente em tecidos derivados das linhas germinativas e da mesoderme e é considerado um supressor tumoral. Na linha celular Ishikawa a sobre-regulação do microRNA-145 parece ter induzido diferenciação através da diminuição da expressão de OCT4 (Wu *et al*, 2011). Os grandes ácidos ribonucleicos intergênicos não codificantes-RoR (linc-RoR, do inglês *large intergenic non-coding ribonucleic acids-RoR*) regulam os fatores de transcrição das células estaminais e inibem a diferenciação mediada pelo micro-RNA-145 em tumorosferas endometriais (Zhou *et al*, 2014a). O microRNA-134 também inibiu a proliferação de CSC e a sua sobre-expressão diminuiu a O-glicosiltransferase-I que regula a via do NOTCH (Gao *et al*, 2015). Os microRNAs também mostraram influenciar a EMT, particularmente o micro-RNA194 que suprime o gene *BMI1* em linhas celulares de cancro do endométrio, gene envolvido na EMT e possivelmente também no processo de metastização (Dong *et al*, 2011). A sobre-expressão do microRNA-101 foi associada com propriedades de células estaminais, incluindo a EMT, a migração celular, a inibição de tumorosferas e a quimiossensibilidade ao paclitaxel em linhas celulares de carcinoma do endométrio seroso (Konno *et al*, 2014).

Outro fator de transcrição importante para a capacidade de autorrenovação e a manutenção do estado indiferenciado de células estaminais embrionárias é o SALL4 o qual já foi descrito para o cancro do endométrio assim como foi associado a menor sobrevivência e à progressão do tumor (Li *et al*, 2013).

A capacidade tumorigênica *in vivo* é uma das propriedades das CSC e existem alguns estudos que avaliaram a tumorigênese no cancro do endométrio. Neste contexto, a população lateral da linha celular AN3CA teve capacidade tumorigênica com um número reduzido de células ( $2 \times 10^4$ ) em ratinhos SCID/NOD (Friel *et al*, 2008). Estes autores também descreveram um modelo animal de transplantação seriada de células H-2K<sup>d</sup> originárias de um único tumor endometrial onde verificaram a manutenção do fenótipo histológico. Nos tumores endometriais primários obtidos, a população lateral correspondeu a valores entre os 0,05% e 3,35%, com a manutenção de uma pequena população que reteve o corante CM-Dil que marcou as células antes da inoculação (Friel *et al*, 2008). A população lateral da linha celular de adenocarcinoma do endométrio HEC-50B, também apresentou maior capacidade tumorigênica em ratos SCID/NOD que a população maioritária. (Tomiyasu *et al*, 2014). A população lateral e a não lateral da linha celular HEC-1 foram inoculadas em ratinhos *nude* nos quais formaram tumores após 4 e 10 semanas, respetivamente. Deste estudo concluiu-se que os tumores com origem na população lateral apresentaram um crescimento mais rápido e foi descrita uma tendência para aumento do tamanho dos tumores em relação à outra população (Kato *et al*, 2010).

Os tumores endometriais primários foram propagados e expandidos por um sistema experimental *in vivo*

através de passagens seriadas em ratinhos SCID/NOD. As células tumorais CD133<sup>+</sup> originaram tumores em todos os casos com um período de latência de 43 dias, enquanto com as células CD133<sup>-</sup> apenas um em três casos apresentou tumor e, somente, após 89 dias de latência. O CD133<sup>+</sup> foi avaliado nos tumores endometriais transplantados serialmente e verificou-se uma expressão de CD133 qualitativamente aumentada na proporção de células CD133<sup>+</sup> do xenotransplante. O *array* de hibridização genômica comparativa não demonstrou evidências de amplificação do gene da região cromossômica 4p15.32 que codifica o CD133 (Friel *et al*, 2010). Quanto à capacidade tumorigênica das esferas derivadas de tumores do endométrio, ela também foi avaliada em modelos de xenotransplantação. As células das esferas derivadas do cancro do endométrio foram mais tumorigênicas uma vez que todos os animais desenvolveram tumores, ao contrário das células diferenciadas derivadas das tumorosferas em que apenas 3 em 15 animais desenvolveram tumores (Zhou *et al*, 2011a). A expressão de NANOG nas tumorosferas foi positivamente correlacionada com a sua capacidade tumorigênica, no entanto considerando tumores secundários, a expressão foi semelhante à dos tumores humanos de origem (Zhou *et al*, 2011a). As células epiteliais de carcinoma do endométrio não aderentes derivadas de tumores primários foram transplantadas na cápsula renal de ratinhos imunodeprimidos SCID/NOD e originaram tumores que recapitularam as características do tumor original, incluindo a expressão de recetores de estrogénios, de recetores de progesterona, de vimentina e de citoqueratinas (Hubbard *et al*, 2009).

Como descrito anteriormente, as terapêuticas dirigidas a CSC constituem uma possibilidade promissora. No que respeita ao cancro do endométrio foi estudado o efeito da salinomicina. Este fármaco é um antibiótico que atua na membrana citoplasmática e mitocondrial, promovendo o efluxo de potássio e a inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial. Recentemente foi descrito que a salinomicina induz apoptose e limita a resistência a este processo através da sobre-expressão de BCL-2 e de glicoproteína-P assim como de outros transportadores ABC ou do proteossoma 26S com atividade proteolítica desregulada (Kusunoki *et al*, 2013). Na população lateral da linha celular de endométrio HEC-1, a salinomicina inibiu a proliferação e diminuiu a viabilidade celular e a cromatina apresentou fragmentação, sugerindo indução da apoptose. A expressão do fator-1 de aumento de ligação linfóide (LEF1, do inglês *lymphoid enhancer-binding factor-1*), assim como a da ciclina D1, ambos associados à via Wnt, diminuiu durante o tratamento com salinomicina. Também foi observada supressão da expressão de fibronectina e inibição da migração e da invasão das células da população lateral. Os autores ainda reportaram uma diminuição do tamanho do tumor em animais submetidos a este tratamento (Kusunoki *et al*, 2013).

## Resistência ao tratamento e CSC do endométrio

A resistência das CSC ao tratamento oncológico pode ser considerada como característica inerente à sua plasticidade. Os mecanismos de resistência descritos para as CSC incluem a influência dos transportadores de efluxo ABC, a atividade da ALDH, o aumento da resistência aos danos no DNA, a autofagia, o aumento da resistência à apoptose, a ativação de vias de desenvolvimento e o estímulo do microambiente (Tang, 2012; Carvalho *et al*, 2015b).

A superfamília dos transportadores ABC integra um mecanismo de homeostase e de defesa, igualmente presente em diversos tecidos e inclui três membros centrais, o transportador MDR-1 ou ABCB1 ou glicoproteína-P, a proteína resistente ao cancro da mama (BCRP, do inglês *breast cancer resistance protein*) ou ABCG2 e a proteína-1 associada a resistência multifármacos (MRP1, do inglês *multidrug resistance protein 1*) ou ABCB1 (Vasiliou *et al*, 2009). O aumento da expressão destas proteínas em vários tumores leva ao efluxo dos citostáticos lipofílicos e catiónicos, dependente de adenosina trifosfato (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*) e origina concentrações celulares abaixo da concentração tóxica (Cojoc *et al*, 2014). A maioria dos fármacos de quimioterapia convencional pode ser alvo deste mecanismo de resistência. Dos diferentes fármacos disponíveis que podem ser sujeitos a esse tipo de mecanismo de extrusão, incluem-se os anti-metabólitos, os inibidores da topoisomerase assim como alguns fármacos dirigidos a alvos moleculares como os inibidores tirosina cinase sorafenib, imatinib, nilotinib, gefitinib e erlotinib (Cojoc *et al*, 2014). A população de CSC apresenta aumento da expressão dos transportadores ABC, o que lhes atribui maior resistência ao tratamento (Cojoc *et al*, 2014). Este mecanismo de resistência foi já associado com as CSC do endométrio. A população lateral e a população maioritária da linha celular AN3CA de carcinoma do endométrio foram avaliadas relativamente à sensibilidade à quimioterapia. As células foram submetidas a paclitaxel, substrato do MDR-1 e a cisplatina, substrato do MDR-2. As células da população lateral mostraram-se mais resistentes ao paclitaxel, possivelmente devido ao mecanismo envolvendo o transportador MDR associado à proteína 2 (MRP-2), mas não se verificaram diferenças significativas no que à cisplatina dizia respeito (Friel *et al*, 2008). As células derivadas de cancro do endométrio CD133<sup>+</sup> e CD133<sup>-</sup> foram submetidas a tratamento com cisplatina, paclitaxel e doxorrubicina. Os resultados mostraram que a cisplatina e o paclitaxel induziram respostas negligenciáveis de apoptose nas células CD133<sup>+</sup> em comparação com as CD133<sup>-</sup>, indiciando resistência aos citostáticos testados. No entanto, em relação à doxorrubicina as células derivadas de cancro do endométrio CD133<sup>+</sup> e CD133<sup>-</sup> apresentaram percentagens comparáveis de apoptose, o que indica sensibilidade semelhante à doxorrubicina (Rutella *et al*, 2009). Nakamura e colaboradores avaliaram a quimiossensibilidade das células CD133<sup>+</sup> nas linhas celulares de endométrio Ishikawa e MFE280. Para a cisplatina, a viabilidade das células CD133<sup>+</sup> às 48 horas foi de 78% e de 30% para as concentrações mais baixas e mais elevadas, respetivamente, comparando com 92% e 20% para as mesmas

concentrações das células CD133<sup>-</sup>. Considerando o paclitaxel, a viabilidade das células CD133<sup>+</sup> variou de 82% a 37% e das células CD133<sup>-</sup> de 67% a 38%. A linha celular MFE280 teve resultados com diferenças significativas de viabilidade entre as células CD133<sup>+</sup> e as CD133<sup>-</sup> com a concentração de cisplatina de 12 µmol/L, no entanto com as concentrações de 10 e de 20 nmol/L, não houve diferenças (Nakamura *et al*, 2010). A população ALDH<sup>high</sup> da linha celular HEC-1 foi avaliada considerando a resposta à cisplatina. A população ALDH<sup>low</sup> foi mais vulnerável à cisplatina que as células ALDH<sup>high</sup>, que permaneceram semelhantes ao controlo (Rahadiani *et al*, 2011). A influência dos androgénios foi avaliada na população resistente das CSC endometriais com aumento da expressão de CD133 e evidência de resistência à cisplatina (Chen *et al*, 2013).

A ALDH1 e a ALDH3A1 respondem ao stresse oxidativo pela espoliação de radicais livres induzidos pela radiação, o que evidencia a sua importância como reguladores na radiosensibilidade celular (Singh *et al*, 2013). A atividade ALDH aumentada está associada a radio e a quimiorresistência de CSC em diversos tumores (Cojoc *et al*, 2014). A ALDH também se correlaciona com ativação de vias de sobrevivência. A inibição da ALDH associou-se com a subregulação da expressão e da atividade mTOR e a ativação da via NOTCH (Cojoc *et al*, 2014).

O aumento dos mecanismos de reparação aumentados nas CSC foram descritos para diversos tumores, como os gliomas, o carcinoma da nasofaringe, o cancro do pulmão e o cancro da mama (Cojoc *et al*, 2014). Um dos mecanismos de lesão do DNA por diversos citostáticos e pela radiação são as quebras da dupla cadeia, lesões que podem ser reparadas por recombinações homólogas diretas ou por ligações não homólogas terminais (Cojoc *et al*, 2014). Uma das respostas mais bem caracterizadas às modificações da cromatina é a fosforilação da histona H2A.X na serina 139, pelas serina/treonina cinases PI3K, ATM ou ATR, que são ativadas pela lesão do DNA (Revet *et al*, 2011). Por outro lado, foi sugerido que nas CSC a quimioterapia induz a ativação do primeiro *checkpoint* do ciclo celular, que proporciona a reparação mais eficaz do DNA e, por consequência, maior sobrevivência (Cojoc *et al*, 2014). Estes mecanismos de resistência ao tratamento foram associados ao fenótipo de células progenitoras CD133<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> e CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>, (Cojoc *et al*, 2014).

A radiação induz morte celular como resposta direta à transferência de energia para estruturas celulares cruciais como a cromatina, componentes da membrana plasmática e da mitocôndria, ou com resposta indireta à geração de ROS e de radicais livres. As células equilibram a produção e a eliminação de ROS por mecanismos enzimáticos como a glutatíon, a peroxidase, a catalase, a superóxido dismutase e a tioredoxina (Trachootham *et al*, 2009). No caso das CSC, também foi proposto um mecanismo de resistência que assenta na eliminação mais eficiente de ROS e menor produção de ROS após irradiação (Cojoc *et al*, 2014). O fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> do cancro da mama foi associado a este mecanismo. Adicionalmente, foi descrita a interação do CD44 e do transportador glutamato-cisteína para tumores gastrointestinais, o que leva a

apontar a expressão de CD44 como responsável pela resistência ao tratamento (Cojoc *et al*, 2014).

A autofagia surge como um mecanismo de degradação intracelular e de homeostase, no qual os organelos ou as proteínas lesados são sequestrados por autofagossomas de dupla membrana que, ao se fundirem com os lisossomas que contêm enzimas proteolíticas, formam os auto-lisossomas. O fluxo autofágico foi descrito no cancro da mama e parece estar aumentado em mamosferas assim como na população ALDH1 positiva. A autofagia poderá ser fundamental para o mecanismo de tumorigénese, especialmente em ambiente de hipoxia (Cojoc *et al*, 2014).

O aumento da resistência à apoptose pode estar alicerçado nas CSC. A apoptose mitocondrial é equilibrada pela integridade da membrana mitocondrial que está dependente de proteínas anti-apoptóticas, de proteínas pró-apoptóticas e da presença de BH3 da família da BCL2 (Colak & Medema, 2014). Nas CSC o aumento de proteínas anti-apoptóticas eleva o limiar da apoptose e protege a célula dos danos. As proteínas BCL2 estão aumentadas nas CSC da mama e a população de CSC CD133<sup>+</sup> tem a expressão de BCL2 aumentada (Colak & Medema, 2014).

A repopulação de CSC após e durante o tratamento é responsável pela resistência ao tratamento devido à ativação das vias da WNT, da NOTCH e da HEDGEHOG (Tang, 2012). Na população CD133<sup>+</sup> de CSC neuronais, o bloqueio da via HEDGEHOG por inibidores da gama-secretase levou à sensibilização de CSC ao tratamento com antraciclinas (Cojoc *et al*, 2014). A via NOTCH também parece ser ativada nas células CD133<sup>+</sup> da população de CSC de gliomas através da via PI3K/AKT (Cojoc *et al*, 2014). Em tumores do pulmão, a população CD133<sup>+</sup> teve a sua sensibilidade aumentada ao paclitaxel e à doxorrubicina pelos inibidores da gama-secretase e o mesmo se verificou nas CSC do ovário quando foram utilizados derivados da platina (Cojoc *et al*, 2014). Portanto, a inibição das vias NOTCH e Hedghog foram associadas a aumento da sensibilidade a fármacos da quimioterapia convencional, levantando uma potencial plataforma para terapêuticas dirigidas.

A influência do microambiente pode ser importante na resistência, particularmente fatores como a disponibilidade de oxigénio e a competência do sistema imune, nomeadamente as células T citotóxicas, os macrófagos e os fibroblastos, as interações entre as células tumorais e o estroma, e alguns fatores extracelulares (Rosen & Jordan, 2009). Existem vários fatores que regulam o crescimento tumoral que são produzidos pelas células tumorais, pelas células estaminais mesenquimatosas e pelos fibroblastos, incluindo a interleucina-1, a interleucina-6, a interleucina-8, a quimiocina ligando 12 (CXCL12, CCL2), o PDGF, o TGF- $\beta$ , o fator de necrose tumoral- $\alpha$ , o EGF, o VEGF e o FGF (Cojoc *et al*, 2014). Estas moléculas são mediadoras entre as CSC e o seu nicho e também regulam a sensibilidade à radiação e à quimioterapia. O tratamento com paclitaxel das células de cancro da mama triplo negativo aumentou o TGF- $\beta$  e a interleucina-8, levando à expansão das CSC (Cojoc *et al*, 2014). O microambiente irradiado produz fatores de crescimento como o

PDGF, a interleucina-1 $\beta$ , o fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*), o TGF $\beta$ , a quimiocina CXCL12 e as metaloproteinases da matriz, que promovem o crescimento de células tumorais e de células endoteliais e aceleram o desenvolvimento de fenótipos de CSC de maior agressividade (Cojoc *et al*, 2014). A hipoxia do nicho pode proteger as CSC dos estímulos do microambiente provocados pelo tratamento de radioterapia ou de quimioterapia. A hipoxia foi associada a recorrência precoce após radioterapia, dado que o déficit de oxigênio limita não só a quantidade de ROS produzidas como os danos celulares por elas provocados. Outro mecanismo é a ativação do fator indutor de hipoxia (HIF, do inglês *hypoxia-inducible factors*) e a indução da EMT, responsáveis pela manutenção e regulação de CSC (Cojoc *et al*, 2014). Assim, a hipoxia pode proteger as CSC dos danos pelo que a tentativa de atingir as CSC do nicho associado com terapêuticas convencionais pode melhorar os resultados clínicos.

### Metastização e CSC do endométrio

A metastização é um fenómeno definido pela disseminação das células cancerígenas do tumor original para locais distantes. Nos tumores sólidos, o sistema linfático é o veículo de referência, através de um processo conhecido como disseminação linfática, sendo a disseminação hematogénica um processo secundário (Li & Li, 2014). O processo de metastização envolve a invasão local, a intravasação, a sobrevivência na circulação, a extravasação e a colonização. As células estaminais agregam um conjunto de características que propiciam esta disseminação, pois sobrevivem na circulação, são capazes de invadir os tecidos normais, originam neovascularização, resistem à quimioterapia e à radioterapia e escapam ao sistema imune.

A hipótese das CSC foi associada ao processo de metastização através de diversas vias como a angiogénese e a linfangiogénese. A hipoxia tumoral sobrerregula a expressão de VEGF, uma molécula chave na angiogénese, que ativa o VEGFR das células endoteliais. As alterações da integridade e da permeabilidade vascular promovem a intravasação e a extravasação (Li & Li, 2014). São intervenientes no processo de angiogénese diversas isoformas do VEGF, nomeadamente o VEGF-C e o VEGF-D que funcionam através do VEGFR-3, expresso na superfície das células endoteliais linfáticas. O HGF, o FGF-2, o PDGFBB, o IGF-1, o IGF-2 e a endotelina-1 foram identificados como indutores da angiogénese e de linfangiogénese (Li & Li, 2014). Apesar da origem das células endoteliais linfáticas e sanguíneas do tumor ser ainda controversa, as possíveis origens são as células endoteliais assim como os precursores hematopoiéticos da medula óssea que são recrutados para angiogénese e que suportam a formação de novos vasos. Podem ainda originar-se nos macrófagos associados ao tumor que se transdiferenciam em células endoteliais linfáticas que integram os vasos linfáticos existentes, as células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea que modificam o seu fenótipo, as células endoteliais sanguíneas e as CSC que se transdiferenciam em células endoteliais (Li

& Li, 2014). As CSC têm potencial maior para a angiogênese e para a linfangiogênese que outras células tumorais e as células CD133<sup>+</sup> podem ser importantes neste fenómeno, conforme foi já descrito para os gliomas (Bao *et al*, 2006).

As células com capacidade de metastização por via linfática foram associadas com o fenótipo das CSC (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) no cancro da mama. Neste contexto a positividade para a ALDH1 foi associada com invasão ganglionar difusa em tumores primários gástricos (Li & Li, 2014). As CSC sofrem transformação em células estaminais mesenquimatosas, descrito como EMT, disseminam-se e a colonização destas células nos locais secundários após extravasação necessita de uma transformação inversa, a transição mesenquimatosa para epitelial (MET, do inglês *mesenchymal-epithelial transition*) (Liao *et al*, 2014). Este processo está naturalmente limitado, uma vez que apenas cerca de 1% das células disseminadas acaba por originar metástases. A indução de EMT em células epiteliais diferenciadas pode sobreregular o CD44 e subregular o CD24. De fato, a diminuição da expressão de marcadores epiteliais como a E-caderina e o aumento da metaloproteinase-2 da matriz (MMP-2, inglês *matrix metalloproteinases-2*) foi já associada à capacidade de metastização das CSC em gliomas (Liao *et al*, 2014). No processo de metastização foram descritas células tumorais disseminadas na medula óssea (DTC, do inglês *disseminated tumor cells*) e células tumorais circulantes no sangue periférico (CTC, do inglês *circulating tumor cells*). Vários marcadores de células estaminais foram associados a colonização e a formação de tumores secundários, incluindo o CD44v6 no cancro colorretal, o CD44 no cancro do pulmão e cancro da mama e a subpopulação CD133<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup> no cancro do pâncreas (Liao *et al*, 2014). Ainda, as CSC exprimem mais fatores angiogénicos e linfangiogénicos quando colocadas em situação de hipoxia, sugerindo que promovem indiretamente a angiogênese e a linfangiogênese. Em relação com esta problemática foi já descrito, em gliomas, que as CSC produzem maiores níveis de VEGF sob a regulação de CXCL12 e do seu recetor CXCR4 (Liao *et al*, 2014).

O papel das CSC no processo de metastização do cancro do endométrio está ainda a ser investigado. O crescimento da linha celular HEC-1 foi monitorizado com vídeo utilizando a tecnologia *time-lapse* e as células da população lateral mostraram divisão celular superior às da população maioritária, com formação de lamelipodia e de uropodia, e com capacidade de migração. As células da população maioritária não mostraram formação de pseudópodes nem de migração (Kato *et al*, 2010). Numa tentativa de compreender os mecanismos envolvidos, a atividade de invasão e de migração foi avaliada em células endometriais transfectadas com o gene *SPARC* (*IK-SPARC*) tendo-se verificado que a migração está aumentada mas não a invasão em relação às células com subregulação SPARC. Verificou-se ainda que as células *IK-SPARC* expressaram níveis aumentados de fibronectina, associado ao fenótipo EMT (Yusuf *et al*, 2014).

As células tumorais circulantes são referidas como um importante marcador de prognóstico. Num estudo recente com doentes com cancro do endométrio de grau 3 em estádios Ib a estágio IV e recorrentes foi

correlacionado o imuno-isolamento das células tumorais circulantes baseado em EpCAM, seguido por extração e pré-amplificação de RNA. A principal característica observada no perfil das células tumorais circulantes nos doentes com cancro do endométrio foi o fenótipo EMT com quase todos os genes analisados associados com plasticidade, nomeadamente o *ETV5*, o *NOTCH1*, o *SNAI1*, o *TGFBI*, o *ZEB1* e o *ZEB2*. A expressão dos genes analisados incluiu marcadores de CSC como a ALDH e o CD44 e observou-se concordância entre a presença de células tumorais circulantes e a doença recorrente (Alonso-Alconada *et al*, 2014).



## CAPÍTULO IV – OBJETIVOS



O cancro do endométrio é um tumor de bom prognóstico em estádios iniciais, no entanto existe um grupo de doentes que evolui de forma desfavorável. As opções terapêuticas são pouco eficazes no controlo da doença metastática e da doença recorrente. Os tumores do endométrio são constituídos por uma população heterogénea, cuja caracterização molecular, resposta à terapêutica e comportamento biológico necessitam de mais esclarecimento.

O objetivo principal deste trabalho experimental foi a caracterização da população de células de cancro do endométrio com propriedades de CSC *in vitro*.

Como primeiro objetivo, pretendeu-se isolar as populações com capacidade de formação de esferas *in vitro*, assim como as populações derivadas de modo a contribuir para a sua caracterização. Com este objetivo foram realizados estudos que avaliaram marcadores de CSC e outros marcadores moleculares associados com vias de regulação de CSC. Pretendeu-se estabelecer o perfil metabólico e proteómico destas células. Com o objetivo de avaliar a tumorigénese das populações de esferas e suas derivadas aderentes, desenvolveu-se um modelo *in vivo* heterotópico.

De modo a estudar a resposta à terapêutica, pretendeu-se avaliar o efeito dos citostáticos e da radioterapia nas populações previamente caracterizadas. Objetivou-se a avaliação do efeito citotóxico, a sobrevivência, as vias de morte e os danos no DNA e especificar esta resposta de acordo com a população celular.

Simultaneamente e com o objetivo de avaliar o comportamento no ambiente nativo, foi desenvolvido um modelo ortotópico de cancro do endométrio. Com este modelo, auxiliado por estudos de imagem molecular e por estudos *ex vivo*, pretendeu-se caracterizar a formação do tumor uterino e o seu potencial de metastização.



## **PARTE II – TRABALHO EXPERIMENTAL**



## CAPÍTULO V — CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS





O cancro do endométrio é um tumor constituído por uma população celular heterogénea. Neste capítulo pretende-se contribuir para a caracterização da população com propriedades de CSC *in vitro*. Deste modo, descreve-se o isolamento de esferas *in vitro* e a obtenção de populações de esferas e derivadas aderentes através da alternância sucessiva do protocolo de esferas e da colocação destas em condições aderentes. Estas populações foram caracterizadas relativamente à eficácia de formação de esferas, capacidade de autorrenovação, capacidade clonogénica, tempo de duplicação e área de projeção de esferas. Nesta secção apresentam-se os estudos da expressão de marcadores de CSC e outras proteínas envolvidas na proliferação e diferenciação, como os recetores de estrogénios, os recetores de progesterona, o HER2, a P53 e a  $\beta$ -catenina. As populações obtidas foram ainda analisadas do ponto de vista do metabolismo da glicose e avaliada a expressão diferencial do proteoma na eletroforese bidimensional. A capacidade tumorigénica foi descrita num modelo heterotópico que avaliou o crescimento de cada população.

## Material e Métodos

### Culturas celulares

Neste trabalho experimental foi utilizada a linha celular de carcinoma endometriode humano do tipo I ECC-I, obtida à *American Type Culture Collection* (ATCC) a 1 de Junho de 2012. Esta linha celular foi descongelada e propagada em cultura aderente de acordo com as recomendações do fornecedor. A linha celular foi mantida em cultura a 37°C em atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> numa incubadora HeraCell 150. Para a manutenção celular utilizou-se o meio de cultura *Rooswell Park Memorial Institute 1640 Medium* (RPMI; Sigma R-R6504), suplementado com 5% de soro bovino fetal (FBS, do inglês, *Fetal Bovine Serum*, Sigma F-7524), 400 mM de piruvato de sódio (Gibco, 11360) e 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomina; Sigma A5955).

Para realizar os estudos *in vitro* foi necessário destacar as células do substrato e preparar suspensões celulares. Neste procedimento as culturas celulares foram lavadas com tampão de fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Saline*) constituído por NaCl (Sigma, S7653) na concentração de 137 mM, KCl (Sigma, P9333) na concentração de 2,7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma, S5011) na concentração de 10 mM e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> na

concentração de 1,8 mM de (Sigma, P0662), com pH a 7,4. De seguida as culturas celulares foram incubadas com 2 ml de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma, T4049), durante dez minutos a 37°C, para que ocorresse a separação celular. A tripsina foi de seguida inativada com 5 ml de meio de cultura. As suspensões celulares obtidas foram centrifugadas a 200 G durante 5 minutos (Heraeus Multifuge 1L-R). Após a centrifugação, os *pellets* foram suspensos num volume conhecido de meio de cultura. Procedeu-se à contagem de uma alíquota da suspensão celular corada com azul de tripano, em câmara de *neubauer*, num microscópio ótico invertido (Nikon Eclipse TS 100) com ampliação de 100 vezes. Este método identifica as células viáveis que excluem o azul tripano, e se apresentam de cor branca brilhante, e as células mortas, sem integridade de membrana, que coram de azul. Após a contagem, o volume das suspensões celulares foi ajustado com meio de cultura, de forma a obter a concentração celular pretendida para cada estudo.

### Protocolo de formação de esferas e de derivadas aderentes

O ensaio de formação de neuroesferas, descrito em 1996, constituiu um grande avanço na investigação na área das células estaminais neurais adultas (Reynolds & Weiss, 1996). Este procedimento permitiu a obtenção de células neurais multipotentes indiferenciadas através da sua manutenção em condições de cultura em suspensão. Mais tarde, o isolamento de células pela independência da ancoragem e a capacidade de originar colónias esféricas em suspensão tornou-se um instrumento no estudo de células estaminais adultas de vários tecidos e uma abordagem funcional particularmente útil para individualizar subpopulações de CSC quando não existem marcadores específicos definidos, como aliás acontece para a maior parte dos tumores (Dontu *et al*, 2003b; Cao *et al*, 2011).

Neste trabalho foram obtidas colónias de células esféricas em suspensão que passarão a ser designadas por esferas e populações de células derivadas das esferas que passarão a ser designadas por derivadas aderentes. As esferas e as suas derivadas aderentes foram obtidas, conforme descrito de seguida, em três gerações identificadas por ES1, ES2 e ES3 (esferas de tumor endométrio, do inglês, *endometrial spheres*) e por G1, G2 e G3 (gerações aderentes derivadas de esferas do endométrio, do inglês, *generations of adherent derived endometrial spheres*), respetivamente.

O protocolo de formação de esferas foi adaptado de trabalhos descritos anteriormente (Dontu *et al*, 2003a; Ponti *et al*, 2005; Wilson *et al*, 2008). Para a sua realização a linha celular ECC-1 foi cultivada em condições não aderentes em frascos (Sarstedt, 83.1813.502) ou placas (Costar, 3548) de cultura de baixa aderência revestidos com poli(2-hidroxiethyl-metacrilato (poli-hema, Sigma, P3932). O meio de cultura utilizado

para este ensaio foi composto de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* e da mistura de nutrientes de Ham F12 numa proporção de 1:1 (Sigma, DMEM-F12 D8900), de consistência semissólida através da adição de metilcelulose (Sigma, M7027) na concentração de 1%, para prevenir a agregação celular e assegurar que as esferas derivam de uma única célula (Mani *et al*, 2008). A composição do meio de cultura foi completada com a suplementação com putrescina 100  $\mu$ M (Sigma, P7505), de insulina-transferrina-selênio-A (Gibco, 51300-044) na concentração de 1% e de fatores de crescimento, nomeadamente, o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF, do inglês, *fibroblast growth factor basic*, Sigma, F0291) e de fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês, *epidermal growth factor*, Sigma, E9644), ambos na concentração de 10 ng/mL, reposta a cada dois dias. Após 5 dias, obteve-se a primeira geração de esferas, que se designou por ES1. As células obtidas foram cultivadas em condições de cultura standard previamente descritas para a linha ECC-1. Este processo permitiu obter a primeira geração de células com morfologia aderente derivadas de esferas, que se designou por G1. Após se atingir a confluência celular de 85 a 90% o procedimento descrito para o protocolo de formação de esferas foi repetido de modo a obter culturas secundárias, originando a segunda geração de esferas, ES2. Esta alternância entre o protocolo de formação de esferas e as condições de cultura *standard* foi repetida sucessivamente, permitindo prosseguir os estudos *in vitro* com as 3 populações de esferas (ES1, ES2 e ES3) e as 3 populações de populações derivadas aderentes (G1, G2 e G3).

## Capacidade de formação de esferas

O ensaio de capacidade de formação de esferas pretendeu avaliar a competência que as células das populações com morfologia aderente têm, isoladamente, de originar esferas.

Para a realização deste ensaio, as células ECC-1, as células G1 e as células G2 foram distribuídas numa concentração de  $8 \times 10^4$  células por mL em placas de baixa aderência, com o meio de cultura descrito para o protocolo de formação de esferas. Após 5 dias foi estimado, com recurso ao hemocítmetro, o número de esferas por poço, nomeadamente, as ES1, as ES2 e as ES3. Foram consideradas esferas todos os grupos de células compactadas, esféricas, densas, em suspensão e com mais de 40  $\mu$ m de diâmetro (Smart *et al*, 2013), semelhantes à representada na Figura 8.

Após a contagem do número total de células calculou-se a capacidade de formação de esferas através da Equação 1.

$$\text{Capacidade de esferas (\%)} = \frac{N^{\circ} \text{ esferas formadas}}{N^{\circ} \text{ células aderentes distribuídas}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

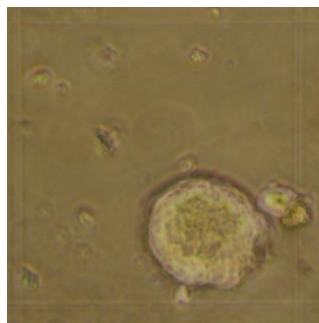


Figura 8: Imagem representativa de uma esfera no hemocitómetro. A imagem foi obtida com uma ampliação de 100x.

### Capacidade de autorrenovação

O ensaio de autorrenovação de esferas permitiu avaliar a capacidade das células com origem nas esferas originarem novas colónias de células esféricas em suspensão, semelhantes àquelas em que estas células tiveram a sua origem (Smart *et al*, 2013).

Para a realização deste ensaio foram obtidas as populações de esferas ES1, ES2 e ES3, que foram submetidas à ação da tripsina de modo a obter suspensões celulares. As suspensões celulares obtidas foram distribuídas numa concentração de  $8 \times 10^4$  células por mL numa placa de baixa aderência e com o meio de cultura usado no protocolo de formação de esferas. No final de 8 dias o número de esferas obtido foi determinado com recurso ao hemocitómetro. Foram considerados todos os grupos de células compactadas, esféricas, densas, em suspensão e com mais de  $40 \mu\text{m}$  de diâmetro, semelhantes à representada na Figura 8. Após a contagem do número total de células calculou-se a autorrenovação através da Equação 2.

$$\text{Capacidade auto-renovação (\%)} = \frac{N^{\circ} \text{ esferas}}{N^{\circ} \text{ células de esferas distribuídas}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

### Área de projeção ocupada pelas esferas

Para avaliar a área de projeção ocupada pelas esferas procedeu-se à quantificação da área média por poço em pixels. Para este ensaio prepararam-se suspensões celulares de  $1,6 \times 10^5$  células por mL de ECC-1, de G1 e de G2 que foram distribuídas por placas de 6 poços de baixa aderência. Submeteram-se essas células ao protocolo de formação de esferas, descrito anteriormente, originando as esferas ES1, ES2 e ES3. No quinto dia do protocolo as culturas celulares foram fotografadas com uma ampliação de 400x, considerando 10 campos aleatórios por poço. Utilizou-se o microscópio Motic AE31 com câmara Moticam 5000 Cooled e o registo fotográfico foi realizado em computador dedicado com *software Motic Images Advanced 3.2*. As

imagens foram posteriormente analisadas recorrendo ao *software ImageJ*, através do desenho de áreas de interesse correspondentes às esferas, obtendo-se assim uma área total em pixels por poço.

## Tempo de duplicação

O tempo de duplicação é uma característica intrínseca da linha celular e tem particular interesse no estudo de células tumorais pela elevada velocidade de replicação que apresentam. Através do tempo de duplicação (do inglês *doubling time*) foi possível comparar a proliferação das diferentes linhas aderentes, a original ECC-I e as derivadas G1, G2 e G3. Para a determinação do tempo de duplicação celular prepararam-se suspensões com  $5 \times 10^5$  células por mL e distribuíram-se em frascos de 25 cm<sup>2</sup>. Após 48 horas procedeu-se à contagem do número total de células por frasco e calculou-se o tempo de duplicação em horas através da Equação 3.

$$\text{Tempo de duplicação} = \text{Tempo de incubação} \times \left[ \frac{\ln 2}{\ln \frac{N^{\circ} \text{ de células final}}{N^{\circ} \text{ de células inicial}}} \right] \quad \text{Equação 3}$$

## Ensaio clonogénico

A eficiência clonogénica é avaliada através da capacidade de formação de colónias com 50 ou mais células em condições que permitem o seu crescimento (Franken *et al*, 2006). Para avaliar a eficiência clonogénica das populações deste trabalho experimental, a ECC-I, a ES1, a ES2, a ES3, a G1, a G2 e a G3 foram distribuídas em placas de 6 poços em condições aderentes e após 12 dias foram contabilizados o número de colónias observado em cada população. A eficiência clonogénica foi calculada segundo a Equação 4.

$$\text{Eficiência clonogénica (\%)} = \frac{N^{\circ} \text{ de colónias contadas}}{N^{\circ} \text{ de células distribuídas por poço}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

## Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada para avaliar a expressão dos marcadores CD24, CD44 e CD133, que têm sido associados a CSC. A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e caracterizar células ou outras partículas biológicas microscópicas suspensas em meio líquido. Esta técnica

permite analisar simultaneamente e num curto período, características físicas e químicas de células em suspensão. O aparelho, de base ótico-eletrónica, possui vários feixes de luz com diferentes comprimentos de onda direcionados para a câmara de fluxo de forma a incidirem nas células que se encontram em suspensão e que chegam alinhadas uma a uma. Os citómetros de fluxo têm detetores de dispersão de luz, um na linha do feixe de luz (FSC, do inglês *forward scatter*) que é proporcional ao tamanho da célula e outro perpendicular a este (SSC, do inglês *side scatter*), que é proporcional à forma do núcleo, à quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e à rugosidade da membrana, e vários detetores de fluorescência. As partículas suspensas dispersam a luz de uma forma específica e os corantes fluorescentes a elas ligados são excitados, emitindo luz de menor frequência (ou maior comprimento de onda) em relação à fonte de luz.

Trabalhos anteriores mostraram que a expressão reduzida de CD24, CD24<sup>low</sup> e aumentada de CD44, CD44<sup>high</sup>, estava associada com células tumorais estaminais mamárias e a população CD24<sup>low</sup> e CD44<sup>high</sup> tinha a capacidade de formar mamosferas *in vitro* (Dey *et al*, 2009). O CD133 já foi descrito como marcador de CSC do endométrio, assim como de noutros tumores sólidos. Estes três marcadores (CD24, CD44 e CD133) foram avaliados tanto na linha celular ECC-1 como nas populações de esferas em suspensão, ES1, ES2 e ES3 e nas populações derivadas aderentes, G1, G2 e G3. Para avaliar a existência destes marcadores foram utilizadas suspensões celulares com 10<sup>6</sup> células, para cada tipo de população celular estudada. As células foram lavadas com PBS, centrifugadas a 300 G durante 5 minutos e suspensas em 100 µL do mesmo tampão. Os anticorpos foram adicionados de acordo com as recomendações do fabricante, isto é, 2,5 µL de anti-CD24 marcado com ficoeritrina-cianino 5.1 (PC5; Beckman Coulter PNIM2645), 1 µL de anti-CD44 marcado com pacific blue (PB; Biolegend, 103020) e 10 µL de CD133 marcado com alofocianina (APC; Miteny Biotec 293C3-APC) e incubou-se durante 10 minutos no escuro. Posteriormente, foi efectuada a análise no citómetro FACS-Canto II (BD, San José, C.A.A.) com o *software* FACSDiva (BD, San José, C.A.). Os resultados foram analisados com o *software* FACSDiva (BD, San José, C.A.) e sob a forma de média de intensidade de fluorescência expressos em unidades arbitrárias de fluorescência e representados por histogramas para cada marcador.

## Western blot

O western blot é um método de deteção de proteínas específicas que pode analisar um homogeneizado de tecido ou um extrato celular (Mahmood & Yang, 2012). Numa primeira etapa, as proteínas de uma amostra são separadas por eletroforese em gel, separação feita com base no seu ponto isoelétrico, peso molecular, carga elétrica ou uma combinação destas características. O tipo mais frequente de eletroforese recorre à separação das proteínas com base no tamanho do polipeptídeo quando desnaturado. Neste

processo são utilizados géis de poliacrilamida e soluções desnaturantes com dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*). Esta substância é um detergente capaz de conferir carga negativa às proteínas, o que permite a sua separação mediante o seu peso molecular através do elétrodo positivo do gel de poliacrilamida. Quando se aplica uma diferença de potencial no gel, as proteínas migram com diferentes velocidades. As proteínas de menor peso molecular migram rapidamente através do gel e ficam localizadas no fundo do gel, enquanto as proteínas de maior peso molecular migram lentamente e por isso localizam-se no topo do gel. Após a migração das proteínas, faz-se a sua transferência para uma membrana de nitrocelulose ou difluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês, *polyvinylidene difluoride*), onde, através do recurso a anticorpos específicos, são analisadas e detetadas as proteínas alvo. Durante esta etapa, é introduzido na amostra um anticorpo primário, com o objetivo de marcar as proteínas com antigénios. Com a marcação das proteínas, estas podem ser facilmente identificadas com recurso a um anticorpo secundário, que se vai ligar especificamente ao anticorpo primário. Esta técnica foi utilizada para determinar a alteração da expressão das proteínas ALDH,  $\beta$ -catenina, HER2, recetor de estrogénios  $\alpha$ , recetor de estrogénios  $\beta$ , recetor de progesterona, e P53. Nesta fase do estudo de caracterização da célula tumoral, a análise destas proteínas foi realizada em extratos da linha celular ECC-1, das esferas ES1, ES2 e ES3 e das derivadas aderentes G1, G2 e G3.

Para a preparação dos extratos de proteína total das culturas aderentes (ECC1, G1, G2 e G3) foi descartado o meio de cultura e foram feitas 3 lavagens sequenciais com PBS. Para as populações em suspensão (ES1, ES2 e ES3), foi feita uma centrifugação inicial a 112 G durante 5 minutos, repetindo-se o processo três vezes com lavagem com PBS. Em seguida, adicionou-se uma solução de RIPA (tampão de radioimunoprecipitação) suplementada com um cocktail de inibidores de proteases (cOmplete Mini, Roche) e 1 mM de DTT (do inglês, *dithiothreitol*). No caso das culturas aderentes, com a ajuda de um raspador soltaram-se as células da superfície do frasco e colocou-se o conteúdo num *ependorf*. O *pellet* das populações em suspensão foi suspenso na mesma solução. Após agitação no vórtex, as amostras foram submetidas a sonicação com uma amplitude de 30% (Sonicador VibraCell VC50, Sonic and Materials inc. USA). As amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 14000 G e os sobrenadantes foram transferidos para novos *ependorfs*, devidamente identificados, que foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para a determinação da quantidade da proteína usou-se o método de BCA (*Bicinchononic acid, BCA<sup>TM</sup> protein assay kit*, Pierce). Posteriormente as amostras foram desnaturadas a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos, após solubilização em solução desnaturante constituída por Tris na concentração de 100 mM, glicina na concentração de 100 mM, SDS na concentração de 4%, ureia na concentração de 8 mM e azul de bromofenol na concentração de 0,01%.

Para a realização da eletroforese polimerizaram-se géis de acrilamida na concentração de 10% para

separação das proteínas com vista à deteção da ALDH, da  $\beta$ -catenina, do recetor de estrogénios  $\alpha$ , do recetor de estrogénios  $\beta$  e da P53 a 7% para a separação das proteínas com vista à deteção do HER2 e do recetor de progesterona. Os géis de acrilamida foram colocados na tina de eletroforese com tampão apropriado composto por Tris na concentração de 25 mM, glicina na concentração de 192 mM e SDS na concentração de 0,1%, com ajuste do pH a 8,3 (Bio-Rad 161-0772) e as amostras foram dispostas assim como o padrão de pesos moleculares (Precision PlusStandards, Dual Color, Bio-Rad ou NZYColour Protein Marker II, Nzytech, MB09002). A eletroforese foi constituída por uma primeira etapa de 10 minutos com uma diferença de potencial constante de 100 V e de uma segunda etapa com uma diferença de potencial constante de 150 V.

Para a realização da eletrotransferência os géis foram colocados em contato direto com membranas de PVDF (membrana de fluoreto de polivinilideno, Millipore) previamente ativadas em metanol. O sistema de transferência foi preparado e a reação ocorreu a uma diferença de potencial de 100 V com duração variável de acordo com a proteína de interesse, em tampão CAPS (do inglês, *3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid*, Sigma, C2632,) na concentração de 100 mM, com pH de 11. Após a eletrotransferência, as membranas foram imediatamente bloqueadas com solução de albumina sérica bovina (BSA, do inglês, *bovine serum albumine*) na concentração de 5% preparada em TBST (do inglês, *Tris-Buffered Saline Tween-20*), à temperatura ambiente.

Após 1 hora incubaram-se as membranas com os anticorpos primários, durante a noite, a 4°C e sob agitação constante. Para a deteção das proteínas de interesse utilizaram-se os seguintes anticorpos: anti-ALDH 1/2 H-8 preparado em rato (SC-166362, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti- $\beta$ -catenina preparado em rato (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc7963), anti-P53 (D07) preparado em rato (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-47698), anti-recetor de estrogénios  $\alpha$  preparado em rato (Abcam, ab1104), anti-recetor de estrogénios  $\beta$  X-24 preparado em coelho (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-133554) e anti-recetores de progesterona SP2 preparado em coelho (Abcam, ab27161).

No dia seguinte foram efetuadas lavagens com TBS-T a 1%, e incubaram-se as membranas com o anticorpo secundário apropriado para cada anticorpo primário, nomeadamente anti-rato (GE Healthcare, RPN5781) e anti-coelho (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-2007), sob agitação constante e à temperatura ambiente durante cerca de 1 hora. As lavagens foram repetidas e as membranas foram depois incubadas com substrato enzimático (*ECF Western blotting Reagent Pack*, Amersham Biosciences, Reino Unido) durante aproximadamente 5 minutos e reveladas no leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000, Suécia).

As membranas foram posteriormente incubadas para a marcação da  $\beta$ -actina (anticorpo preparado em



ratinho, Sigma, A5316). A actina é uma proteína presente em todas as células e é comumente utilizada como controlo da quantidade de proteína avaliada em cada *lane*. Nos casos em que as condições da eletroforese não proporcionam a retenção desta proteína no gel as membranas foram previamente coradas com *ponceau S* (Sigma, P3504).

## Estudos de captação com $^{18}\text{F}$ -FDG

O análogo da glicose  $^{18}\text{F}$ -FDG é um radiofármaco usado em PET com capacidade de traduzir por imagiologia *in vivo* o processo glicolítico de tecidos normais e patológicos (Lai *et al*, 2014). A  $^{18}\text{F}$ -FDG entra nas células normais e malignas através dos transportadores de glicose e fica retido no interior da célula após ser fosforilado pela hexocinase, pelo que se acumula na célula sob a forma  $^{18}\text{F}$ -FDG-6-fosfato. O maior número de transportadores de glicose e a maior taxa de glicólise nas células tumorais aumenta a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG relativamente às células normais (Terauchi *et al*, 2008).

A captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG foi avaliada nas células ECC1, G1, G2, G3, ES1, ES2 e ES3. Para a realização deste estudo foram preparadas suspensões celulares com  $2 \times 10^6$  células. Estas suspensões foram deixadas a repousar em incubadora regulada para 95% de  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  durante 60 minutos em frascos de cultura de  $25\text{cm}^2$ . Posteriormente, foi adicionado o radiofármaco numa atividade igual a  $0,925\text{ MBq/mL}$ . Durante os primeiros 5 minutos após a adição do radiofármaco e ao longo de 120 minutos, foram retiradas alíquotas de  $200\ \mu\text{L}$  da suspensão celular para *ependorfs* que continham PBS gelado, de modo a suspender o metabolismo celular. De seguida, as amostras foram centrifugadas a  $5585\text{ G}$  durante 60 segundos (Costar Mini Centrifuge) para se poderem separar o *pellet* e o sobrenadante, tendo o último sido recolhido para um tubo de ensaio (Sarstedt, 86.1509). Seguiu-se uma lavagem do *pellet* com  $500\ \mu\text{L}$  de PBS gelado, repetindo-se o procedimento de separação do sobrenadante. Os sobrenadantes, resultantes das centrifugações, foram recolhidos para os tubos de ensaio e os *pellets* permaneceram nos respetivos *ependorfs*. Com este procedimento foi possível calcular a percentagem de captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG para cada tempo através da contagem das cintilações de ambas as frações (*pellets* e sobrenadantes) no poço do contador (Capintec Inc., Modelo CRC – 15W) em contagens por minuto (CPM). A percentagem de captação do radiofármaco foi calculada utilizando a Equação 5.

$$\text{Percentagem de captação} = \frac{\text{CPM}_{\text{pellet}}}{\text{CPM}_{\text{pellet}} + \text{CPM}_{\text{sobrenadante}}} \times 100$$

Equação 5

## Estudos de ressonância magnética nuclear

A espectroscopia por RMN, utilizada na caracterização do metabolismo *in vitro* e *in vivo*, tem assumido um papel de destaque, principalmente, devido ao seu carácter não destrutivo. A espectroscopia por RMN afirma-se com uma metodologia que fornece informação acerca de vias metabólicas específicas aquando da utilização de substratos enriquecidos com isótopos estáveis, como o carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ) e o deutério ( $^2\text{H}$ ) (Chance *et al*, 1983; Malloy *et al*, 1988; Jeffrey *et al*, 1991; Carvalho *et al*, 2004; Sherry *et al*, 2004).

A análise, por espectroscopia de RMN, dos metabolitos resultantes da transformação da glicose uniformemente marcada ([U- $^{13}\text{C}$ ]glicose) pelos diferentes tipos de linhas celulares permite obter informação acerca da atividade da via glicolítica e do ciclo de Krebs, assim como da interação entre estas duas vias metabólicas, como se esquematiza na Figura 9.

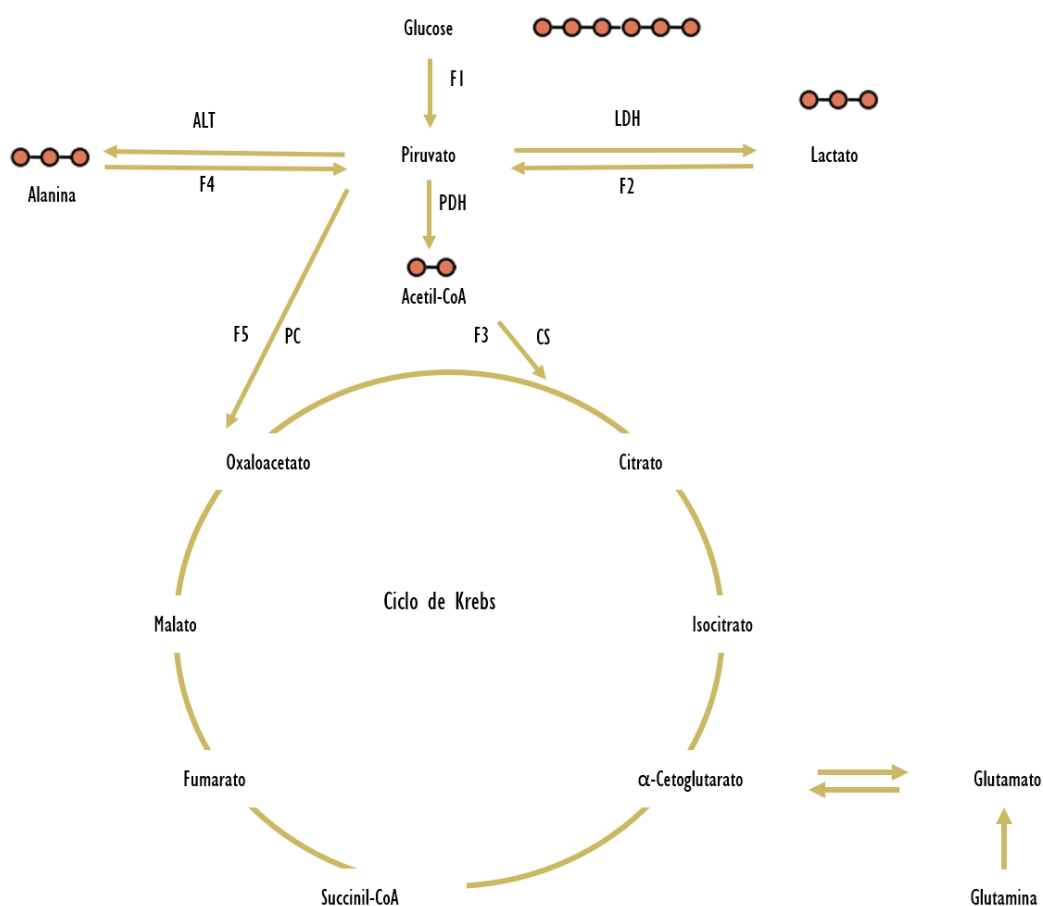


Figura 9: Esquema representativo das possíveis vias de utilização da [U- $^{13}\text{C}$ ]glicose. Os fluxos designados definem os possíveis destinos do esqueleto carbonado da glicose. F1: via glicolítica; F2: fermentação láctica; F3: oxidação no ciclo de Krebs; F4: transaminação; F5: carboxilação. ALT, alanina aminotransferase; LDH, lactato desidrogenase; PC, piruvato carboxilase; CS, citrato sintetase; PDH, piruvato desidrogenase.

Na realização de estudos metabólicos com recurso à espectroscopia por RMN, a glicose enriquecida em carbono-13 é o substrato mais frequentemente utilizado. Neste trabalho em particular usou-se glicose enriquecida com carbono-13 em todas as posições, ou seja  $[U-^{13}C]$ glicose.

De acordo com o esquema, cada molécula de glicose dá origem a duas moléculas de piruvato cujo perfil de enriquecimento ou marcação em carbono-13, vai refletir o da molécula precursora. Neste caso obtém-se o piruvato uniformemente marcado ( $[U-^{13}C]$ piruvato). Este metabolito pode ser subsequentemente metabolizado em distintas vias metabólicas. Um dos destinos possíveis é ser convertido em acetil-CoA na mitocôndria por ação da enzima piruvato desidrogenase (PDH, do inglês *pyruvate dehydrogenase*). A posterior oxidação no ciclo de Krebs resulta na produção de  $CO_2$  e de equivalentes redutores que alimentam a cadeia transportadora de eletrões. No entanto, o piruvato pode também ser convertido em lactato. Esta conversão é tanto mais intensa, quanto maiores os níveis de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*) citosólicos que levam a um aumento de atividade da lactato desidrogenase (LDH, do inglês *lactate dehydrogenase*). Para além disso, no caso dos níveis de NADH serem reduzidos, o piruvato pode ser convertido em alanina pela alanina aminotransferase ou pode ser convertido em oxaloacetato, um intermediário do ciclo de Krebs, pela enzima piruvato carboxilase. Tendo em conta a incorporação da marcação proveniente da glicose nos intermediários resultantes, a atividade das diferentes vias pode ser caracterizada, como a seguir se descreve.

Por ação da LDH o piruvato é convertido em lactato mantendo a marcação  $[U-^{13}C]$ lactato. Assim, através da quantificação deste metabolito é possível determinar o consumo de  $[U-^{13}C]$ glicose e caracterizar a intensidade da via da glicólise seguida de fermentação láctica nos diferentes tipos de células derivadas das células tumorais do endométrio (Pereira *et al.*, 2011). O lactato produzido é libertado para o meio de cultura e identificado no respetivo espectro de RMN de próton, como representado na Figura 10.

O lactato não enriquecido com carbono-13, proveniente de metabolitos não marcados, endógenos ou de constituintes do meio de cultura, é representado pelo duplete a 1,31 ppm. Em contrapartida, devido ao acoplamento heteronuclear  $^{13}C-^1H$ , o  $[U-^{13}C]$ lactato originado a partir de  $[U-^{13}C]$ glicose surge no espectro de  $^1H$ -RMN representado por dois satélites, em que cada um deles é um multiplete, neste um duplete de tripletos, fruto de três constantes de acoplamento ( $^3J_{HH}=7,0$  Hz;  $^2J_{HC}$  e  $^3J_{HC}$ , de magnitudes muito similares,  $\sim 4,2$  Hz) como é possível observar na Figura 10.

Para se determinar a concentração de lactato e de  $[U-^{13}C]$ lactato foi necessário recorrer a um aminoácido de concentração conhecida presente nos meios de cultura, a valina. Este aminoácido apresenta um pico no espectro  $^1H$ -RMN relativamente constante ao longo do tempo sugerindo que não está praticamente a ser consumido, podendo assim extrapolar-se a concentração dos outros compostos a partir da deste. Em suma, os picos quantificados nos espectros  $^1H$ -RMN das amostras de meio foram: lactato,  $[U-^{13}C]$ lactato e valina,

como representado na Figura 11.

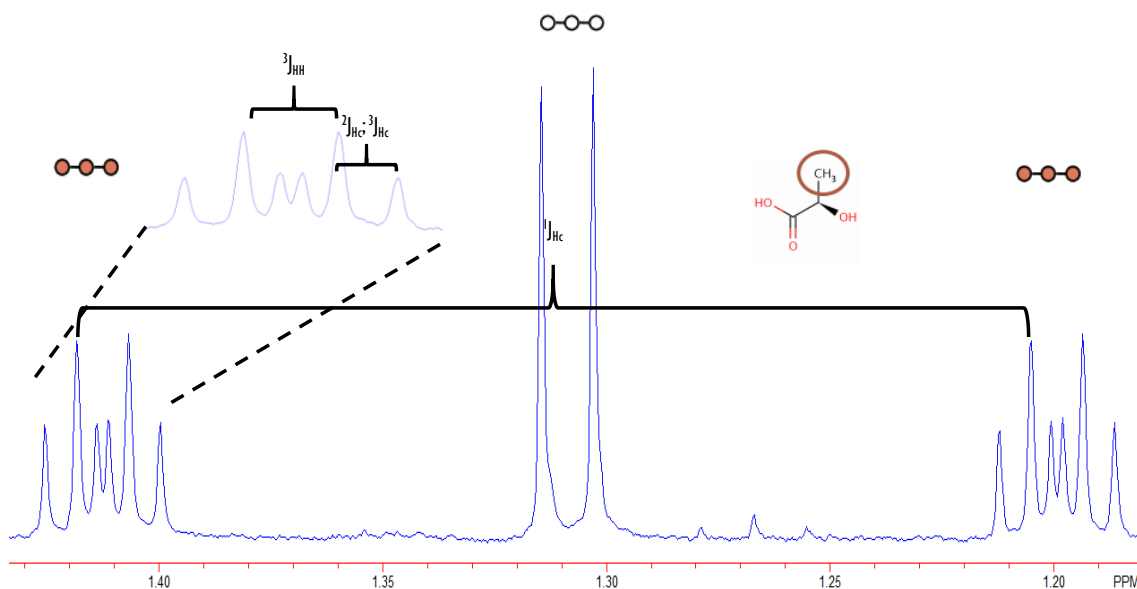


Figura 10: Expansão da região do espectro RMN relativa ao grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) do lactato. O duplete central é referente ao lactato não enriquecido presente no meio de cultura, enquanto os dois satélites, que surgem como dupletos de tripletos, são respeitantes ao lactato produzido por fermentação láctica da [U-<sup>13</sup>C]glicose. O espectro representa uma experiência da população ECC-1 às 8 horas.

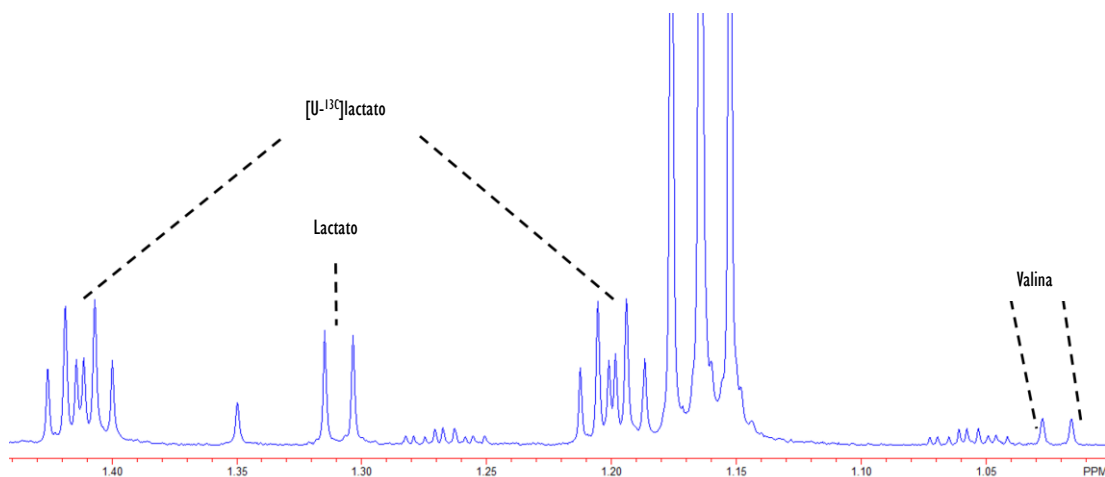


Figura 11: Expansão do espectro <sup>1</sup>H-RMN de uma amostra de meio da população ESI às 24 horas. Nesta expansão são visíveis as ressonâncias referentes ao lactato, à valina e ao [U-<sup>13</sup>C]lactato.

Para caracterizar a utilização do piruvato proveniente da glicólise no ciclo de Krebs, recorre-se à avaliação do perfil de enriquecimento em carbono-13 no glutamato, um dos aminoácidos mais abundantes no nosso organismo. Este aminoácido não faz parte do ciclo de Krebs, no entanto encontra-se em equilíbrio com o  $\alpha$ -cetogluturato, um intermediário deste ciclo, e existe em elevada concentração intracelular facilitando a quantificação por RMN.

Com a realização desta metodologia, e de acordo com a Figura 12, é possível observar que numa primeira volta do ciclo são originados intermediários duplamente marcados e, conseqüentemente com o aumento do número de voltas do ciclo mais elevada será a taxa de incorporação de carbono-13 nos intermediários e, por conseguinte do glutamato. Assim, a quantificação por RMN destes intermediários marcados possibilita a avaliação da velocidade do ciclo (Chance *et al*, 1983; Carvalho *et al*, 2001, 2004).

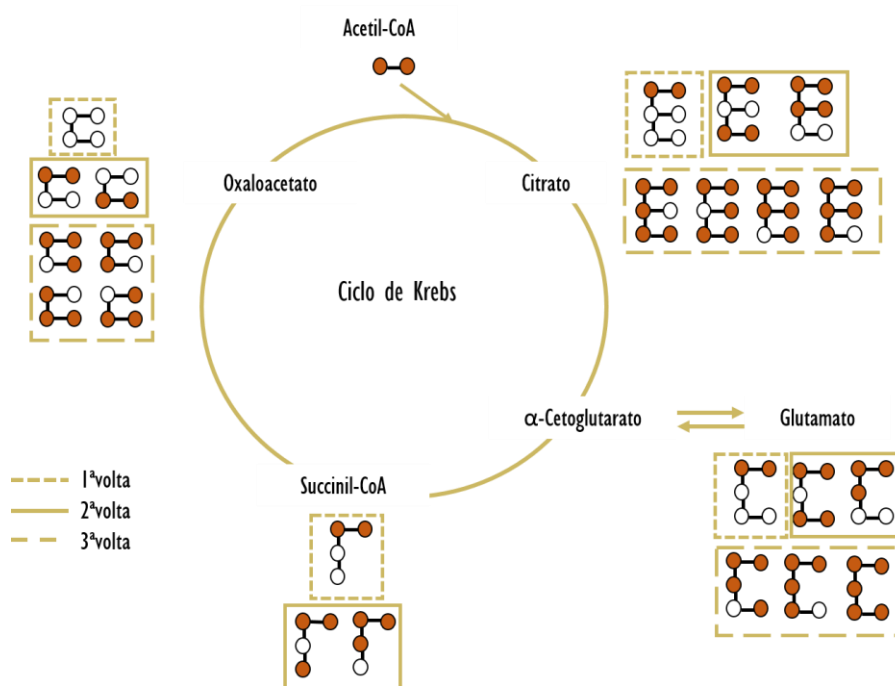


Figura 12: Esquema representativo das possíveis marcações com carbono-13 dos intermediários do ciclo de Krebs e do glutamato em função do número de voltas do ciclo de Krebs.

A taxa de incorporação de carbono-13 nos diferentes intermediários do ciclo será tanto maior quanto mais rápida for a utilização do piruvato, produto da glicólise, no ciclo de Krebs. A determinação da taxa de incorporação do glutamato permite inferir acerca da velocidade do ciclo, uma vez que numa primeira volta do ciclo de Krebs ocorre incorporação de <sup>13</sup>C nas posições 4 e 5 do  $\alpha$ -cetogluturato e, conseqüentemente,

do glutamato, pois a acetil-CoA encontra-se duplamente enriquecida. A continuação no ciclo com este padrão de marcação e a subsequente condensação das moléculas de oxaloacetato originadas com uma nova unidade de acetil-CoA enriquecida nos carbonos-1 e -2 do acetil condiciona o aparecimento de intermediários mais enriquecidos que os anteriores, nomeadamente o  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ - e o  $[1,2,4,5-^{13}\text{C}_4]$ glutamato como representado na Figura 12

A ressonância do C4-Glu, possui um duplete (D45), que reflete a marcação nos carbonos-4 e -5, e para além disso um quarteto/pseudoquarteto, designado Q, devido à marcação das moléculas de glutamato nos carbonos-3, -4 e -5 simultaneamente. Desta forma, o aparecimento deste último multipletto demonstra a ocorrência de, pelo menos, duas voltas no ciclo de Krebs e denuncia a atividade do mesmo ciclo. Assim, quanto maior a razão entre os multipletos Q/D45 maior o recurso ao ciclo de Krebs pelas diferentes populações de células estudadas. Para além disso, através das marcações no glutamato é possível determinar a maior ou menor envolvimento de fluxos biossintéticos nas células, ou seja o maior ou menor recurso à anaplerose. No caso do piruvato, a sua transformação em oxaloacetato resulta em marcação do glutamato que será mais intensa nos carbonos-2 e -3 por ação do *turnover* único do ciclo de Krebs. Assim, o aumento da razão C3-Glu/C4-Glu indica o aumento deste fluxo anaplerótico e por conseguinte uma contribuição mais marcada para processos biossintéticos.

Nos estudos metabólicos descritos neste trabalho avaliou-se também importância do metabolismo oxidativo relativamente ao glicolítico, através da caracterização do grau de acoplamento entre a glicólise e o ciclo de Krebs. Para esse efeito, recorreu-se aos espetros de  $^{13}\text{C}$ -RMN dos extratos obtidos em metanol das células e determinou-se a razão entre as marcações do carbono-3 do lactato e a do carbono-4 do glutamato. Esta razão é tanto menor quanto maior for o acoplamento entre as vias e permite inferir se as células se encontram mais ou menos dependentes do processo glicolítico para a obtenção de energia. Outra razão avaliada foi a da marcação do carbono-3 do lactato relativamente à do carbono-3 da alanina. Esta razão permite inferir acerca do estado mais ou menos oxidado do citosol pois constituiu uma medida indireta da razão NADH/NAD<sup>+</sup>. A conversão de piruvato, resultante do processo glicolítico, em lactato é tanto mais extensa quanto maior for a quantidade de NADH citosólico, resultante do processo glicolítico. Numa situação de redução dos níveis de NADH, o piruvato pode sofrer outro tipo de ação enzimática, nomeadamente pela alanina aminotransferase (ALT, do inglês *alanine aminotransferase*), com consequente aumento dos níveis de alanina (Klatte & Wendisch, 2015).

Em suma, os picos quantificados nos espetros  $^{13}\text{C}$ -RMN referentes aos extratos de metanol foram o carbono-3 da alanina, C3-glutamato, C4-glutamato e o C3-lactato, como exemplificado na Figura 13.

No que diz respeito à utilização desta metodologia neste trabalho, foram analisadas a linha celular ECC1, a primeira geração de esferas ESI e a primeira geração de células derivadas aderente (G1). Para as

diferentes linhas celulares foram preparados os meios correspondentes já descritos anteriormente diferindo a formulação apenas no tipo de meio de cultura: para as células da linha ECC1 e para as derivadas aderentes G1, RPMI-1640 (R1318, Sigma) e para as esferas ESI, meio do protocolo de formação de esferas. A estes meios foi ainda adicionada glicose uniformemente marcada com carbono-13 ([U- $^{13}\text{C}$ ]glicose) (389374, Sigma) na concentração de 25 mM. Para a realização do estudo, prepararam-se frascos das três linhas celulares com 80% de confluência. Antes da adição de 14 mL do meio com [U- $^{13}\text{C}$ ]glicose, as células foram lavadas três vezes com 5 mL de PBS para garantir que não restassem vestígios do meio antigo com outro tipo de glicose que poderia interferir com o estudo.

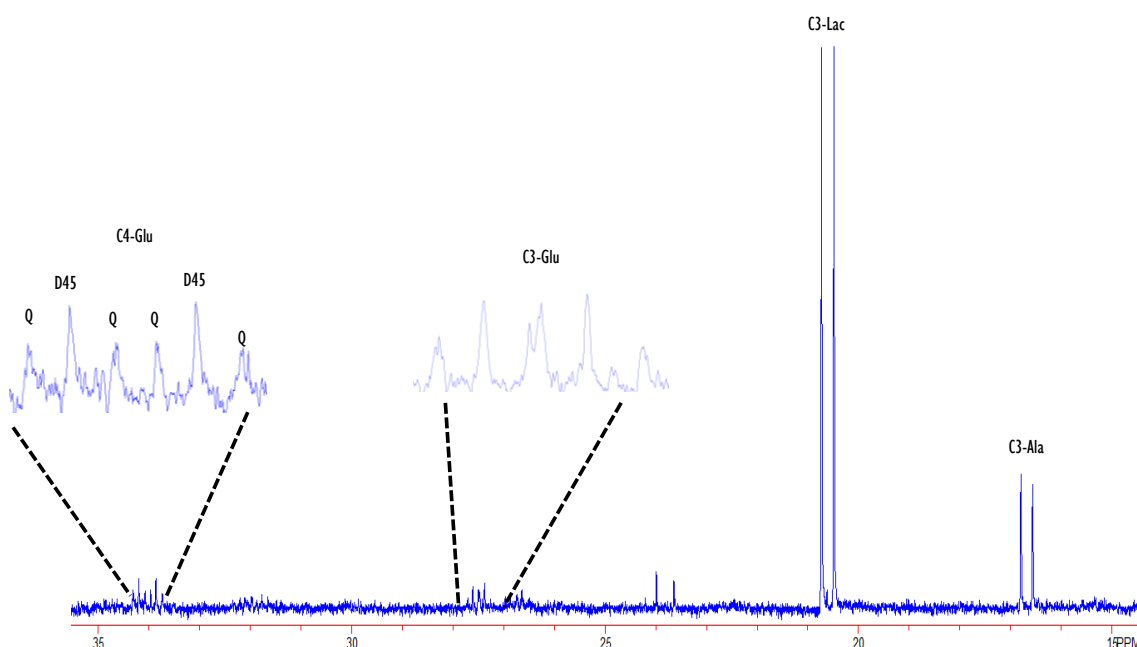


Figura 13: Expansão do espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN do extrato de metanol de células ESI. Como ressonâncias destacadas apresentam-se as respeitantes ao carbono-3 do lactato (C3-Lac), ao carbono-3 da alanina (C3-Ala) e aos carbonos-3 e -4 do glutamato (C3-Glu e C4-Glu respetivamente). Nas expansões estão representados os multipletos referentes ao C4-Glu, com a designação dos respetivos multipletos (Q – quarteto; D45 – duplete) e ao C3-Glu.

Seguidamente, após 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas da adição de [U- $^{13}\text{C}$ ]glicose, foram recolhidas amostras de 200  $\mu\text{L}$  de meio para *eppendorfs* devidamente identificados. As amostras de meio de cultura das três linhas celulares foram conservadas a  $-80^\circ\text{C}$ . Após as 24 horas procedeu-se à extração celular. No caso das amostras referentes à linha ESI, uma vez que se tratam de células em suspensão, foi necessário centrifugar os *eppendorfs* com os respetivos conteúdos para separar as células do meio de cultura. As diferentes culturas foram lavadas com PBS e em seguida, adicionaram-se 750  $\mu\text{L}$  de MeOH/H $_2$ O 80% (v/v) frio tendo sido

necessário raspar gentilmente as células cultivadas de forma aderente, as ECC-I e as GI. Seguidamente, as amostras foram centrifugadas a 4°C durante 5 minutos a 5725 G com o objetivo de permitir a separação da fase aquosa, na qual se encontram os metabolitos solúveis de interesse para a análise, do *pellet*. Estas amostras foram também conservadas a -80°C. Por fim, com recurso a uma estufa de secagem procedeu-se à evaporação das frações aquosas.

As amostras de meio de cultura recolhidas ao longo de vários tempos foram analisadas por <sup>1</sup>H-RMN recorrendo a um espectrómetro Yarian 600 MHz equipado com uma sonda de banda larga de 3 mm. Para a análise das amostras, preparou-se uma mistura contendo 160 µL das amostras de meio e 40 µL de uma solução de fumarato de sódio na concentração de 10 mM em água deuterada (99,9%). A solução de fumarato de sódio foi utilizada como padrão interno para o processo de quantificação.

Os espetros de <sup>1</sup>H-RMN consistiram em 64 k pontos a definir uma largura espectral de 7200 Hz. Para a obtenção de uma razão sinal/ruído adequada, com o posterior objetivo de uma análise quantitativa, foram adquiridos um total de 16 transientes (*scans*), utilizando um pulso de radiofrequência equivalente a 45° e um tempo total de repetição interpulsos de 10 segundos. A fração com os metabolitos resultantes da extração celular foi dissolvida em água deuterada (99,9%) para análise por <sup>1</sup>H- e <sup>13</sup>C-RMN. Os espetros de <sup>1</sup>H-RMN foram obtidos no mesmo espectrómetro e sonda acima referidos e utilizando parâmetros de aquisição idênticos aos descritos para os espetros do meio de cultura, mas recorrendo a um maior número transientes (nt=128) para atingir razões sinal/ruído adequadas à deteção de metabolitos menos abundantes. Os espetros de <sup>13</sup>C-RMN foram adquiridos utilizando uma sonda de 3 mm e desacoplamento de banda larga de prótão. Foram adquiridos um total de 128 k pontos definindo uma região espectral de 35 kHz. Para a obtenção de uma razão sinal/ruído compatível com a análise metabólica foram adquiridos entre 15000 e 20000 transientes, utilizando um pulso de radiofrequências de 45° e um tempo de repetição interpulsos de 3 segundos. A utilização deste período foi suficiente para permitir a relaxação total dos carbonos alifáticos, essenciais para o estudo realizado. A análise dos espetros obtidos realizou-se recorrendo ao *software* NUTSpro™ (Acorn NMR Inc., Livermore, CA).

### Eletroforese bidimensional

As técnicas de proteómica são utilizadas para avaliar a expressão de proteínas separadas através da eletroforese bidimensional (2D). A eletroforese bidimensional pode ser usada para separar proteínas obtidas de extratos celulares e de organelos assim como de fluidos biológicos (Carrette *et al*, 2006). Esta técnica tem uma elevada resolução e permite a disposição de inúmeras proteínas num só gel, em simultâneo. Assim, cada gel pode revelar vários *spots* de diversas formas, tamanhos e intensidades, representando cada um,



uma proteína ou um conjunto de proteínas específico (Carrette *et al*, 2006). Na primeira dimensão, as proteínas são separadas no gel por focagem isoeétrica, de acordo com os seus pontos isoeletricos. A segunda dimensão permite uma separação pela massa molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE, do inglês *sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*), permitindo a separação de proteínas com modificações tradicionais ou isoformas específicas (Carrette *et al*, 2006).

Para permitir a visualização das proteínas nos géis, podem ser utilizados diversos corantes (Carrette *et al*, 2006; Butt & Coorssen, 2013), como o azul de *Coomassie*, o *sypro ruby* e o nitrato de prata (Butt & Coorssen, 2013). A coloração com prata baseia-se na preferência deste ião por aminoácidos básicos de proteínas da superfície da matriz. Com esta coloração as proteínas tornam-se visíveis quando os iões  $\text{Ag}^+$  são reduzidos a prata elementar e as proteínas adquirem a coloração típica que vai do castanho ao preto (Winkler *et al*, 2007). Os pontos de interesse dos géis podem posteriormente ser analisados com vista à identificação de proteínas, normalmente por processamento com espetrometria de massa (Scherl, 2015).

A eletroforese 2D foi realizada com extratos de proteína de células ECC1, ESI e G1. O primeiro passo da metodologia consistiu na obtenção dos extratos proteicos, procedimento realizado sobre gelo e com todas as soluções a 4°C. As culturas celulares foram lavadas 3 vezes com solução tampão composta de Tris na concentração de 10 mM e de sacarose na concentração de 250mM, com pH ajustado para 7,0. No caso das células ESI as lavagens foram realizadas com recurso a centrifugação a 500 G. De seguida adicionou-se a solução ReadyPrep™ 2-D Starter Kit (163-2108, BIO-RAD) e homogeneizou-se com recurso a um raspador, para as culturas aderentes, e a uma pipeta, para as culturas em suspensão. Procedeu-se de seguida à sonicação com uma amplitude de 30% em dez pulsos de 1 segundo, com o objetivo de permitir a lise das membranas citoplasmáticas e para prevenir o aquecimento das amostras. As amostras foram depois sujeitas a uma centrifugação de 14000 G, durante 15 minutos, após o que o sobrenadante foi reservado com auxílio de uma micropipeta e armazenado a -80°C até posterior utilização.

O passo seguinte consistiu na quantificação das proteínas de cada amostra, procedimento realizado através do Kit 2D Quant (80-6483-56, GE Healthcare). Para este processo foi calculada uma curva padrão com base numa solução de BSA a 2 mg/mL, fornecida com o *kit*. Foram utilizados 6 *ependorfs* com os volumes de 0, de 5, de 10, de 15, de 20 e de 25  $\mu\text{L}$  de solução de BSA, correspondendo a 0, a 10, a 20, a 30, a 40 e a 50  $\mu\text{g}$  de proteína, respetivamente. As amostras a quantificar foram colocadas também em *ependorfs*, num volume de 3  $\mu\text{L}$ . A cada *ependorf* adicionaram-se 500  $\mu\text{L}$  de solução precipitante, homogeneizou-se com vórtex e incubaram-se durante 2 a 3 minutos à temperatura ambiente. De seguida, adicionaram-se 500  $\mu\text{L}$  de co-precipitante e homogeneizou-se no vórtex. Os *ependorfs* foram centrifugados a 15000 G durante 5 minutos e depois de se verificar a presença de sedimento proteico, foi de seguida removido o

sobrenadante. Aos sedimentos proteicos de cada *ependorf* adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de solução de cobre e 400  $\mu\text{L}$  de água ultrapura a cada *ependorf*, homogeneizou-se e adicionou-se 1 mL da solução corante, composta por uma mistura de dois reagentes do *kit*, o reagente A e o reagente B, numa proporção de 100:1. Os *ependorfs* com respetivos conteúdos foram incubados à temperatura ambiente durante 15 a 20 minutos. A última etapa consistiu na coleta de 200  $\mu\text{L}$  de cada *ependorf* e transferência para placa de 96 poços, para avaliação da absorvância a 480 nm. Após a leitura, estabeleceu-se a equação do ajuste linear à curva padrão e extrapolou-se, através da absorvância, a quantidade de proteína.

A etapa da reidratação das *strips* (163-2000, *ReadyStrip™ IPG strips*, BIORAD) foi realizada no equipamento *PROTEAN® i12™ IEF cell* (BIORAD) com aplicação prévia das amostras de proteína. As amostras foram descongeladas e centrifugadas a 14000 G durante 15 minutos, misturou-se um volume correspondente a 20  $\mu\text{g}$  de proteína com a solução tampão *ReadyPrep™* previamente preparada até obter um volume de 125  $\mu\text{L}$ . As amostras foram sujeita a agitação durante 30 minutos e de seguida colocadas nos corredores individualizados do tabuleiro de focagem. As *strips* foram colocadas em cada corredor, por cima de cada amostra, com o gel em contacto com a amostra. Os eléctrodos foram montados no tabuleiro que foi colocado no equipamento e adicionaram-se 4 mL de óleo mineral (163-2129, BIORAD) às *strips*, para evitar desidratação durante o processo. O equipamento foi programado para reidratação, por um período de 12 a 16 horas, com uma diferença de potencial de 50 V e a uma temperatura de 20°C.

A focagem isoeétrica foi o processo que se seguiu à reidratação. O suporte das *strips* foi desmontado e cada *strip* foi invertida de modo a que o gel ficasse voltado para cima. De seguida humedeceram-se os *electrode wicks* (1646030, *PROTEAN®i12™ IEF Cell Gel-Side Up Electrode Wicks*) com água ultrapura, que foram colocados nas extremidades das *strips* e recobertas com óleo mineral. Finalmente o equipamento foi programado para a focagem isoeétrica, para a qual na primeira etapa se utilizou uma diferença de potencial de 250 V, com gradiente rápido, intensidade de corrente de 50  $\mu\text{A}$  e duração de 20 minutos. Na segunda etapa, que durou uma hora, utilizou-se uma diferença de potencial de 4000 V, com gradiente gradual, intensidade de corrente de 50  $\mu\text{A}$ . Na terceira etapa utilizou-se uma diferença de potencial de 4000 V, com gradiente rápido, intensidade de corrente 50  $\mu\text{A}$  até atingir 15000 V/hora. Na quarta e última etapa, a diferença de potencial foi de 500 V, com uma intensidade de corrente de 50  $\mu\text{A}$ .

Depois da focagem isoeétrica efetuou-se o equilíbrio SDS. As *strips* foram removidas do tabuleiro de focagem e colocadas num tabuleiro de equilíbrio, com o gel virado para cima. De seguida, cada *strip* foi incubada numa solução de iodoacetamida (8.04744.0100, Merck), na concentração de 0,21 mM, em solução tampão de equilíbrio (163-2108, *ReadyPrep™ 2-D Starter Kit, Equilibration Buffer II*, BIORAD), durante 15 minutos com agitação ligeira. A solução anterior foi substituída por uma solução de DL-Dithiothreitol (DTT, 43815, Sigma-Aldrich), na concentração de 64,8 mM, em solução tampão de equilíbrio, e procedeu-se

a nova incubação durante 15 minutos com agitação. As *strips* foram depois submersas em solução tampão de eletroforese.

Para a realização da segunda dimensão, SDS-PAGE, utilizaram-se géis de acrilamida na concentração de 10% e preparou-se uma solução de agarose na concentração de 0,5% em tampão de eletroforese. As *strips* foram dispostas no topo do gel de acrilamida e, na extremidade ácida, virada para o lado esquerdo do gel, colocou-se uma amostra de solução padrão de bandas. As *strips* foram cobertas com a solução de agarose e deixou-se polimerizar durante cerca de 30 minutos. A eletroforese foi realizada em dois passos, o primeiro de 10 minutos com uma diferença de potencial de 100 V e o segundo de 75 minutos com uma diferença de potencial de 150 V.

A coloração dos géis foi realizada com nitrato de prata. O procedimento consistiu em submergir os géis numa solução de fixação constituída por metanol na concentração de 25% e por ácido acético (33209, Sigma) na concentração de 5% durante 30 minutos à temperatura ambiente, sob agitação leve. A solução de fixação foi substituída por uma solução de etanol (3000, REDUR) a 50% durante 10 minutos, seguida de uma solução de etanol na concentração de 30% durante o mesmo tempo. Seguidamente os géis foram sensibilizados com solução de tiosulfato de sódio (217263, Sigma) na concentração de 0,2 g/L durante 1 minuto e posteriormente realizaram-se três lavagens de 5 minutos cada com água ultrapura. Na etapa da coloração, os géis foram colocados numa solução de nitrato de prata (3013308, Merck) na concentração de 2,0 g/L durante 20 minutos, em agitação constante. Posteriormente removeu-se esta solução e adicionou-se uma solução de revelação constituída por carbonato de sódio anidro (451614, Sigma) na concentração de 30 g/L, por tiosulfato de sódio na concentração de 10 mg/L e por formaldeído na concentração de 26% (90240.9025, VWRProlabo). Os géis permaneceram nesta solução até ao aparecimento de *spots* nos géis que identificam as proteínas. Este processo foi interrompido com a substituição por uma solução de trizma base na concentração de 50 g/L em ácido acético na concentração de 2,5% durante 1 minuto. Finalmente os géis foram guardados em água ultrapura. A imagem de cada gel foi adquirida num digitalizador Epson GT2500, no qual foram adquiridas imagens em tons de cinzento a 16 bits, que foram analisados pelo *software Samespots*. A comparação do perfil de expressão consistiu em 2 géis de ECC-I, em 3 géis de ES1 e em 3 géis de GI. Foram somente considerados os *spots* com mais de 600 pixels de modo a comparar os *spots* de maior expressão e eliminar os artefactos de coloração.

## Modelo heterotópico

Os estudos *in vivo* deste trabalho experimental foram realizados de acordo com todas as disposições legais em vigor no que se refere à experimentação animal. O protocolo experimental foi aprovado pela

Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra em 1 de Julho de 2009 (Ref: Of. IBB/48/09) conforme apresentado no anexo II.

No contexto da avaliação das propriedades de CSC, tornou-se imperativo caracterizar a tumorigenicidade *in vivo* das células da linha celular ECC-I em comparação com as células das esferas ES1, ES2 e ES3 e com as células derivadas aderentes G1, G2 e G3. O modelo de xenotransplante heterotópico pretende comprovar a tumorigénese e comparar o crescimento tumoral das populações inoculadas. Neste modelo, foram utilizados ratinhos fêmea *Balb/c nu/nu*, uma estirpe que permite o desenvolvimento de xenotransplantes, uma vez que se tratam de animais atímicos com deficiência em células T, o que lhes permite aceitar células de outra espécie.

Os ratinhos *Balb/c nu/nu* foram adquiridos aos Laboratórios Internacionais Charles River, Inc (Espanha) com 6 semanas de idade. Estes animais foram mantidos em sala climatizada própria, sujeitos a ciclos de 12 horas de luz diárias, acesso livre a ração padrão de laboratório para murinos *nude* e água filtrada. O bem-estar dos animais foi verificado diariamente no decorrer do estudo.

Os animais foram inoculados com  $2 \times 10^6$  células através de injeção subcutânea na região dorsal, uma vez que se trata de uma localização que permite avaliar e monitorizar o crescimento do xenotransplante de forma rápida, simples e acessível e que apresenta condições de vascularização adequadas. Os animais foram inoculados com células da linha celular ECC-I, e com células das esferas ES1, ES2 e ES3, e das derivadas aderentes G1, G2 e G3 e o crescimento foi monitorizado semanalmente. Quando os xenotransplantes atingiram um volume tumoral de  $100 \text{ mm}^3$  foram adquiridas fotografias em que se tentou manter um posicionamento adequado e semelhante dos animais entre as avaliações. Considerou-se como resultado o número de dias entre a inoculação e a obtenção do referido volume. Posteriormente, o crescimento tumoral foi monitorizado diariamente durante 10 dias. O volume tumoral foi quantificado de acordo com a Equação 6,

$$V = \frac{L \times S^2}{2} \quad \text{Equação 6}$$

onde L representa o maior diâmetro e S o menor diâmetro do tumor (Dagrosa *et al*, 2003). Os resultados foram expressos sob a forma de volume tumoral relativo, de acordo com a Equação 7,

$$\text{Volume tumoral relativo} = \frac{V_n}{V_0} \quad \text{Equação 7}$$

onde V representa o volume ao n-ésimo dia e  $V_0$  representa o volume no dia em que foi atingido o volume tumoral de  $100 \text{ mm}^3$ .

Os animais foram occisados por sobredosagem anestésica seguida de deslocamento cervical e os tumores foram excisados para estudo histológico. As amostras foram fixadas em formalina tamponada na concentração de 10%, desidratadas com concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e embutidas em parafina. Realizou-se microtomia aleatória e preparação de lâminas que foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E), para a caracterização da neoplasia maligna, do grau de diferenciação (baseado na razão entre elementos glandulares e sólidos), bem como para obter informações acerca da morfologia e da existência de necrose. A observação microscópica foi realizada num microscópio Nikon eclipse 50i equipado com câmara digital Nikon-Digital Sight DS-Fil. O processamento das amostras, o seu exame macroscópico e a análise histológica das lâminas foi realizado no Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

## Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM® SPSS® *Statistics* versão 20. Na análise descritiva foram determinados valores de tendência central e de dispersão. Os resultados das variáveis quantitativas ao longo do texto foram expressos sob a forma de média  $\pm$  desvio-padrão.

Na análise inferencial a normalidade da distribuição das variáveis quantitativas foi avaliada de acordo com o teste de Shapiro-Wilk.

A comparação da capacidade de formação de esferas, da capacidade de auto-renovação de esferas, do tempo de duplicação celular, da eficiência clonogénica e da expressão de CD133, de CD24 e de CD44 entre as populações celulares foi realizada segundo o teste ANOVA (do inglês, *analysis of variance*) de um fator quando se verificou distribuição normal e homogeneidade das variâncias e segundo o teste de Kruskal-Wallis no caso contrário. Seguidamente foram realizadas comparações múltiplas entre os pares de grupos experimentais.

Para os valores das condições experimentais obtidos nos estudos de western blot, nomeadamente a análise da expressão da ALDH, dos recetores de estrogénios  $\alpha$  e  $\beta$ , dos recetores de progesterona, do HER2, da P53 e da  $\beta$ -catenina, as comparações foram realizadas com o teste *t-student* para uma média e utilizado o valor de normalização 1.

Na análise da captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG os valores experimentais obtidos para cada condição foram ajustados a um modelo exponencial utilizando o *software* *OriginPro* (OriginLab Corporation, Northampton, EUA), versão 8.0, segundo a Equação 8,

$$\text{Captação (\%)} = A \cdot (1 - e^{\ln(2) \cdot t / T_{50\%}})$$
Equação 8

onde  $A$  representa a captação máxima obtida e  $T_{50\%}$  representa o tempo que demora a ser atingida metade da captação máxima. Os parâmetros obtidos pelo ajuste das curvas de captação foram comparados utilizando o teste ANOVA de um fator. Seguidamente foram realizadas comparações múltiplas entre os pares de grupos experimentais.

Para os estudos de RMN os valores experimentais da concentração de  $[U-^{13}C]$  lactato em função do tempo foram ajustados a uma reta por regressão linear para cada população celular. A comparação dos declives obtidos foi realizada segundo o teste ANOVA de um fator. Seguidamente foram realizadas comparações múltiplas entre os pares de grupos experimentais.

A comparação da razão  $C3\_Lactato/C3\_Alanina$ , da razão  $C3\_Lactato/C4\_Glutamato$ , da razão  $C4Q/C4D45$  e da razão  $C3\_Glutamato/C4\_Glutamato$  entre populações celulares foi realizada segundo o teste ANOVA de um fator nos casos em que se verificou distribuição normal e homogeneidade das variâncias, ou segundo o teste de Kruskal-Wallis no caso contrário. Seguidamente foram realizadas comparações múltiplas entre os pares de grupos experimentais.

A expressão dos *spots* dos géis de eletroforese bidimensional foi comparada segundo o teste ANOVA no *software Samespots*.

Nos estudos *in vivo* a comparação do número de dias até a obtenção de um volume tumoral de  $100\text{ mm}^3$  e do volume tumoral relativo ao final de 10 dias foi realizada segundo o teste ANOVA de um fator nos casos em que se verificou distribuição normal e homogeneidade das variâncias ou o teste de Kruskal-Wallis no caso contrário. Seguidamente foram realizadas comparações múltiplas entre os pares de grupos experimentais.

Todas as comparações múltiplas foram corrigidas segundo o método de Bonferroni e foi considerado um valor de significância de 5% para todas as comparações.

## Resultados

### Esferas e derivadas aderentes

O protocolo de formação de esferas, previamente detalhado, originou populações de esferas, que correspondem a colónias esféricas em suspensão, conforme representado na Figura 14.

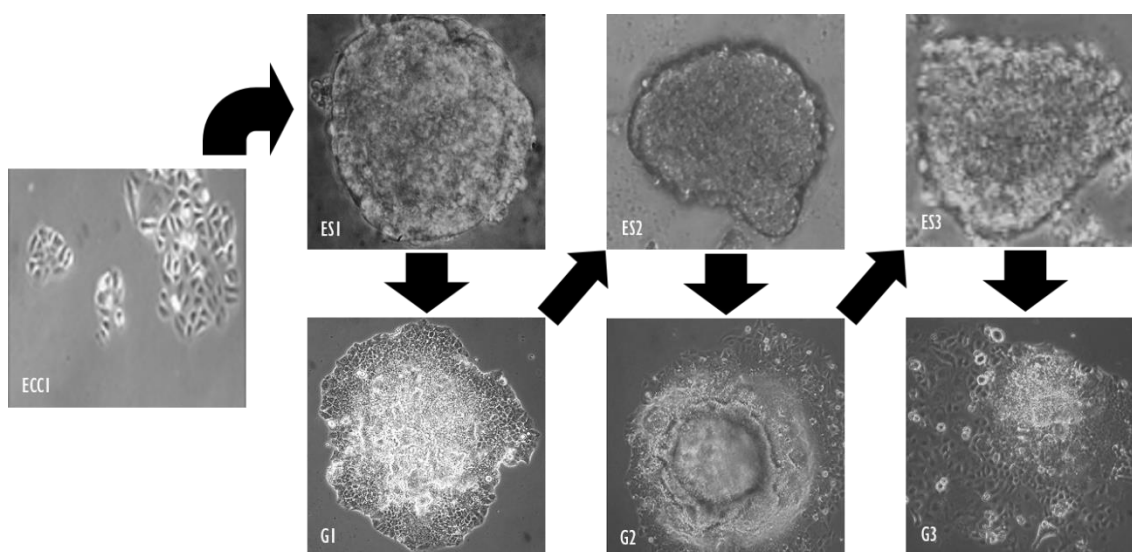


Figura 14: Imagens da linha celular ECC1, das populações de esferas (ES1, ES2 e ES3) e das populações derivadas aderentes (G1, G2, G3). As setas representam a sucessão da obtenção das diferentes culturas celulares. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 400x.

A linha celular ECC-1 originou a primeira geração de esferas, ES1. Estas quando colocadas em condições aderentes originaram a primeira população de derivadas aderentes, G1, que após novo protocolo de esferas originou as ES2. A população G2 derivou de ES2 e esta, quando submetida a protocolo de esferas obteve-se a população ES3, que em condições aderentes originou a população G3. As esferas ES1, ES2 e ES3 apresentaram morfologia esférica, por vezes irregular, com projeções celulares superficiais e de tamanho variável. As derivadas aderentes G1, G2 e G3 apresentaram-se como células em proliferação que migraram da periferia das esferas, como se pode observar na Figura 14, até originar uma monocamada confluenta. Sempre que estas monocamadas obtidas foram submetidas à ação da tripsina, voltaram a originar novas culturas celulares de morfologia semelhante à das células da linha celular parental ECC-1.

### Capacidade de formação e de autorrenovação de esferas

A avaliação da capacidade de formação de esferas mostrou que  $2,22 \pm 0,93\%$  de células da linha celular ECC-1 originaram esferas ES1, que  $2,54 \pm 1,05\%$  de células da população G1 originaram ES2 e que  $2,40 \pm 0,85\%$  de células da população G2 originaram ES3, o que traduz que não foram observadas diferenças significativas entre as três populações consideradas, tal como representado na Figura 15.

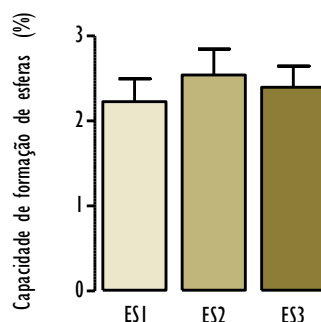


Figura 15: Capacidade de formação de esferas ES1, ES2 e ES3 a partir das células das populações aderentes ECC1, G1 e G2, respetivamente. A relação percentual entre o número de esferas obtidas e o número de células distribuídas inicialmente foi calculada após 5 dias de cultura. Os resultados representam a média e o erro padrão de seis ensaios. Não se observaram diferenças significativas entre as populações.

A avaliação da autorrenovação de esferas relevou que  $1,55 \pm 0,63\%$  das células obtidas da dissociação de ES1 originam novas esferas, que  $1,78 \pm 1,06\%$  das células obtidas da dissociação de ES2 originam novas esferas e que  $3,14 \pm 1,61\%$  das células obtidas da dissociação de ES3 originam novas esferas, como se pode observar no gráfico da Figura 16. Verificou-se que se obtiveram significativamente mais esferas a partir de células dissociadas de ES3, a terceira geração de esferas do que a partir de ES1, a primeira geração ( $p=0,002$ ).

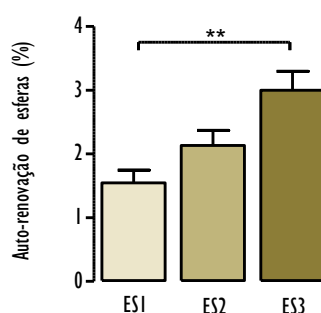


Figura 16: Autorrenovação de esferas a partir das células obtidas da sua dissociação. A relação percentual entre o número de esferas obtidas e o número de células distribuídas inicialmente foi calculada após 5 dias de cultura. Os resultados representam a média e o erro padrão de seis ensaios. As diferenças significativas entre as populações foram representadas com \*\* para  $p < 0,01$ .

### Área de projeção ocupada pelas esferas

A Figura 17 apresenta os resultados da superfície média ocupada pelas esferas das populações ES1, ES2 e



ES3. Para as esferas ES1 a área média ocupada foi de  $8,96 \times 10^5 \pm 1,23 \times 10^5$  pixels, para as esferas ES2 foi de  $6,34 \times 10^5 \pm 7,80 \times 10^4$  pixels e para as esferas ES3 foi de  $3,93 \times 10^5 \pm 5,82 \times 10^4$  pixels. Verificou-se que a área média ocupada pela ES1 é significativamente superior à ocupada pelas ES3 ( $p=0,001$ ).

A avaliação da área em pixels ocupada pela projeção das esferas ES1, ES2 e ES3 foi realizada em imagens obtidas aleatoriamente das quais são exemplo as representadas na Figura 18.

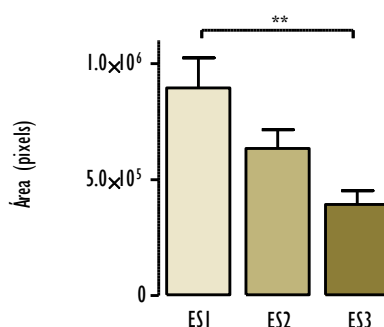


Figura 17: Superfície ocupada pelas esferas ES1, ES2 e ES3. Os valores apresentados exprimem a média do número de pixels e o erro padrão de pelo menos 30 imagens por cada condição obtidas em seis ensaios. As diferenças significativas entre as populações foram representadas com \*\* para  $p < 0,01$ .

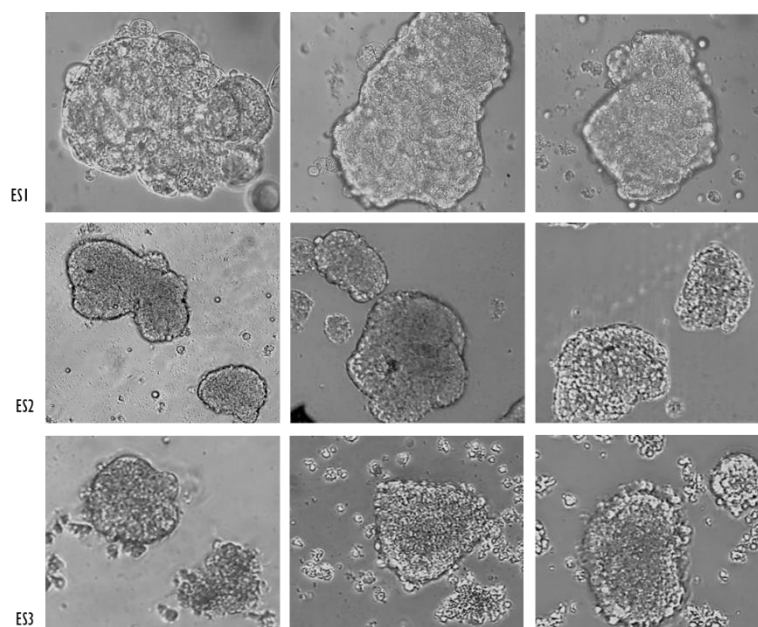


Figura 18: Imagens representativas das fotografias obtidas aleatoriamente para a quantificação da área em pixels ocupada pelas esferas. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 400x.

## Tempo de duplicação

O tempo de duplicação celular, representado na Figura 19, foi de  $33,16 \pm 7,42$  horas para as células da linha celular ECC-1,  $31,17 \pm 7,67$  horas para as células da população G1,  $30,35 \pm 7,54$  horas para as células da população G2 e  $33,47 \pm 6,64$  horas para as células da população G3.

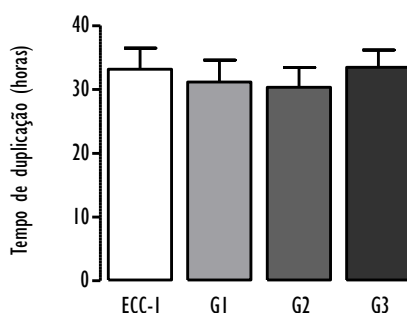


Figura 19: Tempo de duplicação da linha celular ECC-1, e das derivadas aderentes G1, G2 e G3. Os resultados representam a média e o erro padrão de seis ensaios. Não se observaram diferenças significativas entre as populações.

## Eficiência clonogénica

A Figura 20 mostra a eficiência clonogénica da linha celular ECC-1, das três populações de esferas (ES1, ES2 e ES3) e das três populações derivadas aderentes (G1, G2 e G3).

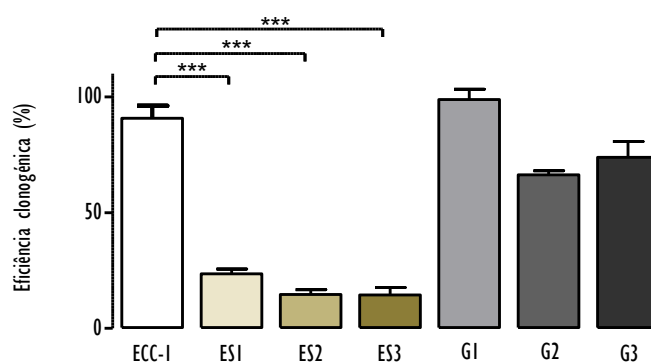


Figura 20: Eficiência clonogénica da linha celular ECC-1, das esferas ES1, ES2 e ES3 e das derivadas aderentes, G1, G2 e G3. A relação percentual entre o número de colónias obtidas e o número de células distribuídas inicialmente foi obtido após 12 dias de cultura. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos seis ensaios. As diferenças significativas em relação às células ECC-1 foram representadas com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

No caso das esferas obteve-se uma eficiência significativamente inferior à da linha celular ECC-I, que apresentou um valor de  $90,77 \pm 14,26\%$ , enquanto as células da população ES1 apresentaram uma eficiência clonogénica de  $23,71 \pm 8,49\%$  ( $p < 0,001$ ), as da população ES2 uma eficiência clonogénica de  $14,62 \pm 6,66\%$  ( $p < 0,001$ ) e as da população ES3 uma eficiência clonogénica de  $14,42 \pm 9,20\%$  ( $p < 0,001$ ). No que se refere às populações derivadas aderentes, G1, G2 e G3, não se verificaram diferenças significativas em comparação com a linha celular ECC-I, com valores de  $96,69 \pm 14,31\%$ ,  $74,28 \pm 18,20\%$  e  $73,89 \pm 18,06\%$ , respetivamente.

## Marcadores de células estaminais

A formação de esferas é uma propriedade de CSC *in vitro*. Para caracterizar as populações obtidas foram avaliados marcadores associados com CSC em diversos tumores, alguns já descritos para o cancro do endométrio, nomeadamente o CD133, o CD24 e o CD44. A média de intensidade de fluorescência da marcação de CD133 está representada na Figura 21.

Para a linha celular ECC-I obteve-se uma média de intensidade de fluorescência de  $1435 \pm 176$ . No caso das células da população ES1 e da população ES2 obtiveram-se valores superiores de média de intensidade de fluorescência, de  $3066 \pm 2065$  e de  $4577 \pm 1310$ , respetivamente, no entanto sem significado estatístico. Verificou-se que a média de intensidade de fluorescência das ES3, com um valor de  $2750 \pm 139$  foi significativamente superior a ECC-I ( $p = 0,048$ ). No que respeita às células das populações derivadas aderentes G1, G2 e G3 obtiveram-se médias de intensidade de fluorescência de  $768 \pm 412$ , de  $1059,67 \pm 40$  e de  $922 \pm 252$ , respetivamente.

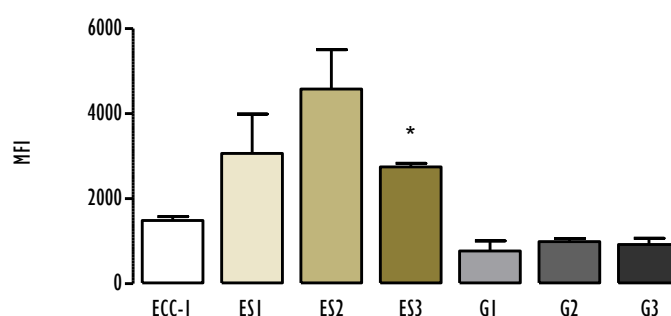


Figura 21: Expressão de CD133 na linha celular ECC-I, nas esferas ES1, ES2 e ES3 e nas derivadas aderentes G1, G2 e G3. Os valores apresentados exprimem a média de intensidade de fluorescência (MFI, do inglês *mean fluorescence intensity*) e o erro padrão de pelo menos três ensaios. As diferenças significativas entre as populações foram representadas com \* para  $p < 0,05$ .

Os histogramas da expressão de CD133 estão representados na Figura 22 para cada população. Desta análise comprova-se a expressão de CD133 pelas diferentes linhas celulares. Nos histogramas a linha vermelha representa a população após adição do anticorpo anti-CD133 e a linha azul corresponde ao controlo negativo e portanto à população sem adição do anticorpo anti-CD133. Pode observar-se o aumento de expressão de CD133 particularmente para as populações ES1, ES2 e ES3.

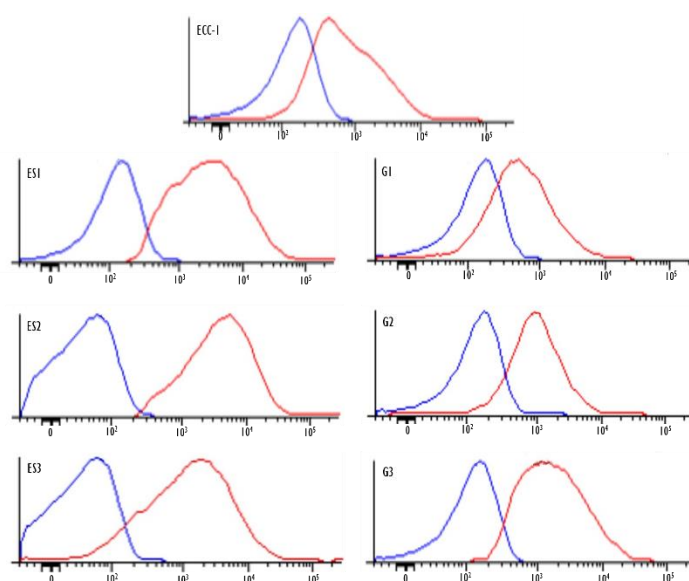


Figura 22: Histogramas representativos da marcação com CD133 positiva na linha celular ECC-1, nas esferas ES1, ES2 e ES3 e nas derivadas aderentes G1, G2 e G3. A linha vermelha representa a expressão após adição do anticorpo anti-CD133 e a linha azul representa o controlo negativo que corresponde à expressão sem adição do anticorpo anti-CD133.

A combinação específica  $CD24^{low}/CD44^{high}$  foi descrita como marcador de células estaminais da mama e a formação de mamóferas foi associada com este fenótipo (Dey *et al*, 2009).

O CD24 foi avaliado em todas as populações celulares deste estudo experimental. A média de intensidade de fluorescência da marcação com CD24 encontra-se representada na Figura 23 e foi de  $1345 \pm 530$  para a linha celular ECC-1. No que respeita às restantes populações não se obtiveram diferenças significativas em relação à anterior, com valores de  $1855 \pm 630$  para a ES1, de  $1555 \pm 360$  para a ES2, de  $1915 \pm 1292$  para a ES3, de  $1583 \pm 620$  para a G1, de  $1941 \pm 586$  para a G2 e de  $1267 \pm 781$  para a G3.

Na Figura 24 estão representados os histogramas da marcação com CD24. Desta análise comprova-se a expressão de CD24 pelas diferentes linhas celulares. Nos histogramas a linha vermelha representa a população após adição do anticorpo anti-CD24 e a linha azul corresponde ao controlo negativo e portanto à população sem adição do anticorpo anti-CD24. A expressão de CD24 não apresentou diferenças significativas

em nenhuma população estudada.

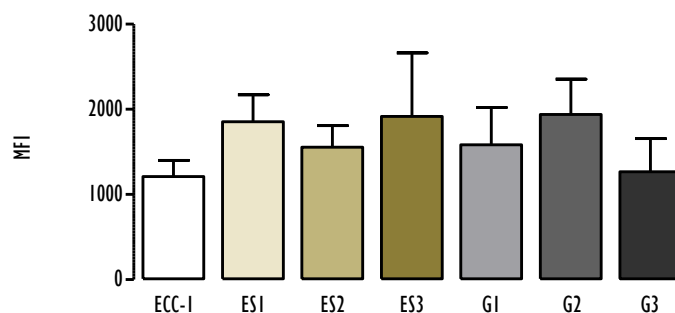


Figura 23: Expressão de CD24 na linha células ECC-I, nas de esferas ES1, ES2 e ES3 e nas derivadas aderentes G1, G3 e G3. Os valores apresentados exprimem a média de intensidade de fluorescência (MFI, do inglês *mean fluorescence intensity*) e o erro padrão de pelo menos três ensaios. Não se observaram diferenças significativas entre as populações.

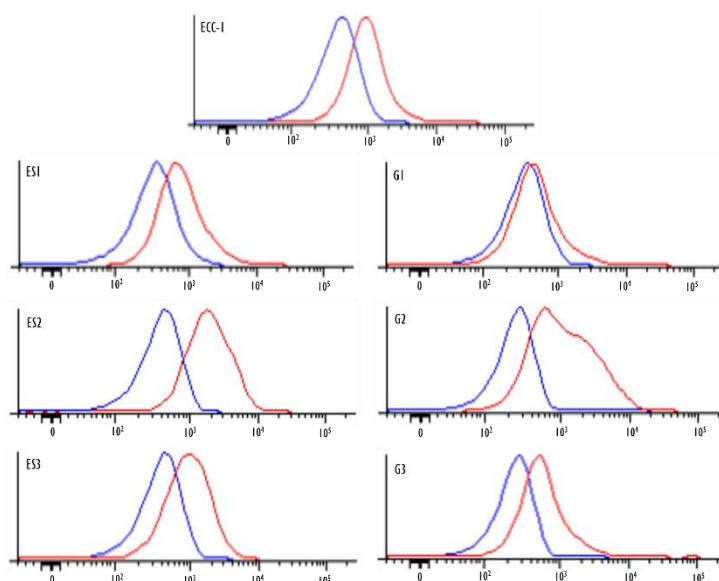


Figura 24: Histogramas representativos da marcação com CD24 na linha células ECC-I, nas populações de esferas ES1, ES2 e ES3 e nas derivadas aderentes G1, G3 e G3. A linha vermelha representa a expressão após adição do anticorpo anti-CD24 e a linha azul representa o controlo negativo que corresponde à expressão sem adição do anticorpo anti-CD24.

Considerando a população ECC-I, a média de intensidade de fluorescência para o marcador CD44 foi de  $5650 \pm 2956$ . Nas esferas obteve-se uma média de intensidade de fluorescência de  $18739 \pm 11711$  para a população ES1, significativamente superior à das ECC-I ( $p=0,006$ ), de  $8581 \pm 3898$  para a população ES2 e

de  $11506 \pm 6906$  para a população ES3. Nas derivadas aderentes, as médias de intensidade de fluorescência foram de  $5032 \pm 819$  para a população G1, de  $3079 \pm 77$  para a população G2 e de  $4315 \pm 688$  para a população G3, tal como representado na Figura 25.

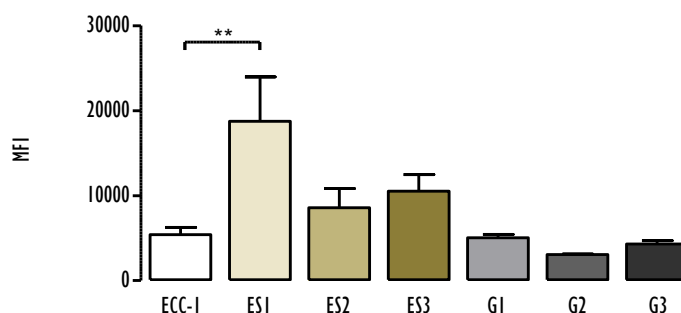


Figura 25: Expressão de CD44 na linha células ECC-I, nas esferas ES1, ES2 e ES3 e nas derivadas aderentes G1, G3 e G3. Os valores apresentados exprimem a média de intensidade de fluorescência (MFI, do inglês *mean fluorescence intensity*) e o erro padrão de pelo menos três ensaios. As diferenças significativas entre as populações foram representadas com \*\* para  $p < 0,01$ .

Os histogramas representativos da marcação CD44 estão descritos na Figura 26. Desta análise comprova-se a expressão de CD44 pelas diferentes linhas celulares.

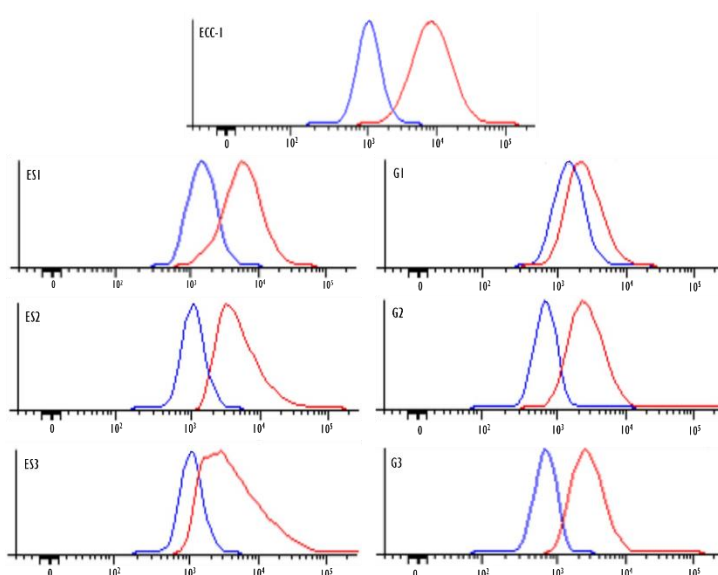


Figura 26: Histogramas representativos da marcação com CD44 na linha células ECC-I, nas populações de esferas ES1, ES2 e ES3 e nas derivadas aderentes G1, G3 e G3. A linha vermelha representa a expressão após adição do anticorpo anti-CD44 e a linha azul representa o controlo negativo que corresponde à expressão sem adição do anticorpo anti-CD44.

Nos histogramas a linha vermelha representa a população após adição do anticorpo anti-CD44 e a linha azul corresponde ao controlo negativo e portanto à população sem adição do anticorpo anti-CD44. Pode observar-se o aumento de expressão de CD44 particularmente na população ES1.

A família ALDH nos mamíferos foi relacionada com a diferenciação de células estaminais. As células estaminais hematopoiéticas assim como de alguns tumores sólidos como pulmão, bexiga e mama apresentaram aumento da atividade ALDH1 (Dave & Chang, 2009; Jiang *et al*, 2009; Su *et al*, 2010). No cancro do endométrio a expressão ALDH1 foi associada com tumorigenicidade e resistência aos agentes antineoplásicos (Rahadiani *et al*, 2011). A expressão de ALDH está representada na Figura 27. Esta expressão foi significativamente superior nas células da população ES1, com um valor de  $1,41 \pm 0,25$  ( $p=0,014$ ), nas da população ES2, com um valor de  $1,86 \pm 0,46$  ( $p=0,001$ ) e nas da população ES3, com um valor de  $2,10 \pm 0,46$  ( $p=0,004$ ), comparando com as células da linha parental ECC-1 para as quais se considerou expressão igual a 1. Para as células da população G1 obteve-se uma expressão de  $1,27 \pm 0,26$ , para as células da população G2 uma expressão de  $1,36 \pm 0,23$  e para as células da população G3 uma expressão de  $1,27 \pm 0,35$ .

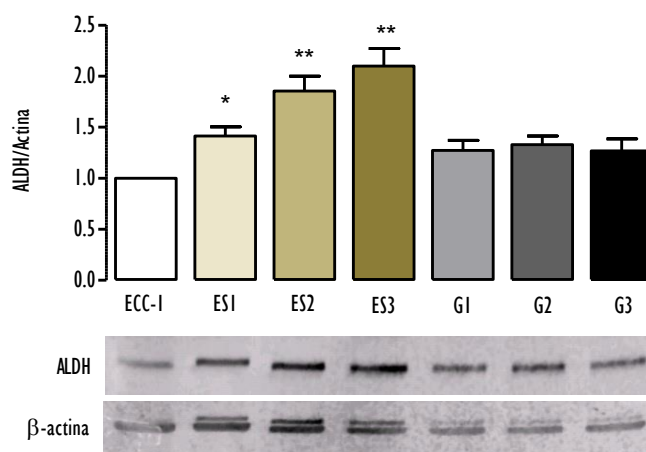


Figura 27: Expressão da ALDH na linha celular ECC1, nas ES1, ES2 e ES3 e G1, G2 e G3. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da ALDH e da actina e os gráficos representam a alteração relativamente à linha celular ECC1 (razão ALDH/actina do controlo igual a 1). Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios. As diferenças significativas em relação à linha celular ECC-1 foram representadas com \* para  $p < 0,05$  e com \*\* para  $p < 0,01$ . As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína ALDH e da actina para cada uma das condições experimentais.

## Expressão de recetores hormonais, HER2, P53, e $\beta$ -catenina

Os recetores de estrogénio humanos têm duas isoformas, a forma  $\alpha$  e a forma  $\beta$  que são expressas no útero (Gielen *et al*, 2006). No endométrio a expressão do recetor de estrogénio  $\alpha$  é superior à do recetor de estrogénio  $\beta$ . No endométrio tumoral a expressão de recetor de estrogénio  $\alpha$  foi superior nos tumores bem diferenciados enquanto os recetores de estrogénio  $\beta$  apresentaram uma sobre-expressão relativa nos tumores pouco diferenciados e metastáticos (Gielen *et al*, 2006).

A análise do recetor de estrogénio  $\alpha$ , descrita na Figura 28, revelou uma expressão deste recetor inferior nas células da população ES1, com um valor de  $0,060 \pm 0,20$  ( $p < 0,001$ ), nas da população ES2, com um valor de  $0,36 \pm 0,13$  ( $p < 0,001$ ) e nas da população ES3, com um valor de  $0,63 \pm 0,24$  ( $p = 0,042$ ). A expressão para as células das populações G1, G2 e G3 foi de  $0,94 \pm 0,08$ , de  $1,06 \pm 0,25$  e de  $0,88 \pm 0,21$ , respetivamente. Estas diferenças não mostraram alterações significativas em comparação com a linha de referência (ECC-1).

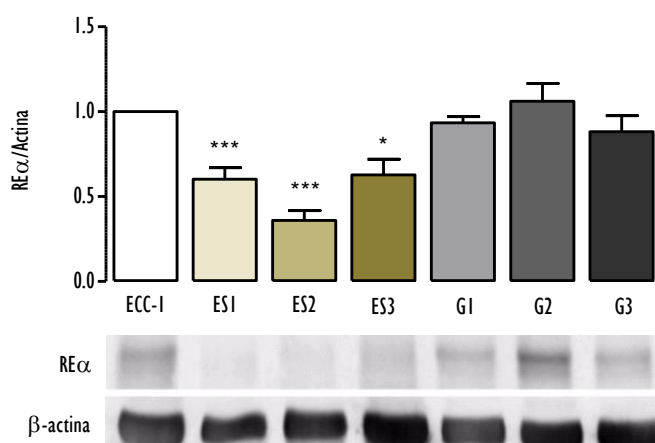


Figura 28: Expressão da recetor de estrogénios  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) na linha celular ECC1, nas ES1, nas ES2 e nas ES3 e nas G1, nas G2 e nas G3. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência do recetor de estrogénio  $\alpha$  e da actina e os gráficos representam a alteração relativamente à linha celular ECC1 (razão RE $\alpha$ /actina do controlo igual a 1). Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios. As diferenças significativas em relação à linha celular ECC-1 foram representadas com \* para  $p < 0,05$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ . As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína recetor de estrogénios  $\alpha$  e da actina para cada uma das condições experimentais.

A expressão do recetor de estrogénio- $\beta$  está representada na Figura 29. Neste estudo não se verificaram alterações significativas e obteve-se para as células da população ES1 um valor de  $0,97 \pm 0,20$ , para as da população ES2 um valor de  $1,15 \pm 0,42$ , para as da população ES3 um valor de  $1,05 \pm 0,41$ , para as da



população G1 um valor de  $1,11 \pm 0,47$ , para as da população G2 um valor de  $1,08 \pm 0,31$  e para as da população G3 um valor de  $1,02 \pm 0,25$ .

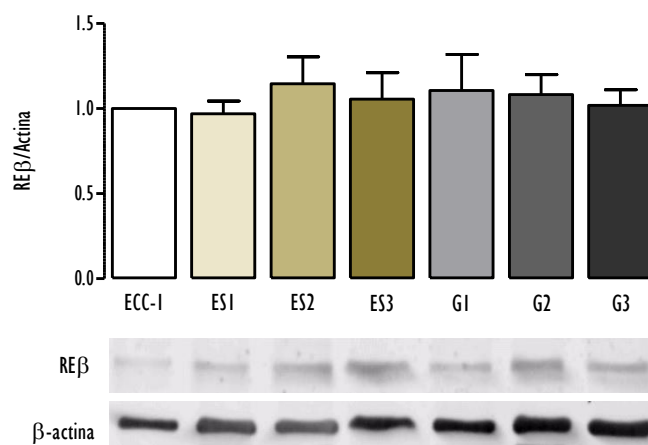


Figura 29: Expressão do receptor de estrogênio  $\beta$  (RE $\beta$ ) na linha celular ECC1, nas ES1, ES2 e ES3 e nas G1, G2 e G3. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência do receptor de estrogênio  $\beta$  e da actina e os gráficos representam a alteração relativamente à linha celular ECC1 (razão RE $\beta$  /actina do controlo igual a 1). Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios. Não se verificaram diferenças com significado estatístico entre as populações e a linha celular ECC-1. As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína receptor de estrogênio  $\beta$  e da actina para cada uma das condições experimentais.

Os recetores de progesterona humanos apresentam duas isoformas, o recetor de progesterona A e o recetor de progesterona B, a primeira isoforma corresponde a uma forma truncada da segunda que não possuiu os primeiros 164 aminoácidos da porção N-terminal (Kastner *et al*, 1990). No carcinoma do endométrio, a expressão do recetor de progesterona correlaciona-se inversamente com o estágio e com o grau do tumor, apresentando níveis menores na doença avançada (Gielen *et al*, 2006).

No que respeita à expressão dos recetores de progesterona, apresentado na Figura 30, obteve-se nas células da população ES1, um valor de  $0,94 \pm 0,15$ , nas da população ES2 um valor de  $1,23 \pm 0,10$ , nas da população ES3 um valor de  $1,06 \pm 0,21$ , nas da população G1 um valor de  $1,06 \pm 0,17$ , nas da população G2 um valor de  $0,91 \pm 0,11$  e nas da população G3 um valor de  $1,12 \pm 0,13$ . Estes valores não apresentaram alterações significativas em relação à linha celular ECC-1.

O HER2 pertence a uma família de recetores de fatores de crescimento relacionados com o crescimento e com a diferenciação celular. A amplificação do gene correlacionou-se com a tumorigênese (Montejo *et al*, 2009). A sobre-expressão do HER2 foi associada a estádios avançados, a tumores indiferenciados e ao

subtipo seroso no carcinoma do endométrio (Murali *et al*, 2014).

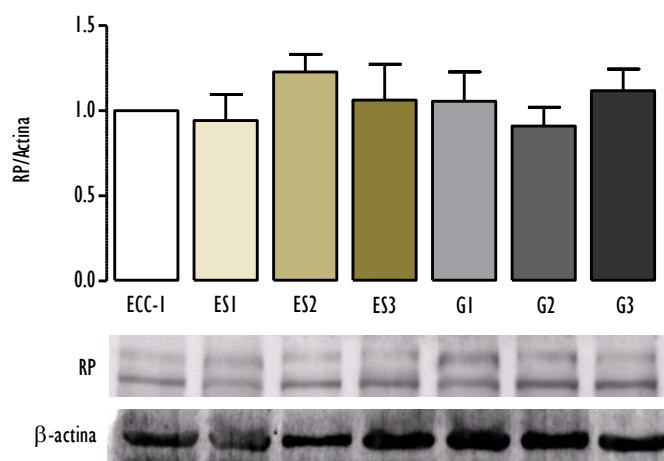


Figura 30: Expressão do recetor de progesterona (RP) na linha celular ECC1, nas ES1, ES2 e ES3 e nas G1, G2 e G3. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência dos recetores de progesterona e da actina e os gráficos representam a alteração relativamente à linha celular ECC1 (razão RP/actina do controlo igual a 1). A expressão dos recetores de progesterona apresenta duas bandas correspondendo a 120 e a 95 kDA. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios. Não se verificaram diferenças com significado estatístico entre as populações e a linha celular ECC-1. As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão do recetor de progesterona e da actina para cada uma das condições experimentais.

A análise por western blot das *populações* ECC-1, ES1, ES2, ES3, G1, G2 e G3 não identificou nenhuma banda de marcação do anticorpo específico, no entanto, a mesma foi observada na linha celular MCF-7, cujo extrato proteico, foi utilizado como controlo positivo, tal como representado na Figura 31.

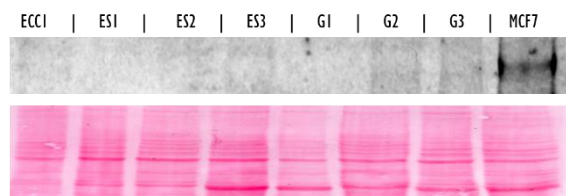


Figura 31: *Immunoblot* representativo da ausência de expressão da HER2 na linha celular ECC1, nas ES1, ES2 e ES3 e nas, G1, G2 e G3. É também apresentada a banda correspondente ao controlo positivo no qual se utilizou um extrato proteico da linha celular MCF-7. Em baixo apresenta-se a mesma membrana previamente submetida a coloração com *Ponceau*.

O gene supressor tumoral *TP53* regula vias transcripcionais e a sua subexpressão foi associada a pior

prognóstico no cancro do endométrio (Takebe *et al*, 2011). A deficiência de P53 nas células estaminais foi associada ao aumento da divisão simétrica e da capacidade de autorrenovação (Tang, 2012).

A expressão de P53 está representada na Figura 32. Dos resultados destaca-se a diminuição significativa da expressão de P53 em relação às células da linha celular ECC-1 nas células da população ES1, para um valor de  $0,46 \pm 0,15$  ( $p=0,006$ ), nas da população ES2, para um valor de  $0,61 \pm 0,19$  ( $p=0,06$ ) e nas da população ES3, para um valor de  $0,55 \pm 0,16$  ( $p<0,001$ ). Paralelamente, nas células da população G1 observou-se uma expressão de  $0,97 \pm 0,17$ , nas da população G2 uma expressão de  $0,98 \pm 0,15$  e nas da população G3 uma expressão de  $0,95 \pm 0,19$ , valores sem diferenças significativas em relação à linha celular de referência ECC-1.

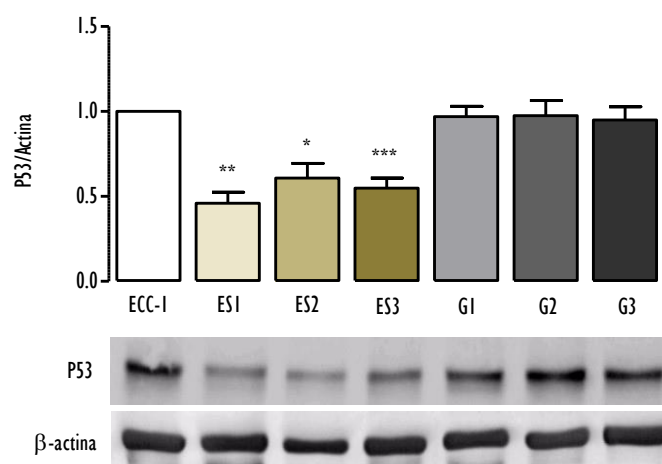


Figura 32: Expressão da P53 na linha celular ECC1, nas ES1, ES2 e ES3 e nas, G1, G2 e G3. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da P53 e da actina e os gráficos representam a alteração relativamente à linha celular ECC1 (razão P53/actina do controlo igual a 1). Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios. As diferenças significativas em relação à linha celular ECC-1 foram representadas com \* para  $p<0,05$ , com \*\* para  $p<0,01$  e com \*\*\* para  $p<0,001$ . As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína P53 e da actina para cada uma das condições experimentais.

A via WNT/ $\beta$ -catenina interage com diversas vias de sinalização, nomeadamente as vias que influenciam a pluripotência, as caderinas, a EMT e ainda diversos fatores de crescimento como o TGF- $\beta$  e o FGF (Cheng *et al*, 2013a). As alterações da via de sinalização WNT/ $\beta$ -catenina, particularmente a perda de E-caderina, foram descritas em 50% dos tumores endometrioides e em 80% dos tumores serosos (Murali *et al*, 2014).

A expressão de  $\beta$ -catenina foi estudada nas populações celulares e os resultados estão representados na Figura 33. A expressão de  $\beta$ -catenina nas células da população ES1 foi de  $1,27 \pm 0,10$ , nas da população

ES2 foi de  $1,25 \pm 0,24$  e nas da população ES3 foi de  $1,20 \pm 0,05$ , no entanto, estes valores não foram significativamente superiores em relação à linha celular ECC-1. Nas células da população G1 a expressão de  $\beta$ -catenina foi de  $0,71 \pm 0,07$ , nas da população G2 foi de  $0,69 \pm 0,12$  e nas da população G3 foi de  $0,75 \pm 0,06$ .

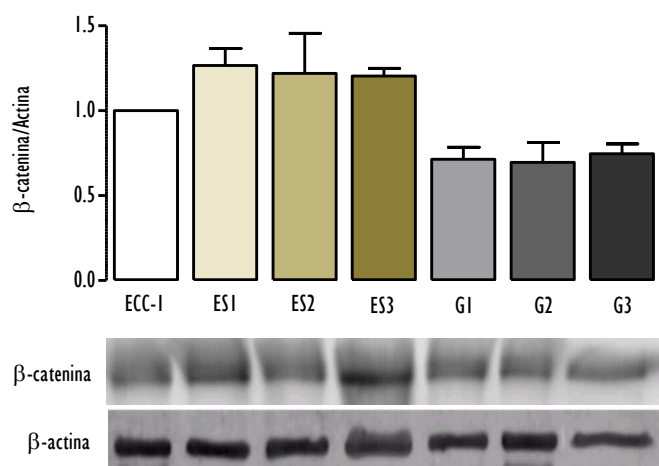


Figura 33: Expressão de  $\beta$ -catenina na linha celular ECC1, nas ES1, ES2 e ES3 e nas G1, G2 e G3. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da  $\beta$ -catenina e da actina e os gráficos representam a alteração relativamente à linha celular ECC1 (razão  $\beta$ -catenina/actina do controlo igual a 1). Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios. Não se verificaram diferenças com significado estatístico entre as populações e a linha celular ECC-1. As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína  $\beta$ -catenina e da actina para cada uma das condições experimentais.

## Captação de $^{18}\text{F}$ -FDG

A  $^{18}\text{F}$ -FDG entra na célula através dos transportadores de glicose (GLUT, do inglês *glucose transporter*), em especial o GLUT1 e o GLUT3 e, uma vez no citosol, é fosforilada pela hexocinase em  $^{18}\text{F}$ -FDG-6-fosfato que não pode ser catalisada, pelo que permanece no interior das células onde é lentamente desfosforilada (Bensinger & Christofk, 2012). A acumulação de  $^{18}\text{F}$ -FDG-6-fosfato é proporcional à utilização de glicose pelas células e a captação depende do transportador da glicose e da atividade da hexocinase (Bensinger & Christofk, 2012).

A captação máxima de  $^{18}\text{F}$ -FDG foi superior nas células das populações de esferas em relação às da população parental ECC-1 ( $0,55 \pm 0,05\%$ ), com valor de  $1,00 \pm 0,05\%$  ( $p=0,0076$ ) na população ES1, de  $0,98 \pm 0,06\%$  ( $p=0,0062$ ) na população ES2 e de  $1,04 \pm 0,09\%$  ( $p=0,018$ ) na população ES3. Os resultados não revelaram diferenças para as populações de derivadas aderentes, com captações máximas de

$0,54 \pm 0,01\%$  para as células da população G1, de  $0,55 \pm 0,03\%$  para as da população G2 e de  $0,66 \pm 0,07\%$  para as da população G3, tal como representado na Figura 34.

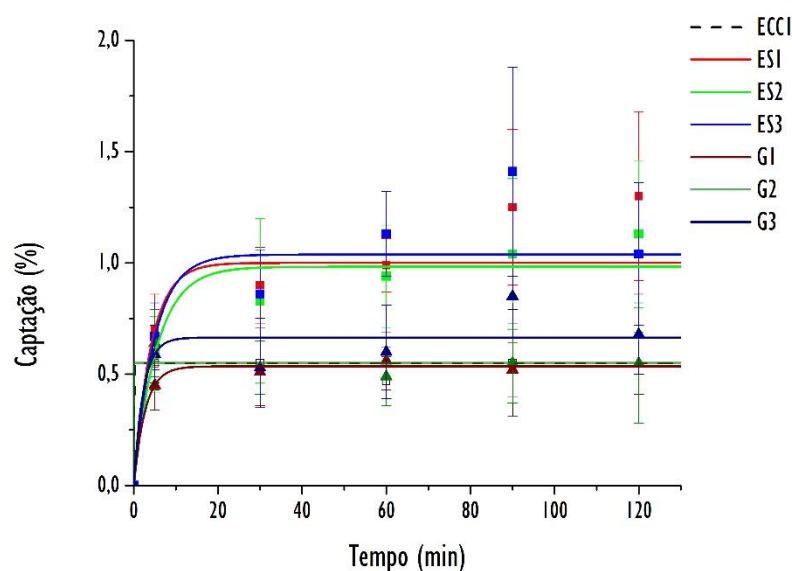


Figura 34: Captação de <sup>18</sup>F-FDG na linha celular ECC1, nas ESI, ES2 e ES3 e nas G1, G2 e G3. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão da percentagem de captação aos 5, aos 30, aos 60, aos 90 e aos 120 minutos de pelo menos 4 ensaios. Os valores do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) para o ajuste ao modelo foi superior a 0,95 para todos os grupos. <sup>18</sup>F-FDG, Flúor-18-fluordesoxiglicose.

## Análise metabólica por RMN

O lactato apresenta-se como metabolito essencial na análise metabólica, dado ser o produto final do processo de fermentação láctica, intimamente associado à glicólise. A produção de [<sup>13</sup>C]lactato é apresentada na Figura 35 em que são visíveis as expansões da ressonância para as células ECC-I, ESI e G1.

A observação destes espectros mostra um aumento da produção de lactato com o aumento do período de incubação. De forma qualitativa e comparando as três linhas celulares verifica-se que na população ESI a produção de lactato foi menor quando comparado com as populações ECC-I e G1, tal como representado na Figura 36. Uma maior saída de lactato para o meio de cultura é indicativa de uma maior atividade do processo glicolítico.

A velocidade de produção do lactato, que corresponde em cada caso ao declive da reta, tal como demonstra a Tabela 5, foi calculada a partir das respostas lineares apresentadas na Figura 36. O declive para as células da população ESI foi inferior ao da população ECC-I ( $p < 0,001$ ) e da G1 ( $p < 0,001$ ). A

comparação entre as células da população ECC-I e da população GI não apresentou diferenças. Estes dados indicam que a produção de lactato foi menor nas células da população ESI em relação à da população ECC-I e da população GI.

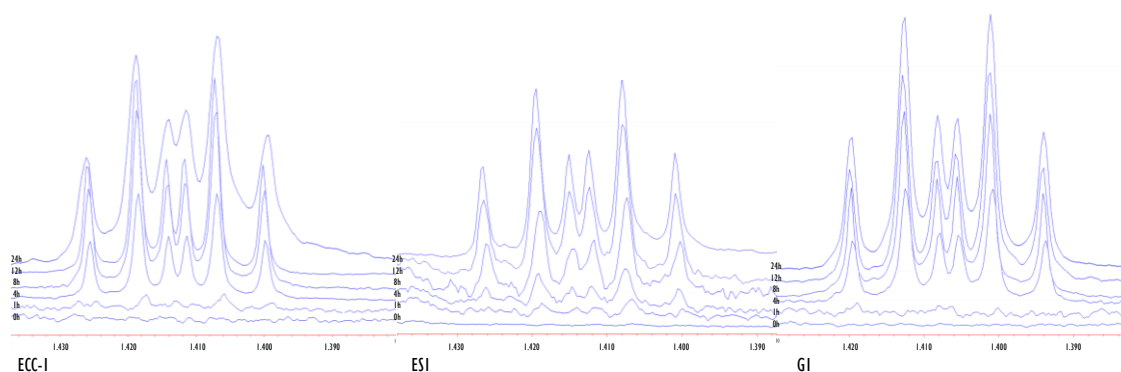


Figura 35: Expansões dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN do meio de cultura das células ECC-I, ESI e GI, respeitantes a um dos satélites do  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ lactato. A ressonância é composta por 6 picos, resultado da existência de acoplamentos homo- ( $^3J_{\text{HH}}$ ) e heteronucleares ( $^2J_{\text{HC}}$  e  $^3J_{\text{HC}}$ ). As amostras foram referentes às 0, à 1, às 4, às 8, às 12 e às 24 horas.

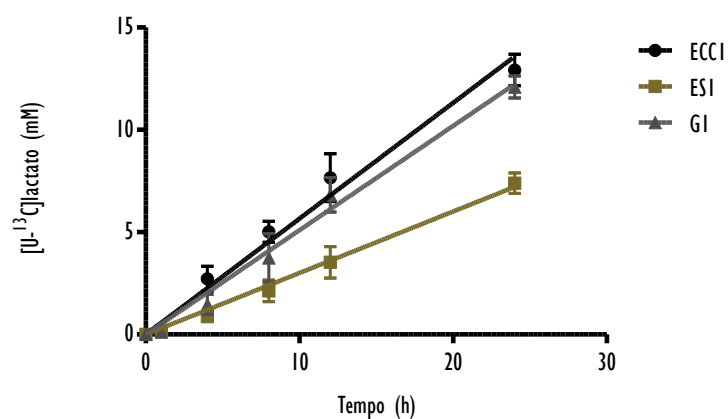


Figura 36: Evolução da concentração de  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ lactato no meio de cultura durante 24 horas de incubação para a linha celular ECC-I e as populações ESI e GI. Os valores apresentados exprimem, para cada tempo, a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios.

Tabela 5: Declives das respostas lineares da produção de lactato marcado, respetivo erro padrão e coeficiente de determinação ( $r^2$ ).

População celular	Declive (mM/h)	$r^2$
ECC-I	$0,57 \pm 0,02$	0,93
ESI	$0,30 \pm 0,01$	0,91
GI	$0,51 \pm 0,02$	0,92

Os espetros de  $^{13}\text{C}$ -RMN permitiram avaliar e comparar as três linhas celulares no que diz respeito ao estado redox do citosol, atividade do ciclo de Krebs, ao seu *turnover*, ao acoplamento entre a glicólise e este ciclo e à anaplerose. Para avaliar o estado redox do citosol determinou-se, nas três linhas celulares, a razão entre o carbono-3 do lactato, designado por C3\_Lac, e o carbono-3 da alanina, designado por C3\_Ala, representado na Figura 37.

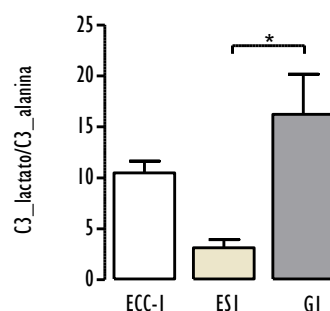


Figura 37: Razão C3\_Lactato/C3\_Alanina para as populações ECC-I, ESI e GI. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$ .

Dos resultados obtidos verificou-se que quando comparadas as três populações existem diferenças significativas ( $p=0,027$ ). A razão C3\_Lac/C3\_Ala da população ESI foi de  $3,13 \pm 1,61$ , ou seja, inferior à da população GI que foi de  $12,08 \pm 6,52$  ( $p=0,022$ ), assim como à da população ECC-I, que foi de  $10,48 \pm 2,32$ , no entanto neste último caso sem significado estatístico. A diminuição desta relação nas células da população ESI reflete um aumento da produção de alanina o que aponta para um estado citosólico oxidado.

O acoplamento entre a via glicolítica e o ciclo de Krebs foi avaliado pela determinação da razão entre o C3\_Lac e o carbono-4 do glutamato, designada por C4\_Glut, representado na Figura 38.

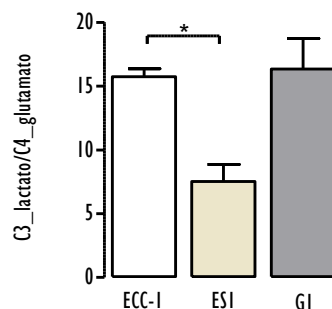


Figura 38: Razão C3\_Lactato/C4\_Glutamato para as populações ECC-I, ESI e GI. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$ .

A razão C3\_Lac/C4\_Glut para as células da população ESI foi de  $7,52 \pm 2,69$ , inferior às da população ECC-I a qual apresentou uma razão de  $15,73 \pm 1,27$  ( $p = 0,038$ ), o que indica maior acoplamento entre a glicólise e o ciclo de Krebs nas células ESI. A população GI apresentou razão C3\_Lac/C4\_Glut de  $16,34 \pm 4,79$ . Na avaliação do *turnover* do ciclo de Krebs, em que foi analisada a razão C4Q/C4D45, verificou-se que comparando as células da população ECC-I, que apresentavam um valor de  $1,03 \pm 0,22$ , com as células da população ESI, com um valor de  $1,39 \pm 0,18$  e com as da população GI, com um valor de  $1,06 \pm 0,20$ , não se observaram diferenças significativas, conforme descrito na Figura 39.

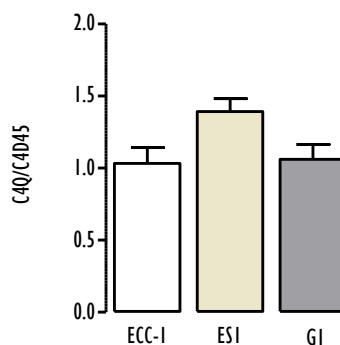


Figura 39: Razão C4Q/C4D45 para as populações ECC-I, ESI e GI. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios. Não se observaram diferenças significativas entre as populações celulares.

Com recurso à razão entre o carbono-3 e carbono-4 do glutamato, designada por C3\_Glut/C4\_Glut, foi possível avaliar a contribuição da anaplerose. A razão para as células da população ECC-I foi de  $0,55 \pm 0,11$ , para as da população ESI foi de  $0,99 \pm 0,41$  e para as da população GI foi de  $0,89 \pm 0,20$ , conforme descrito na Figura 40.



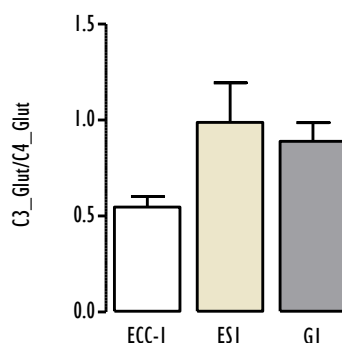


Figura 40: Razão C3\_Glut/C4\_Glut para as populações ECC-I, ESI e GI. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios. Não se observaram diferenças significativas entre as populações celulares.

## Proteômica

A eletroforese bidimensional permitiu separar o proteoma obtido das células da linha celular ECCI, das células da população ESI e das células da população GI. Cada dimensão avaliou duas características fundamentais distintas, como o ponto isoelétrico durante a focagem isoelétrica e a sua massa molecular durante SDS-PAGE. A Figura 41 apresenta o gel de referência das células da linha celular ECC-I e um exemplo de um gel de células da população ESI e da população GI.

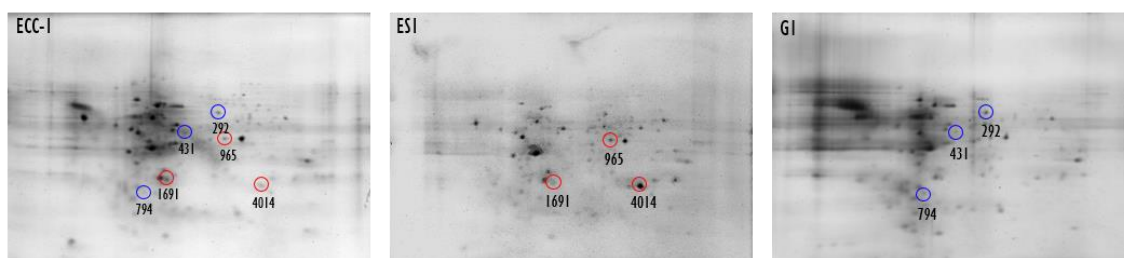


Figura 41: Géis bidimensionais representativos de uma experiência para ECCI (gel de referência), ESI e GI. Os *spots* representados correspondem aos casos exemplificativos da comparação de expressão entre ECC-I *versus* ESI (a vermelho) e ECCI *versus* GI (a azul).

Relativamente à comparação dos géis obtidos com os extratos celulares da população ESI com os da linha celular ECC-I foram analisados um total de 168 *spots*. Destes, 62 (36,90%) apresentaram uma expressão semelhante, com uma variação entre de 1 e 1,4 vezes. Na população de esferas verificou-se aumento da expressão de 52 *spots* (30,95%). Nestes casos observou-se um aumento de 1,5 a 2 vezes em 37 *spots*, dos quais 2 *spots* mostraram diferenças significativas, com  $p=0,018$  em ambos. Observou-se um aumento de 2,1 a 3 vezes em 10 *spots*, com diferenças significativas em 4 *spots*, que obtiveram um valor  $p$

de 0,019, de 0,023, de 0,043 e de 0,013. Verificou-se ainda uma expressão superior a 3,1 vezes em 5 *spots*, dos quais um apresentou diferenças significativas, com um valor p de 0,009. Por outro lado observou-se diminuição da expressão de 54 *spots* (32,14%), sendo esta diminuição de 1,5 a 2 vezes em 29 *spots*, um deles com  $p=0,004$ . A diminuição de 2,1 a 3 vezes foi observada em 20 *spots*, dos quais 2 com um valor p de 0,011 e de 0,049. A diminuição de expressão superior a 3,1 foi descrita em 5 *spots*. A Figura 42, a Figura 43 e a Figura 44 representam a expressão aumentada, diminuída e semelhante entre os extratos provenientes da população ESI em relação aos da linha celular ECC-1, respetivamente.

A comparação dos géis obtidos com os extratos celulares da linha ECC-1 com os da população GI analisou um total de 161 *spots*. A variação de expressão entre 1 e 1,4 vezes correspondeu a 78 *spots* (48,45%).

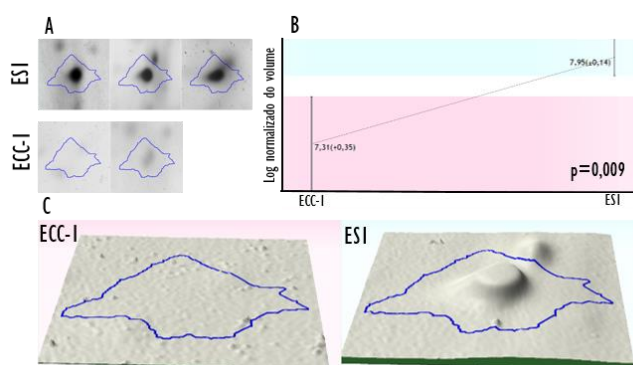


Figura 42: Representação da expressão do *spot* 4041, com expressão aumentada na população ESI em relação à ECC-1. A imagem A mostra a intensidade do *spot* nos 5 géis analisados, a imagem B representa o gráfico correspondente ao perfil de expressão do *spot* ( $p=0,009$ ) e as imagens C constituem a reconstrução tridimensional do mesmo *spot*.

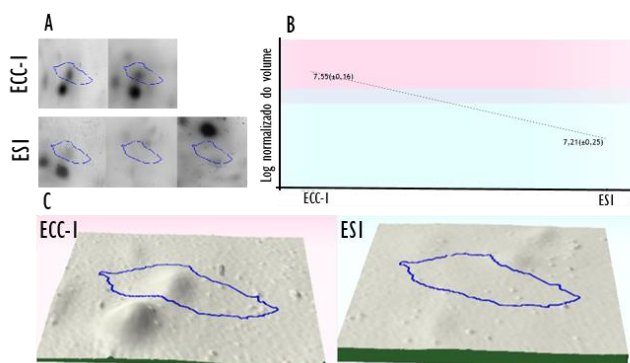


Figura 43: Representação da expressão do *spot* 1691, com expressão diminuída na população ESI em relação à ECC-1. A imagem A mostra a intensidade do *spot* nos 5 géis analisados, a imagem B representa o gráfico correspondente ao perfil de expressão do *spot* ( $p=n.s.$ ) e as imagens C constituem a reconstrução tridimensional do mesmo *spot*.

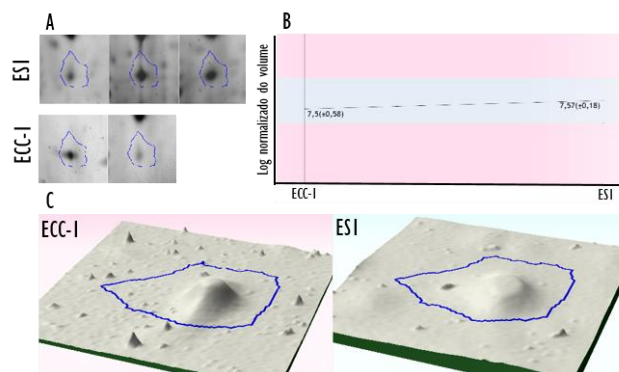


Figura 44: Representação da expressão do *spot* 965, com expressão semelhante da população ESI em relação à ECC-I. A imagem A mostra a intensidade do *spot* nos 5 géis analisados, a imagem B representa o gráfico correspondente ao perfil de expressão do *spot* ( $p=n.s.$ ) e as imagens C constituem a reconstrução tridimensional do mesmo *spot*.

A expressão aumentada na população GI foi observada em 40 *spots* (24,84%), com uma elevação de 1,5 a 2 vezes em 27 *spots*, dos quais quatro apresentaram diferenças significativas com  $p=0,014$ ,  $p=0,025$ ,  $p=0,029$  e  $p=0,042$ . A expressão aumentada na população GI entre 2,1 e 3 vezes correspondeu a 8 *spots*, com significância num *spot* ( $p=0,019$ ). Para diferenças de expressão superiores a 3,1 foram detetados 5 *spots*, um deles com aumento significativo,  $p=0,017$ . Concomitantemente, verificou-se diminuição da expressão em 43 *spots* (26,71%) na população GI em relação à linha celular ECC-I. Destes, verificou-se uma diminuição de 1,5 a 2 vezes em 18 *spots*, de 2,1 a 3 vezes em 23 *spots*, dos quais dois *spots* apresentaram um valor  $p$  de 0,027 e de 0,035. A expressão inferior a 3,1 vezes foi observada em 2 *spots*. A Figura 45, a Figura 46 e a Figura 47 representam a expressão aumentada, diminuída e semelhante nos extratos das células da população GI em relação à linha celular ECC-I, respetivamente.

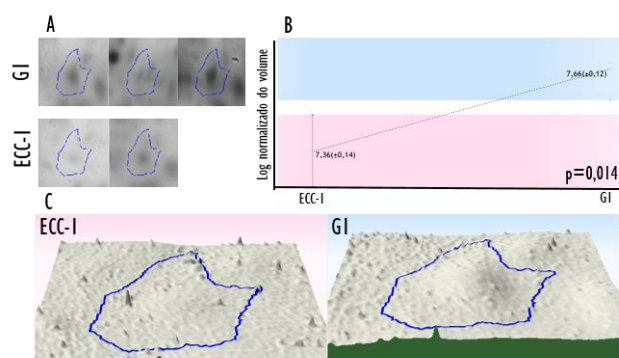


Figura 45: Representação da expressão do *spot* 794, com expressão aumentada na população GI em relação à linha celular ECC-I. A imagem A mostra a intensidade do *spot* nos 5 géis analisados, a imagem B representa o gráfico correspondente ao perfil de expressão do *spot* ( $p=0,014$ ) e as imagens C constituem a reconstrução tridimensional do mesmo *spot*.

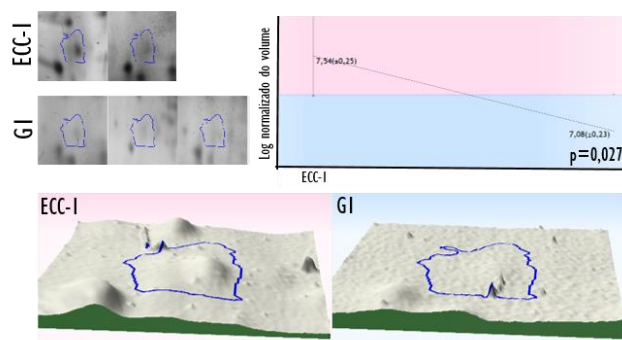


Figura 46: Representação da expressão do *spot* 431, com expressão diminuída na população GI em relação à linha celular ECC-I. A imagem A mostra a intensidade do *spot* nos 5 géis analisados, a imagem B representa o gráfico correspondente ao perfil de expressão do *spot* ( $p=0,027$ ) e as imagens C constituem a reconstrução tridimensional do mesmo *spot*.

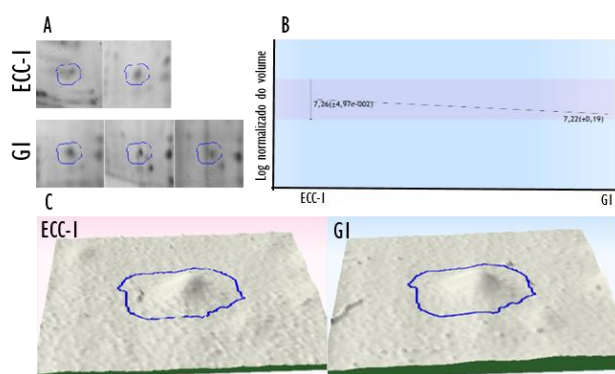


Figura 47: Representação da expressão do *spot* 292, com expressão semelhante na população GI em relação à linha celular ECC-I. A imagem A mostra a intensidade do *spot* nos 5 géis analisados, a imagem B representa o gráfico correspondente ao perfil de expressão do *spot* ( $p=n.s.$ ) e as imagens C constituem a reconstrução tridimensional do mesmo *spot*.

## Tumorigénese *in vivo*

O modelo heterotópico permitiu estudar a capacidade tumorigénica das populações e estabelecer diferenças no crescimento tumoral entre as populações.

As imagens da Figura 48 constituem um exemplo dos animais de cada grupo, monitorizados semanalmente após a obtenção de um volume de  $100 \text{ mm}^3$ . A avaliação desta sequência aponta para um aparecimento mais precoce de tumores nas populações ES3, com xenotransplantes identificados logo na primeira semana.

Os tumores resultantes da inoculação das células ECC-I e GI foram os que demoraram mais tempo a atingir um volume de  $100 \text{ mm}^3$ . O tempo decorrido entre a inoculação das diferentes populações celulares no modelo heterotópico e a obtenção de um volume tumoral de  $100 \text{ mm}^3$  está descrita na Tabela 6. A

população com crescimento mais rápido foi a ES3, que demorou em média 3,7 dias até à obtenção de um volume tumoral de 100 mm<sup>3</sup>. A linha celular ECC-1 e a população G1 apresentaram o crescimento mais lento, com tempo médio de 37,8 e de 40 dias, respetivamente. A comparação do número de dias até à obtenção do volume tumoral de 100 mm<sup>3</sup> não revelou diferenças significativas entre as populações.

Uma vez atingido o volume de 100 mm<sup>3</sup> o volume tumoral relativo após 10 dias, também descrito na Tabela 6, revelou maiores dimensões dos tumores das esferas ES2 e das esferas ES3, no entanto, não se observaram diferenças com significado estatístico.

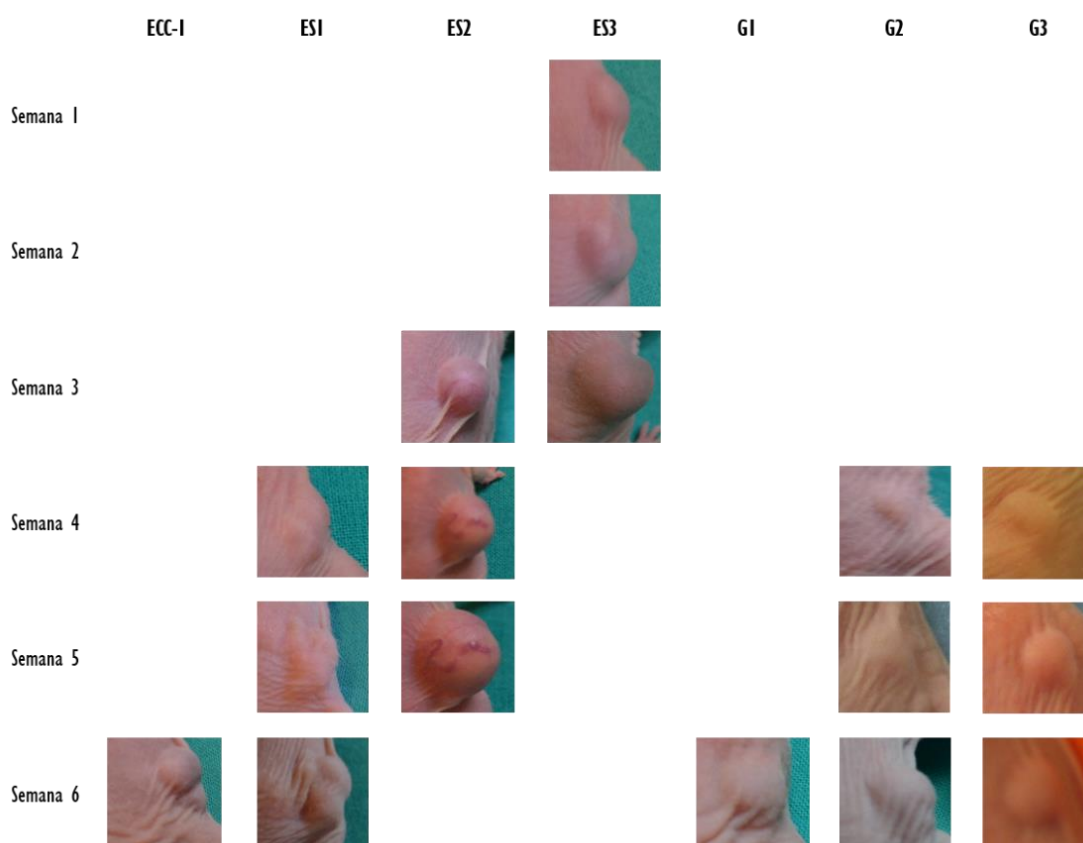


Figura 48: Registo fotográfico ilustrativo do crescimento tumoral após a obtenção de um volume tumoral de 100 mm<sup>3</sup> do modelo *in vivo*.

O volume tumoral relativo após a obtenção de um volume de 100 mm<sup>3</sup> foi monitorizado durante 10 dias e encontra-se representado na Figura 49. A análise do gráfico permite observar um crescimento tumoral superior nas esferas ES2 e ES3 e a população G1 apresentou o maior índice de crescimento das derivadas

aderentes. Não se verificaram diferenças significativas considerando o crescimento tumoral para cada população inoculada.

Tabela 6: Tempo decorrido entre a inoculação das populações celulares no modelo heterotópico e a obtenção de um volume tumoral de 100 mm<sup>3</sup> e volume tumoral relativo após mais 10 dias de monitorização.

	ECC-1	ES1	ES2	ES3	G1	G2	G3
n	3	3	4	4	4	2	3
Dias	37,8±9,9	27,5±15,2	23,8±9,0	3,7±1,2	40,0±1,4	24,5±4,5	24,7±2,1
Volume tumoral relativo	2,71±0,20	2,89±0,45	4,50±0,64	4,26±0,32	3,73±0,79	3,14±1,30	2,66±1,16

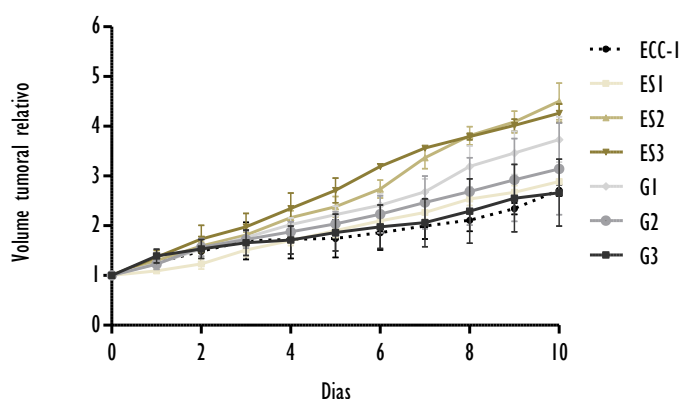


Figura 49: Crescimento tumoral das populações ECC-1, ES1, ES2, ES3, G1, G2 e G3. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios, sob a forma de razão do volume do tumor em relação com volume de 100 mm<sup>3</sup>.

O estudo histológico dos tumores excisados encontra-se representado na Figura 50. A análise das imagens revelou que os xenotransplantes representam uma neoplasia epitelial maligna com características semelhantes entre si, constituída maioritariamente por áreas sólidas, com áreas de tecido glandular numa proporção minoritária. As células são poligonais, de citoplasma eosinófilo e núcleos pleomórficos hiper cromáticos. Observaram-se muitas mitoses, incluindo formas atípicas e destacam-se algumas áreas de necrose.

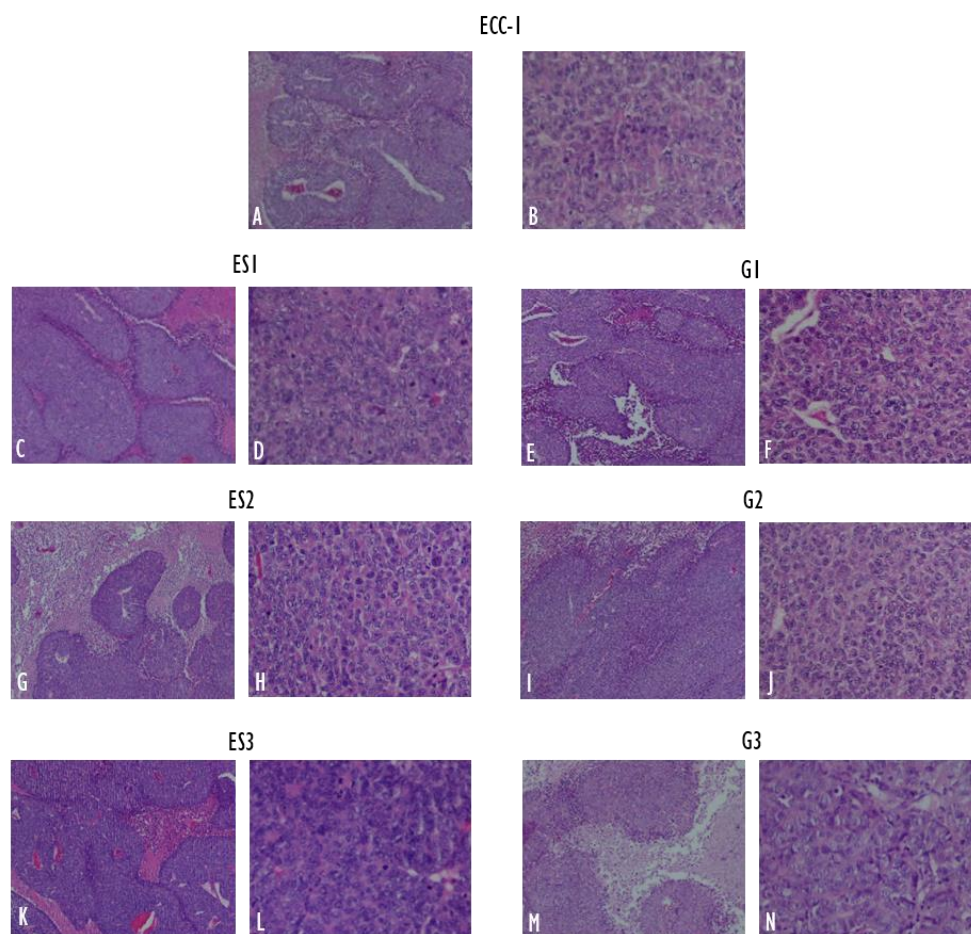


Figura 50: Imagens histológicas com a coloração de hematoxilina e eosina representativas dos tumores heterotópicos dos animais injetados com ECC-I (A e B), ESI (C e D), G1 (E e F), ES2 (G e H), G2 (I e J), ES3 (K e L), G3 (M e N). As imagens histológicas representam uma neoplasia predominantemente sólida e componente glandular minoritário. As células apresentam elevada atipia cito-nuclear, índice mitótico elevado e algumas áreas de necrose. Para cada par de imagens, a da esquerda tem uma ampliação de 40x e a da direita 200x.

## Discussão

As CSC são uma população de células tumorais com capacidade de autorrenovação, tumorigenicidade e potencial de resistência à terapêutica (Visvader & Lindeman, 2008; Yu & Bian, 2009). O estudo das propriedades destas células no cancro do endométrio constituiu o principal objetivo deste trabalho experimental. Com este propósito foi avaliada a capacidade de formação de esferas assim como a capacidade

desta população originar células derivadas aderentes ao longo das gerações e estudada a sua caracterização. Posteriormente estas células foram avaliadas no que respeita à resposta à terapêutica e ao seu comportamento *in vivo*.

Os estudos com base no protocolo de formação de esferas têm sido utilizados em larga escala para avaliação da atividade de células estaminais normais e tumorais (Visvader & Lindeman, 2008; Allegra *et al*, 2014). Esta população foi descrita para vários tumores sólidos, nomeadamente para o cancro da mama em que foi designada por mamosferas, para o cancro da próstata em que foi designada por prostasferas, para o cancro colorretal em que foi designada por colonosferas, para os gliomas em que foi designada por gliomasferas, para o cancro do pâncreas, para o carcinoma hepatocelular, para o cancro do pulmão, entre outros (Allegra *et al*, 2014). Inicialmente, na década de 70, foi descrito o modelo esferoide tumoral multicelular que se baseou na manutenção de células isoladas em suspensão, cultivadas em meio suplementado com soro bovino fetal mas sem fatores de crescimento e em condições de cultura não aderente. Este modelo foi sujeito a várias implementações ao longo das décadas (Weiswald *et al*, 2015). A partir de 2000 foi descrito o modelo tridimensional de esferas, designadas por tumorosferas, que permitiu o estudo e a expansão da população de CSC. O primeiro trabalho com tumorosferas foi realizado em tumores cerebrais e rapidamente se expandiu a outros tipos de cancro (Singh, 2003). Neste modelo são cultivadas suspensões de células isoladas de linhas celulares, ou de tecido tumoral ou de sangue, mantidas em meio suplementado com fatores de crescimento como o EGF e o FGF, mas sem soro bovino fetal, em condições de cultura não aderente (Weiswald *et al*, 2015). O modelo das tumorosferas permite estudar as propriedades das CSC e tem sido aplicado em diversos campos como a avaliação do crescimento tumoral, a *stemness*, a tumorigenicidade *in vivo* e a avaliação de sensibilidade a fármacos.

Foram também descritos outros modelos como o modelo de esferas derivadas do tecido tumoral e o modelo esferoide organotípico multicelular (Weiswald *et al*, 2015). Neste último, o tumor é fragmentado e mantido em meio suplementado com soro bovino fetal e com aminoácidos não essenciais e em condições de cultura não aderente. No modelo de esferas derivadas do tecido tumoral, a amostra é dissociada de forma mecânica ou enzimática e a cultura é mantida em meio suplementado com soro bovino fetal sem outros fatores ou, em alternativa, em meio suplementado com EGF e FGF mas sem soro bovino fetal. Este procedimento foi inicialmente realizado em placas que propiciam a adesão e só posteriormente foi feita a transferência para condições de cultura não-aderente (Weiswald *et al*, 2015).

No nosso trabalho experimental foi utilizado o modelo de tumorosferas, isto é, as células foram mantidas em condições de cultura não aderente, em meio semissólido, à custa da presença de metilcelulose, suplementado com EGF e bFGF e sem soro bovino fetal. Trabalhos anteriores mostraram que a adição de bFGF e EGF é fundamental para a expansão e a manutenção do fenótipo em suspensão das esferas (Erickson



*et al*, 2008; Nieto-Estévez *et al*, 2013). Os mecanismos pelos quais o FGF e o EGF asseguram a manutenção das esferas e outro tipo de células estaminais, incluindo as células estaminais embrionárias, não são totalmente conhecidos. O FGF regula direta e indiretamente o nível e o estado pós-transcricional de diversas moléculas alvo e afeta a autorrenovação celular, a sobrevivência celular, a proliferação celular, a adesão celular e a supressão da diferenciação terminal (Nieto-Estévez *et al*, 2013). No protocolo de esferas que usamos no nosso estudo com células tumorais do endométrio, foi utilizada a suplementação em dias alternados, de forma a manter as propriedades de células estaminais ao longo do período de cada experiência. Este intervalo de tempo teve por base outros trabalhos em que foi comprovado que a adição de FGF, com intervalos de 4 dias, a culturas de células embrionárias e adultas dos bolbos olfativos induziu morte celular, ativação de mecanismos de proteção celular e de diferenciação celulares, indicando a perda de propriedades de células estaminais (Nieto-Estévez *et al*, 2013). Estes dados sustentam uma suplementação em intervalos de tempo inferiores para manutenção *in vitro* das propriedades de células estaminais.

Outros suplementos foram também utilizados no nosso protocolo de formação de esferas, como a insulina, e a transferrina, que induzem a proliferação de células estaminais. Foi comprovado em células neuronais que a apotransferrina juntamente com o EGF e o FGF foram suficientes para induzir a formação de neuroesferas primárias. A associação de concentrações baixas de insulina ou de IGF-I aumentaram o número e a dimensão das esferas, o que contribuiu para a manutenção celular ao longo das diversas passagens (Erickson *et al*, 2008).

Cada esfera é derivada do crescimento clonal de uma célula isolada. No nosso protocolo de formação de esferas a distribuição celular foi realizada a baixa densidade para evitar a fusão celular e a agregação. Outra estratégia foi a utilização de metilcelulose semissólida, também descrita por outros autores (Dontu *et al*, 2003a). A inibição da adesão celular origina a morte por *anoikis* das células diferenciadas (Weiswald *et al*, 2015). A sobrevivência das células isoladas em culturas em suspensão envolve a sobrevivência na ausência de interação entre a célula e a matriz extracelular e as interações intercelulares (Dontu & Wicha, 2005). No entanto, é de considerar que estas abordagens podem não eliminar a totalidade dos agregados clonais, cuja formação é também influenciada pela composição e pelo volume do meio, pela área de superfície das placas de cultura e pela duração da cultura (Weiswald *et al*, 2015).

Neste trabalho experimental, o protocolo de formação de esferas foi repetido sucessivamente a partir de culturas aderentes obtidas das populações de esferas anteriores. Este procedimento originou três populações de esferas e três populações de suas derivadas aderentes. A cultura das populações de esferas em condições aderentes permitiu verificar que as células das esferas apresentam a capacidade de diferenciação em condições aderentes. A repetição do protocolo de esferas reflete ainda a capacidade de autorrenovação desta população. Por outro lado a intenção de repetir sucessivamente o protocolo pretendeu isolar um grupo de

células com maior prevalência de propriedades estaminais, assim como verificar a manutenção das propriedades de autorrenovação. Outros autores também descreveram o crescimento em condições aderentes após suspensão da suplementação de fatores de crescimento e a adição de soro bovino fetal ao meio de cultura em placas ou em Matrigel™. Nestas condições, os autores verificaram diferenciação das esferas, salientando a sua plasticidade (Prasetyanti *et al*, 2013). Outros autores também demonstraram que a capacidade de diferenciação em culturas aderentes se mantém numa população de esferas após seis passagens sucessivas de repetição do protocolo. Esta população adere ao final do terceiro dia e apresenta padrão morfológico semelhante ao da linha celular de cancro colorretal de origem (Wu *et al*, 2013a). No nosso modelo experimental destaca-se que as esferas com origem na linha celular ECC-1 apresentam uma população com capacidade de divisão assimétrica, que origina células progenitoras com capacidade de diferenciação em condições aderentes.

A capacidade de formação de esferas com diâmetros superiores a 40 µm a partir da linha celular ECC-1 foi de 2,22%, valor semelhante para as sequenciais populações de esferas, que foi de 2,54 % para a população ES2, derivada de G1 e de 2,40% para a população ES3, derivada de G2. Noutros trabalhos, a formação de esferas reportada em linhas celulares de carcinoma do colo variou de acordo com a linha celular, com valores de 65,5% para a linha celular A431, de 32,80% para a linha Caski e sem capacidade de formação de esferas pela linha SiHA (Bortolomai *et al*, 2010). A capacidade de formação de esferas das células isoladas da linha celular de melanoma B16-F10 foi de 20%, valor semelhante à da linha celular de cancro da mama MCF-7, mas para a linha celular de cancro colorretal HT-29 a percentagem de células aderentes a formar esferas foi de 80% enquanto a linha celular de cancro da mama MDA-MB-231 não mostrou esta capacidade (Calvet *et al*, 2014). Estes dados apontam para uma grande variabilidade na capacidade de formação de esferas entre linhas celulares, mesmo considerando o mesmo tipo de cancro e, portanto, esta será uma característica específica de cada linha.

Outro aspeto avaliado no nosso estudo experimental, em relação à caracterização das populações de esferas foi a capacidade de autorrenovação após desagregação das esferas e individualização das células. A formação de esferas foi observada numa percentagem de 1,55% nas ES1 e que aumentou para 1,78% nas ES2 e para 3,14% nas ES3, esta significativamente superior à da ES1. Estes resultados permitem concluir que a população de esferas é heterogénea, apresentando uma pequena proporção de células com capacidade de divisão simétrica. A eficiência de formação de esferas foi avaliada noutras linhas, por outros autores. Neste contexto, um estudo que avaliou seis linhas celulares de cancro da mama ao longo de cinco passagens seriadas em que as esferas foram dissociadas e as células novamente distribuídas após sete dias de cultura. Este procedimento não revelou diferenças ao longo das passagens e a percentagem máxima de eficiência de formação de esferas foi de 7% para a linha celular HBL100 (Smart *et al*, 2013). No entanto, noutro

trabalho observou-se uma diminuição de 50% (apesar de sem significância estatística) na capacidade de formação de esferas secundárias e terciárias na linha celular HT-29. Estes autores verificaram valores semelhantes para as linhas B16-F10 e MCF-7 também avaliadas (Calvet *et al*, 2014). Noutro trabalho com linhas celulares da mama, a eficiência de formação de mamosferas obtidas de forma sequencial, aumentou de cerca de 0,2% na primeira geração para valores de cerca de 0,6% na terceira passagem e decresceu na quarta geração (Dey *et al*, 2009). Num estudo com a linha celular de cancro do colo HeLa a eficiência de formação de novas esferas após a sua dissociação em células individualizadas foi de 40,79% após 12 dias em cultura (Wang *et al*, 2014). Mais uma vez se verifica que esta capacidade é variável de acordo com a linha celular. No nosso estudo, o aumento da capacidade de autorrenovação com os protocolos de formação de ES1, de ES2 e de ES3 poderá ser justificado por um sucessivo enriquecimento em células com propriedades estaminais. Por outro lado, a avaliação da área de projeção das esferas demonstrou que há uma diminuição nas gerações sucessivas, sendo a diferença significativamente inferior quando se comparam as ES3 com as ES1.

Neste estudo, a avaliação do tempo de duplicação das populações aderentes em relação à linha celular parental não apontou para diferenças, o que sugere uma característica inerente a estas populações em cultura aderente. No trabalho de Smart e colaboradores, em que os autores comparam o crescimento de 10 linhas celulares em condições aderentes com condições de formação de esferas, foi estabelecido um modelo matemático da taxa de divisão celular simétrica a longo prazo. A correlação entre o crescimento da linha celular com a capacidade de formação de esferas mostrou que o crescimento é inerente à linha celular e não às condições de cultura (Smart *et al*, 2013) uma vez que o crescimento das gerações derivadas aderentes não foi influenciado pelo fenótipo de esferas da população que lhes deu origem. Assim, salienta-se que a proliferação é característica do tipo celular e esta capacidade manteve-se mesmo após a diferenciação em condições aderentes.

A eficiência clonogénica obtida no nosso estudo experimental evidenciou uma capacidade de formar colónias inferior nas esferas em comparação com a linha celular de origem ECC-1 e as derivadas aderentes. O ensaio clonogénico deteta todas as células que mantêm a capacidade de produzir células progenitoras (Franken *et al*, 2006). Outros autores que compararam esta capacidade entre populações de esferas e populações aderentes verificaram uma redução de aproximadamente 20 a 30% nas células das esferas de linhas celulares de cancro da mama (Calvet *et al*, 2014). Noutro estudo com mamosferas, as células que cresceram em suspensão apresentaram eficiência de formação de colónias reduzida, comparando com as células mantidas em cultura em monocamada (Liu *et al*, 2014b). Foi proposto que as células que constituem as esferas podem sofrer adaptações ou seleção no meio em suspensão que resulta numa menor capacidade de aderir. No entanto este resultado não se verificou em todas as linhas celulares estudadas, nomeadamente

nas linhas celulares HT-29 e MCF-7 (Calvet *et al*, 2014). Deste modo sugere-se que esta adaptação ocorra numa fase inicial do processo de adesão celular e mais uma vez salienta a plasticidade da população das esferas.

No contexto do cancro do endométrio, o trabalho experimental realizado demonstra um padrão de capacidade de autorrenovação de esferas característico da linha celular ECC-1 que serviu de plataforma à caracterização celular que se realizou posteriormente. A capacidade de formação de esferas, a sua autorrenovação, o tempo de duplicação e mesmo a capacidade clonogénica evidenciam um padrão associado a esta linha celular. Transpondo para a prática clínica, provavelmente estas características serão distintas em cada tumor do endométrio e poderão ter implicações em diversos parâmetros clínicos, incluindo a resposta à terapêutica. Os estudos com tumorosferas reportados para o cancro do endométrio são escassos. Num deles, de Rutella e colaboradores, foram utilizados tumores primários do endométrio após dissociação enzimática e estabeleceram-se culturas em meio sem soro bovino fetal e suplementado com fatores de crescimento até à formação de agregados em suspensão. As culturas foram expandidas semanalmente por dissociação mecânica das esferas e nova distribuição das células isoladas e pequenos agregados residuais. Após cinco semanas em cultura foram identificadas esferas em cinco de 15 casos. A capacidade de formação de esferas diminuiu na 7ª semana de cultura e na 8ª semana não foram detetadas populações esféricas (Rutella *et al*, 2009). Outro grupo utilizou também um protocolo com tumores primários, no qual as células obtidas após digestão enzimática foram submetidas a cultura em meio sem soro bovino fetal suplementado com fatores de crescimento e dissociação com solução não enzimática cada sete a dez dias (Zhou *et al*, 2011a). A diferenciação das células das tumorosferas foi induzida pela adição de 10% de soro bovino fetal ao meio de células estaminais e todos os casos geraram colónias (Zhou *et al*, 2011a).

Apesar de terem sido propostos e avaliados diversos marcadores de CSC específicos para cada tipo de tumor, não existem ainda moléculas consensuais e estabelecidas. Um dos putativos marcadores de superfície estudado no contexto das CSC e também no cancro do endométrio é o CD133. No nosso estudo a expressão de CD133, de acordo com a média de intensidade de fluorescência, foi superior na população de esferas ES1, ES2 e ES3, tendo nesta última atingido significado estatístico em relação à linha parental ECC-1. Nas populações de derivadas aderentes (G1, G2 e G3) esta expressão não teve variação em relação à linha celular ECC-1. Assim, este marcador aumentou nas esferas e diminuiu no processo de diferenciação em condições aderentes. Apesar da função do CD133 não estar totalmente esclarecida, foi recentemente proposto que tem um papel na organização da membrana celular, uma vez que a sua expressão é restrita à membrana plasmática de células epiteliais e foi associada com o colesterol da membrana (Rutella *et al*, 2009; Cervelló *et al*, 2011). O CD133 foi descrito como marcador de superfície de CSC em tumores do sistema nervoso como o glioblastoma, o meduloblastoma, em tumores do cólon, do pâncreas, do pulmão e

do ovário (Hubbard & Gargett, 2010). A população CD133<sup>+</sup> teve uma variação entre 0 e 42,1% em células de cancro do cólon, do ovário e da próstata (Hubbard & Gargett, 2010). A diferenciação de esferas em condições aderentes foi associada com paragem de expressão de CD133 e a perda de capacidade tumorigénica (Hubbard & Gargett, 2010). O fenótipo CD133<sup>+</sup> foi associado a tumorigénese utilizando apenas 100 células, no entanto nem todas as células CD133<sup>+</sup> originaram tumores, indicando que não é um marcador universal de CSC. Vários trabalhos têm estudado o CD133 no cancro do endométrio. A expressão de CD133 foi avaliada em tumores do endométrio humano e apesar da grande heterogeneidade, verificou-se que o fenótipo CD133<sup>+</sup> teve uma expressão média de 18,1%, com intervalo de 1,3 a 62,60% nas células dissociadas dos tumores (Rutella *et al*, 2009). Outros autores reportaram uma percentagem da população CD133<sup>+</sup> de 5,7 a 27,4% nas células analisadas de tumores primários do endométrio (Friel *et al*, 2010). Outro estudo com as linhas celulares de cancro do endométrio Ishikawa, HEC-1A, AN3CA, RL95-2, MFE280 e MFE296 avaliou a frequência da população CD133<sup>+</sup>. A marcação com o anticorpo anti-CD133/1 humano revelou uma população CD133<sup>+</sup> mais elevada nas linhas celulares Ishikawa e MFE280, com valores de 15,5 e de 9,3%, respetivamente, enquanto as restantes linhas apresentaram valores inferiores a 1% (Nakamura *et al*, 2010). A análise com o anticorpo CD133/2 mostrou uma tendência semelhante, com frequências de 10,1% e de 20,2% para as linhas Ishikawa e MFE280, respetivamente, e níveis inferiores a 1% para as linhas HEC-1A, AN3CA e RL95-2. A linha MFE296 apresentou frequências intermédias de aproximadamente 5%, para ambos os anticorpos. Globalmente, as marcações com os anticorpos CD133/1 e CD133/2 foram concordantes (Nakamura *et al*, 2010). Na linha celular de carcinosarcoma uterino FU-MMT-1 a percentagem de células CD133<sup>+</sup> foi de 65,9% (Choijamts *et al*, 2011). Parece pois que a marcação CD133 será uma característica da linha celular, e os casos reportados para linhas celulares de cancro do endométrio revelam uma percentagem minoritária CD133<sup>+</sup>. No nosso estudo, a média de intensidade de fluorescência para o CD133 nas populações ES1, ES2 e ES3 foi tendencialmente superior em relação à população parental ECC-1 e em relação às populações aderentes G1, G2 e G3. Este marcador foi já correlacionado com o prognóstico em doentes com cancro do endométrio. O estudo de Nakamura e colaboradores demonstrou através de imunohistoquímica, que a expressão aumentada de CD133 foi um fator de prognóstico independente em doentes com tumores do endométrio (Nakamura *et al*, 2010). Numa metanálise recente foi considerado que o nível elevado de expressão de CD133 se correlaciona com pior prognóstico em doentes com cancro do ovário (Liu *et al*, 2013).

O estudo da marcação CD133<sup>+</sup> nas populações de esferas foi realizado em vários tumores sólidos por diversos autores. No caso da linha celular de cancro do pulmão H1299, a percentagem de células CD133<sup>+</sup> analisadas por citometria de fluxo foi de 0,97% para a cultura em monocamada e representou 94,7% das esferas originadas desta linha celular (Chung *et al*, 2015). Este estudo semelhante no cancro do ovário

mostrou um aumento das células CD133<sup>+</sup> na população de esferas originadas deste tumor, tendo sido utilizada a técnica PCR em tempo real (Kryczek *et al*, 2012). Na população de esferas derivadas de ECC-I obtidas no nosso estudo experimental verificou-se uma expressão de CD133 que pode refletir a heterogeneidade celular da população de esferas. As tumorosferas não são uma estrutura homogênea de células indiferenciadas, mas incluem uma variabilidade de entidades morfológicamente distintas com heterogeneidade molecular inter e intraesfera incluindo a expressão de marcadores de diferenciação (Smart *et al*, 2013). Deste modo o protocolo de tumorosferas enriquece seletivamente o crescimento de CSC apesar de também estarem presentes células tumorais progenitoras e diferenciadas (Weiswald *et al*, 2015). Esta última premissa foi confirmada no nosso trabalho pela manutenção do crescimento em condições aderentes das populações G1, G2 e G3, todas derivadas das esferas, que se diferenciaram nestas condições.

Com o objetivo de estudar outros marcadores de superfície associados com o fenótipo de CSC, foi avaliada a expressão de CD24 e de CD44. A expressão de CD24 foi semelhante nas populações estudadas. No entanto a expressão de CD44 foi superior na população de esferas ES1 comparando com a linha celular ECC-I. As restantes populações de esferas também apresentaram tendência para uma média de intensidade de fluorescência do CD44 superior à da linha celular parental e a expressão nas populações derivadas aderentes G1, G2 e G3 também não apresentou diferenças em relação à linha celular ECC-I. O fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> tem sido associado a propriedades de CSC em tumores sólidos, particularmente no cancro da mama. O interesse do estudo do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> nas CSC surgiu após a publicação de Al-Hajj e colaboradores, em que os autores identificaram e isolaram uma população de células de cancro da mama com este fenótipo que originou tumores *in vivo* com apenas 100 células (Al-Hajj *et al*, 2003). O CD44 tem uma função de sinalização e parece estar expresso nas CSC da mama, da próstata, do ovário e do cólon (Hubbard & Gargett, 2010). Relativamente ao cancro do endométrio, considerando as linhas celulares de tumores do tipo II do endométrio, a KLE e a AN3CA, foi reportado o isolamento de uma população CD44<sup>+</sup> e CD133<sup>+</sup> que representou 0,063% e 0,177%, respetivamente. Os autores verificaram sobre-expressão de marcadores de CSC como o NANOG e o OCT4 na população CD44<sup>+</sup> e CD133<sup>+</sup> assim como maior eficiência clonogénica (Gao *et al*, 2012). O CD44 tem sido associado à via WNT/ $\beta$ -catenina e foi estudado por imunohistoquímica em amostras de tecido endometrial hiperplásico e de carcinoma do endométrio, sendo a sua marcação positiva nas áreas de carcinoma (Wang *et al*, 2009). O estudo do CD24 e do CD44 em tumorosferas foi descrito noutros tipos de cancro. O CD44 foi expresso em esferas de cancro do ovário e do cólon e numa linha celular de cancro da próstata (Hubbard & Gargett, 2010). No cancro da mama, a população CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> representou cerca de 50% da população de esferas comparando com apenas 2% da linha celular MCF-7 em monocamada (Karimi-Busheri *et al*, 2010). No entanto outros autores não verificaram diferenças na expressão CD24/CD44 nas linhas celulares S2 e S2N entre a cultura em monocamada e nas esferas (Lehmann *et al*,

2012). A comparação do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> entre as condições aderentes e as culturas em suspensão das linhas celulares de cancro da mama MCF-7, MDAMB468 e MDAMB231 demonstrou um aumento de CD24<sup>+</sup> nas esferas de MCF-7, redução de CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> na suspensão da linha MDAMB468 e diminuição de CD44 na suspensão da linha MDAMB231, tendo os autores concluído por uma expressão variável de marcadores de CSC (Liu *et al*, 2014b). Na linha celular de cancro do pâncreas PANC-1 foi descrita uma população CD24<sup>+</sup> em 8,5% das células aderentes e 32% nas esferas, com um aumento da tripla marcação positiva CD24<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup> e antígeno epitelial específico (ESA, do inglês *epithelial specific antigen*)<sup>+</sup> nas esferas, apesar de estes dois últimos marcadores não terem mostrado diferenças significativas comparando as esferas com a população aderente (Gaviraghi *et al*, 2010). Na linha celular de carcinoma hepatocelular SK-HEP1, as células CD44<sup>+</sup> também foram maiores na população de esferas comparando com a população de origem (Hashimoto *et al*, 2014). Na linha celular de cancro da próstata DU145, o estudo do CD44, do CD24 e da integrina  $\alpha 2\beta 1$  por microscopia de fluorescência revelou positividade para a maioria das esferas derivadas desta linha (Rybak *et al*, 2011). A literatura reflete alguma variabilidade da expressão do CD24 e do CD44 tanto nas linhas celulares e como na população de esferas em vários tipos de tumores. O nosso trabalho revelou uma expressão superior do CD44 na população de esferas, particularmente nas esferas ESI e ausência de diferenças na população de derivadas aderentes G1, G2 e G3, concordante com a descrição existente de perda da expressão de CD44 com a diferenciação (Hubbard & Gargett, 2010).

Em relação à ALDH, o nosso estudo experimental mostrou um aumento da sua expressão nas populações de esferas ESI, ES2 e ES3 verificando-se aumento da expressão de ALDH em relação à linha celular de adenocarcinoma do endométrio que as originou. Este dado salienta a presença de CSC na população celular das esferas e a ALDH como um potencial marcador. Na população de derivadas aderentes G1, G2 e G3 não se observaram diferenças nesta expressão em relação à linha celular parental ECC-1. Estudos anteriores sobre CSC no mieloma múltiplo, na leucemia mieloide aguda e nos tumores sólidos como o cancro cerebral, o pulmonar, o mamário e o do ovário mostraram níveis elevados de ALDH sugerindo que a atividade ALDH pode constituir um marcador comum da população de células estaminais normais e malignas (Tirino *et al*, 2013). A metodologia utilizada habitualmente para avaliar a atividade da ALDH, o ensaio aldefluor™, pode diferir em vários tecidos e tipos de cancro. A identificação de isoformas específicas pode também ter implicações prognósticas, não estando ainda estabelecidas todas as funcionalidades das diversas isoformas (Marcato *et al*, 2011). A expressão da ALDH é variável de acordo com a linha celular de carcinoma do endométrio, tendo-se verificado que a sua atividade em linhas celulares de adenocarcinoma endometriode está aumentada, nomeadamente na HEC-1, na HEC-1A, na HEC-108, na HEC-116, na HEC-6, na HEC-88nu e na SNG-M enquanto as linhas HEC-251 e SNG-II não apresentam atividade. A população com atividade ALDH aumentada apresentou capacidade de autorrenovação e maior capacidade de formação de colónias em

relação à população sem atividade ALDH (Rahadiani *et al*, 2011). A linha celular de carcinoma do endométrio Ishikawa apresentou atividade ALDH e a população positiva representou 0,51% (Götte *et al*, 2011). A expressão positiva para ALDH (>10%) foi descrita em 40,8% dos tumores do endométrio e correlacionou-se com o prognóstico desfavorável (Rahadiani *et al*, 2011).

Estudos da expressão de ALDH em populações de esferas foram descritos noutros tipos de cancro. Em cancros do ovário foi demonstrada uma maior eficiência de formação de esferas na população ALDH<sup>+</sup> e CD133<sup>+</sup>, mantendo esta capacidade durante mais de 2 meses. A expressão de ALDH e CD133 foi superior nas células das esferas (Kryczek *et al*, 2012). A população ALDH<sup>+</sup> e de CD133<sup>+</sup> foi mais associado com a população de esferas da linha celular ACI-23 de carcinoma do ovário do que com a linha celular de origem (House *et al*, 2015). Ainda no cancro do ovário, na linha celular SKOV3 a expressão de ALDH avaliada por western blot estava aumentada na população de esferas (Ning *et al*, 2014). Igualmente no cancro colorretal, tanto na linha celular SW480 como em células isoladas de tumores primários, a população em que se verificou aumento da atividade ALDH demonstrou maior capacidade de formação de esferas na linha celular de cancro colorretal SW480 e em células isoladas de tumores primários (Fan *et al*, 2014). Noutro tipo de tumores como o neuroblastoma, a atividade da ALDH foi maior na população de esferas (Hartomo *et al*, 2014). Estes estudos apresentam dados semelhantes a respeito da presença do marcador de CSC, a ALDH aumentada nas células das esferas, assim como verificado no nosso trabalho experimental com células tumorais do endométrio. Esta expressão diminuiu com a diferenciação em condições aderentes.

O cancro do endométrio é um tumor hormonodependente, destacando-se o efeito dos estrogénios sem oposição progestativa como o principal fator de risco. Os recetores de estrogénio apresentam a isoforma  $\alpha$  e a isoforma  $\beta$ , que têm padrão de expressão distinto nos tecidos e que variam durante a proliferação e a diferenciação celulares (Kreizman-Shefer *et al*, 2014). O recetor de estrogénio  $\alpha$  é necessário para o desenvolvimento básico de tecidos sensíveis aos estrogénios e o recetor de estrogénio  $\beta$  é necessário para a organização e para a adesão das células epiteliais e, portanto, para a diferenciação morfológica do tecido e para a sua maturação funcional (Kreizman-Shefer *et al*, 2014). O recetor de estrogénio  $\alpha$  tem uma expressão reduzida no tumor endometrial em relação ao endométrio não tumoral e o componente estromal apresenta menor expressão que o componente epitelial (Kreizman-Shefer *et al*, 2014).

Os resultados obtidos através do presente estudo experimental mostraram que a expressão do recetor de estrogénio  $\alpha$  na população de esferas está significativamente reduzida em relação à linha celular ECC1 e às populações derivadas aderentes, G1, G2 e G3. No que respeita à população com propriedades de CSC, pode fazer-se a analogia com o processo de diferenciação endometrial normal. Deste modo, na fase inicial de reparação endometrial as células epiteliais não expressam recetor de estrogénio  $\alpha$ , que só é expresso durante a proliferação numa fase de diferenciação das células epiteliais glandulares e, em menor extensão,



nas células estromais (Gargett *et al*, 2008). A perda de recetores de estrogénios  $\alpha$  na população de esferas deste estudo experimental, foi acompanhada por um aumento da ALDH, como já foi anteriormente descrito e foi corroborado por outros autores que também verificaram que a expressão dos recetores de estrogénio foi negativa nas células tumorais do endométrio com expressão de ALDH (Rahadiani *et al*, 2011). A população de esferas representa um grupo celular possivelmente mais indiferenciado em que, no nosso estudo, se verificou a diminuição da expressão da isoforma  $\alpha$  associada ao aumento da expressão de ALDH. A perda do recetor de estrogénio  $\alpha$  tem sido associada com a agressividade dos tumores do endométrio e com a EMT, características das CSC (Wik *et al*, 2013). Para além deste aspeto, a perda dos recetores de estrogénio  $\alpha$  sugere alterações moleculares no tumor com desregulação de vias de sinalização. A perda da isoforma  $\alpha$  está associada a inativação do PTEN por mutação, metilação de novo do gene do recetor de estrogénio  $\alpha$  e metilação aberrante de ilhas CpG, que são regiões de DNA em que o nucleótido citosina ocorre ao lado de um nucleótido guanina na sequência linear de bases (Kreizman-Shefer *et al*, 2014).

Noutro tipo de tumor hormonodependente, como é o caso do cancro da mama, a população com propriedades de CSC também apresentou uma diminuição da expressão dos recetores de estrogénio. As células MCF-7 foram submetidas a sete passagens seriadas de cultura em esferas e de cultura em condições aderentes. Os tumores xenotransplantados destas populações apresentaram uma supressão de genes epiteliais, incluindo o recetor de estrogénio  $\alpha$  compatível com um fenótipo menos diferenciado (Guttilla *et al*, 2012). A expressão dos recetores de estrogénio não foram observadas em mamosferas de tumores primários da mama, apesar de serem originalmente tumores luminais com expressão positiva destes recetores (Ito *et al*, 2014). A perda dos recetores de estrogénio já tinha sido descrita em células mamárias normais em relação às células progenitoras (Clayton *et al*, 2004). Deste modo, a perda destes recetores pode constituir a tradução de um fenótipo mais indiferenciado e, provavelmente, com capacidade de EMT em tumores hormonodependentes.

No nosso estudo, a expressão do recetor de estrogénio  $\beta$  nas populações de esferas (ES1, ES2 e ES3) e nas derivadas aderentes (G1, G2 e G3) não apresentou diferenças significativas em comparação com a linha celular parental ECC-1. Relativamente ao cancro do endométrio, foi descrito que o padrão de expressão do recetor de estrogénio  $\beta$  e de estrogénio  $\alpha$  é semelhante entre o endométrio normal e o cancro do endométrio (Knapp *et al*, 2013; Hapangama *et al*, 2014). O recetor de estrogénio  $\beta$  pode ter ações opostas às do recetor de estrogénio  $\alpha$  com o mesmo gene promotor em resposta ao estradiol. Este efeito inibidor do recetor de estrogénio  $\beta$  na atividade do recetor de estrogénio  $\alpha$  pode ser exercido por alteração do recrutamento de fatores de transcrição chave e pelo aumento da degradação da isoforma  $\alpha$  (Hapangama *et al*, 2014). Tem sido descrito um papel contraditório do recetor de estrogénio  $\beta$ , como supressor do efeito dos recetores de estrogénios em tecido normal e, por outro lado, como promotor desse efeito no tecido tumoral, na dependência da presença de outros recetores hormonais (Hapangama *et al*, 2014; Kreizman-

Shefer *et al*, 2014). Deste modo, na presença de recetores esteróides como o recetor de estrogénio  $\alpha$ , pode apresentar um efeito supressor da proliferação e na ausência daqueles ter um papel promotor. Transpondo este mecanismo para o fenótipo dos recetores de estrogénio encontrado neste estudo nas populações ES1, ES2 e ES3, com diminuição da isoforma  $\alpha$ , a manutenção da expressão da isoforma  $\beta$  pode ser responsável por este efeito promotor de proliferação nas células destas populações.

O recetor de progesterona A e o recetor de progesterona B estão expressos nas células epiteliais e estromais do endométrio. O recetor de progesterona B é considerado um ativador transcripcional mais forte que o recetor de progesterona A e este funciona como um inibidor da atividade transcripcional do recetor de progesterona B (Diep *et al*, 2015). Neste estudo experimental, os recetores de progesterona não apresentaram variação de expressão entre as populações de esferas e a linha celular parental ECC-1, assim como em relação às populações de derivadas aderentes. O anticorpo utilizado para a deteção dos recetores de progesterona identificou uma banda nos pesos moleculares na ordem dos 95 kDa e uma banda de cerca de 120 kDa, compatíveis com a isoforma A e com a isoforma B (Jacobsen *et al*, 2002). A expressão do recetor de progesterona A no cancro do endométrio, que é predominantemente nuclear, é semelhante à expressão dos recetores de estrogénio  $\alpha$ , já descrita. Relativamente ao recetor de progesterona B a localização é frequentemente citoplasmática e nuclear. Nas glândulas endometriais, o recetor de progesterona B tem uma expressão maior nas células estromais que nas células epiteliais (Kreizman-Shefer *et al*, 2014). Num estudo com a linha celular de carcinoma do endométrio Ishikawa, a progesterona regulou diversos genes associados com os processos de invasão e de metastização, particularmente o do *CD44*, o do *CSPG/Versica*, o da *tenascina-C*, o da *integrina  $\beta$ 1* e o da *fibronectina*. Esta expressão foi variável de acordo com a subpopulação que expressa diferentes isoformas, o recetor de progesterona A, o recetor de progesterona B ou ambos. Estes autores demonstraram que em tumores endometriais a perda de expressão de ambos os recetores de progesterona e de E-caderina está associada ao aumento de expressão de CD44 e que o bloqueio do recetor de progesterona ativou a via WNT/ $\beta$ -catenina em células endometriais estromais diferenciadas (Cloke *et al*, 2008). Noutro estudo com a linha celular Ishikawa, a progesterona inibiu a atividade WNT/ $\beta$ -catenina, e nas regiões sem expressão de recetores de progesterona verificou-se que a marcação com CD44 estava aumentada indicando que a via de sinalização WNT deixa de estar inibida (Wang *et al*, 2009). Noutros estudos com outros tumores hormonodependentes, nomeadamente no cancro da mama, não foi descrita correlação entre marcadores de CSC e a expressão de recetores hormonais. Neste sentido, em tumores da mama verificou-se a existência de correlação positiva entre as células positivas para ALDH e para CD44 e ausência de correlação com recetores de estrogénio, recetores de progesterona e também de HER2 (Cui *et al*, 2015). A população CD44<sup>+</sup> da linha celular de cancro da mama HCC1428 apresentou expressão de recetores de progesterona o que mostrou que estes podem estar presentes nas

células progenitoras CD44<sup>+</sup> de cancro da mama (Hilton *et al*, 2014). Além disso, a exposição a progesterona aumentou a proporção de células que formaram mamóferas e as células ALDH<sup>+</sup> (Hilton *et al*, 2014). A expressão de recetores de estrogénio e de recetores de progesterona em tumores e em CSC da mama apresentou grande variabilidade (Schillace *et al*, 2014). Relativamente ao cancro do endométrio, no nosso estudo as células das esferas com origem na linha celular ECC-I expressaram recetores de progesterona e não se observaram diferenças em relação às populações aderentes. Sugere-se que a presença destes recetores na população de esferas pode ativar vias de CSC, nomeadamente a via WNT/ $\beta$ -catenina, com aumento de expressão CD44.

A expressão de HER2 não foi detetada em nenhuma das populações deste estudo experimental, nem na linha parental ECC-I, nem nas populações de esferas e nas de derivadas aderentes. O *HER2* é um oncogene que foi associado a estádios mais avançados, III e IV, no cancro do endométrio (Chang *et al*, 2009). A amplificação e a sobre-expressão HER2 são mais frequentemente observadas nos tumores do tipo II que nos endometrioides (Dedes *et al*, 2011). A sobre-expressão HER2 correlacionou-se com o estágio, o grau e a histologia com maiores níveis de amplificação nos carcinomas serosos (Montejo *et al*, 2009). A utilização da terapêutica dirigida com trastuzumab na amplificação HER2 não demonstrou os resultados esperados no cancro do endométrio (Montejo *et al*, 2009). A ausência de deteção de HER2 na linha celular de adenocarcinoma do endométrio ECC-I é consistente com as descrições de frequências reduzidas desta expressão em tumores do endométrio do tipo I (Dedes *et al*, 2011). Estudos com outro tipo de tumores revelaram que o HER2 regula as células estaminais/progenitoras mamárias com capacidade de invasão e tumorigénicas (Korkaya *et al*, 2008; Angeloni *et al*, 2014). A sobre-expressão de HER2 aumentou a capacidade de formação de mamóferas na população com atividade da ALDH (Korkaya *et al*, 2008). À semelhança do que já foi descrito para os recetores hormonais, não se verificou correlação da expressão HER2 dos tumores com a frequência da população ALDH<sup>high</sup>/CD44<sup>+</sup> (Cui *et al*, 2015). No cancro da mama foi descrito que a sobre-expressão HER2 é controlada em parte pela via NOTCH (Angeloni *et al*, 2014). A regulação do HER2 das CSC da mama não é exclusiva dos tumores que sobre-expressam HER2 (Korkaya & Wicha, 2013). A regulação de CSC pelo HER2 na ausência de amplificação do gene foi proposto também para o cancro da próstata refratário ao tratamento hormonal e noutros tumores sólidos como da bexiga e do ovário (Korkaya & Wicha, 2013). Apesar de alguns trabalhos sugerirem que mesmo sem sobre-expressão o HER2, este influencia vias de regulação de CSC, este não deverá ser o caso na população de CSC estudadas no nosso trabalho. O HER2 nestas populações não foi detetado, não se definindo portanto um potencial papel na população de esferas e sua diferenciação em condições aderentes.

A expressão de P53 diminuiu significativamente nas populações de esferas ES1, ES2 e ES3 em relação à linha celular de origem ECC-I e as populações derivadas aderentes mantiveram o mesmo padrão da linha

parental ECC-I. A sobre-expressão da P53 é característica de tumores não endometrioides e está associada a redução da sobrevivência, à semelhança do que acontece em outro tipo de tumores. A mutação do gene *TP53* está descrita em 5-20% dos tumores endometrioides (Werner & Salvesen, 2014). Os tumores com alterações da P53 apresentaram um comportamento mais agressivo e as doentes manifestaram menor sobrevivência livre de doença (Lee *et al*, 2010a). Estão descritas algumas mutações da P53, como a mutação ou alelotipo Arg/Pro do codão 72, associadas com prognóstico desfavorável no cancro do endométrio (Gadducci *et al*, 2011). A perda de heterozigotia do *TP53* foi significativamente maior em tumores pouco diferenciados em comparação com os bem e os moderadamente diferenciados e, este fenótipo não foi associado a outros parâmetros clínico-patológicos. A perda de alelos aumenta em tumores em estádios avançados indicando uma associação significativa entre perda de heterozigotia e a progressão da doença (Semczuk *et al*, 2010). A proteína P53 tem 3 domínios, um domínio de transativação N-terminal, um domínio central de ligação ao DNA e um domínio de homo-oligomerização C-terminal que são necessários para a adequada função que envolve sobretudo a reparação do dano de DNA. A maioria das alterações genéticas do gene *TP53* ocorrem no domínio de ligação ao DNA (Semczuk *et al*, 2010). A relação entre alterações do gene *TP53* e a sobre-expressão de P53 no cancro do endométrio não está claramente definida, o que pode ser explicado pela diversidade de critérios e das técnicas de deteção. No cancro, a função supressora tumoral da P53 é prejudicada por mutação do gene *TP53* ou pela expressão da proteína P53 mutada. Em alguns cancros, mesmo que a forma selvagem esteja ativa, a sua função está diminuída pelo seu inibidor celular primário, o MDM2 (do inglês, *murine double minute 2*) (Gadepalli *et al*, 2014). O MDM2 é um substrato da cinase ATM (do inglês, *ataxia telangiectasia mutated*) que interage positivamente com mRNA da P53. Quando a atividade ATM cessa, a MDM2 tem um efeito regulador negativo e suprime a atividade da proteína P53, mediando a sua degradação (Gajjar *et al*, 2012).

A P53 tem uma função central na regulação da homeostase de células estaminais. Na reprogramação de células diferenciadas, a inibição ou a perda da P53 está associada à indução de pluripotência (Gadepalli *et al*, 2014; Insinga *et al*, 2014). De acordo com estas funções de supressão tumoral, de regulação de propriedades estaminais e de diferenciação, a P53 também regula genes de CSC de forma direta e indireta (Rivlin *et al*, 2014). Em tumores da mama e do pulmão, a P53 reduziu a expressão de CD44 por inibição da transcrição, o que se traduziu por diminuição da capacidade tumorigénica (Rivlin *et al*, 2014). Deste modo, a diminuição da P53 na população de esferas da linha celular de adenocarcinoma endometrioides utilizada no nosso trabalho foi acompanhada por um aumento da expressão de CD44 o que se correlaciona com perda da repressão da P53.

As populações de esferas apresentaram uma expressão do recetor de estrogénio  $\alpha$  inferior à população ECC1, à semelhança da expressão de P53. A interação do recetor de estrogénios com a P53 foi descrita em

masoferas, salientando a importância da P53 selvagem na resposta à terapêutica com antagonistas dos estrogénios (Konduri *et al*, 2010). A via do recetor de estrogénios está implicada na regulação da P53, sendo atribuída a este recetor uma função protetora da P53. O MDM2 está presente no complexo P53-recetor de estrogénio  $\alpha$  mas tem uma capacidade menor de subregular a P53 na presença de elevada quantidade do recetor hormonal (Berger *et al*, 2013). Na diminuição do recetor de estrogénio  $\alpha$  a P53 fica mais vulnerável à degradação, o que pode justificar a subexpressão destas duas proteínas na população de esferas deste estudo. Ao contrário do recetor de estrogénio  $\alpha$ , foi descrito que a isoforma  $\beta$  não tem efeito na expressão de P53 (Berger *et al*, 2013). À semelhança desta descrição, nas populações de esferas ES1, ES2 e ES3, a expressão da isoforma  $\beta$  do recetor de estrogénio não parece ter influência na expressão de P53 uma vez que não se observou uma modificação de expressão deste recetor nas populações estudadas.

A expressão de  $\beta$ -catenina nas populações de esferas apresentou tendencialmente uma expressão superior em relação à população ECC-I e à população de derivadas aderentes, apesar de não ter significado estatístico. A  $\beta$ -catenina é a molécula de ligação da E-caderina, a principal caderina das células epiteliais, que representam uma família de moléculas de adesão intercelular (Singh *et al*, 2011). O domínio citoplasmático da caderina liga-se à catenina, que apresenta 3 subtipos, o subtipo  $\alpha$ , o subtipo  $\beta$  e o subtipo  $\gamma$ . A redução de E-caderina e suas proteínas citoplasmáticas é apontada como determinante na diferenciação de adenocarcinomas endometriais (Singh *et al*, 2011). A mutação no oncogene da  $\beta$ -catenina, *CTNNB1*, foi descrita nos tumores endometrioides (Wang *et al*, 2010; Gadducci *et al*, 2011). A mutação da  $\beta$ -catenina está presente na sequência hiperplasia/carcinoma, e foi significativamente associada a tumores bem diferenciados e a ausência de invasão ganglionar, ou seja, tumores com menor agressividade (Gadducci *et al*, 2011). A via de regulação WNT/ $\beta$ -catenina está implicada na regulação da proliferação e da diferenciação endometrial e está ativada no carcinoma do endométrio (Wang *et al*, 2010). Alguns dos alvos a jusante da regulação de hormonas sexuais e de componentes da via WNT/ $\beta$ -catenina estão implicados na carcinogénese do endométrio, como é o caso do *FOXO1* e do *CDH1* (E-caderina) que se encontram diminuídos no cancro do endométrio e são influenciados pela progesterona (Wang *et al*, 2010). De realçar que a progesterona é um forte inibidor da via WNT/ $\beta$ -catenina (Wang *et al*, 2010). O *survivin* (BIRC5), outro gene regulado por alvos dos recetores hormonais, é expresso em níveis elevados no cancro do endométrio e é sobreexpressado pelo estradiol. Os recetores de estrogénio  $\alpha$  estão associados a fatores de crescimento importantes em vias como a do PI3K e, indiretamente, com a via WNT canónica (Wang *et al*, 2010). A diminuição da expressão de recetores de estrogénios- $\alpha$  nas esferas do endométrio, verificada no nosso estudo, pode ter implicações na ativação da via PI3K/AKT/mTOR e da via WNT que regulam a proliferação e a sobrevivência celulares.

A EMT é um processo em que as células epiteliais para além de perderem a polaridade e o contacto

célula a célula adquirem capacidade de migração. Simultaneamente ocorre remodelação do citoesqueleto e as células entram num programa de expressão de genes tipo mesenquimatosos (Mirantes *et al*, 2013). Este processo está associado à invasão e à metastização. A repressão das E-caderinas origina EMT em diversos tumores e estão descritos vários fatores transcriptionais, que originam a subregulação da E-caderina, em especial a via WNT/ $\beta$ -catenina (Mirantes *et al*, 2013). Num tumor primário, uma parte da população estaminal adquire EMT e começa a degradar a matriz envolvente, permitindo a disseminação das CSC que resistem à anoikis na corrente sanguínea e se adaptam noutro ambiente para formar metástases (Mirantes *et al*, 2013). As CSC são a única população celular que apresenta esta plasticidade, capaz de originar metastização. Em estudos com CSC de carcinoma da nasofaringe, a inibição da  $\beta$ -catenina diminuiu a expressão de genes de CSC e de EMT (Cheng *et al*, 2013b). Estudos realizados com esferas obtidas a partir de cancro do pulmão mostraram que a atividade da  $\beta$ -catenina aumentou (Chung *et al*, 2015). Na linha celular de cancro da mama MDA-MB-231 os níveis de RNA da  $\beta$ -catenina foram maiores na população ALDH<sup>high</sup>/CD44<sup>+</sup> (Cui *et al*, 2015). Nas populações de esferas ES1, ES2 e ES3 do nosso estudo, a expressão de  $\beta$ -catenina teve uma expressão média entre 1,20 a 1,25, normalizado à linha celular parental ECC-1, que traduz um aumento de 20% a 15% o que pode indiciar a ativação da via WNT/ $\beta$ -catenina na população de CSC do endométrio. Esta expressão correlacionou-se na população de esferas com o aumento da expressão de ALDH e com o aumento da expressão de CD44.

Com o objetivo de estudar a captação diferencial da glicose pelas células das diversas populações deste estudo, foram realizados estudos de captação de <sup>18</sup>F-FDG pelas células da linha celular ECC-1, pelas células das populações ES1, ES2 e ES3 e pelas células das populações G1, G2 e G3. Deste modo pretendeu-se investigar um possível comportamento diferencial considerando as propriedades estaminais. Este estudo revelou que a captação de <sup>18</sup>F-FDG foi superior nas populações de esferas em relação à linha celular parental e às populações derivadas aderentes. Na prática clínica, o traçador mais utilizado na PET é a <sup>18</sup>F-FDG, um análogo da glicose, que avalia a captação da glicose pela célula (Mertens *et al*, 2012). A sua entrada nas células é realizada pelos transportadores ativos de glicose, em especial o GLUT-1 e o GLUT-3 e é fosforilada pelas hexocinases e glicocinases (Ong *et al*, 2008). A 2-[<sup>18</sup>F]flúor-2-desoxi-D-glicose-6-fosfato (FDG-6P) fica retida na célula imediatamente após fosforilação uma vez que não pode ser isomerizada a <sup>18</sup>F-frutose-6-fosfato, dado que é um substrato pouco utilizado pela glicose-6-fosfato desidrogenase (Ong *et al*, 2008). As células tumorais apresentam um aumento da expressão de transportadores da glicose, especialmente do GLUT-1 e do GLUT-3 assim como o aumento da atividade de hexocinase, especialmente a hexocinase II, o que contribui para o aumento da captação e da fosforilação da <sup>18</sup>F-FDG (Ong *et al*, 2008).

A PET com <sup>18</sup>F-FDG é atualmente utilizada na prática clínica no cancro do endométrio, no estadiamento clínico da extensão da doença, nomeadamente no que se refere a doença ganglionar (Chang *et al*, 2012). Na

avaliação pré-operatória, a PET com este radiotraçador pode ter utilidade na estratificação de doentes de alto risco. Foi descrita a utilização de alguns parâmetros nesta avaliação como o valor padronizado de captação, habitualmente designada por SUV, em especial o SUV máximo, assim como o volume metabólico do tumor (Kitajima *et al*, 2015). A PET está também descrita para avaliação da resposta à terapêutica, para a vigilância e para a avaliação da recorrência (Lai *et al*, 2014).

Vários mecanismos podem justificar o aumento da captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG em células com fenótipo CSC, conforme se constatou neste trabalho experimental considerando as populações de ES1, ES2 e ES3 em comparação com a linha celular parental ECC-1. Apesar do controlo metabólico sobre a taxa de glicólise ser dependente de diversos passos na via glicolítica, muitos estudos em células neoplásicas apoiam a hipótese do controlo sobre o fluxo glicolítico residir primariamente no transporte transcelular e na fosforilação (Gatenby and Gillies 2004). O fenótipo de CSC foi associado ao metabolismo da glicose em diversas vertentes da via glicolítica. A expressão da enzima frutose-1,6-bifosfatase foi associada a redução da percentagem de células  $\text{CD44}^{\text{high}}/\text{CD24}^{\text{low}}/\text{EpCAM}^+$  no cancro da mama, sucedendo o inverso com o silenciamento da mesma enzima. A perda desta enzima induziu a glicólise e resultou num aumento da captação de glicose, biossíntese de macromoléculas e na manutenção da produção de ATP. Por outro lado, a perda de frutose-1,6-bifosfatase foi associada a uma reprogramação metabólica que incluiu a diminuição do consumo de oxigénio e a produção de ROS relacionadas com a inibição da atividade mitocondrial. Estas alterações foram associadas ao aumento de marcadores relacionados com o fenótipo EMT mediado por SNAIL, e consideradas um evento crítico no processo de CSC (Dong *et al*, 2013).

Em relação aos transportadores da glicose a sua sobre-regulação foi associada a carcinogénese, pelo menos nos cancros do esófago, gástrico, da mama e colorretal (Gatenby & Gillies, 2004). O transportador GLUT-1 é fundamental para a manutenção do fenótipo das CSC nomeadamente, nas de origem pancreática, ovárica e de glioblastoma, uma vez que a inibição farmacológica ou genética diminuiu a expressão de marcadores de células estaminais, e originou a indução de expressão de marcadores de diferenciação e a perda da capacidade de formação de esferas (Shibuya *et al*, 2015).

Dos nossos resultados, o aumento da captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG pelas populações ES1, ES2 e ES3 pode também estar relacionado com a diminuição da expressão de P53 em comparação com a linha celular parental e com as populações de derivadas aderentes. Este aumento de captação foi anteriormente correlacionado com expressão anormal de P53 em tumores de mau prognóstico (Crippa *et al*, 1998), tendo mesmo sido associada a expressão diminuída de P53 com captações aumentadas de  $^{18}\text{F}$ -FDG (Gatenby & Gillies, 2004; Smith *et al*, 2006; Smith, 2010). A hexocinase II, enzima que fosforila preferencialmente a glicose em glicose-6-fosfato, é ativada pela mutação da P53 ou pela desmetilação do seu promotor (Gatenby & Gillies, 2004). Assim, a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG está dependente da função da P53, que na forma selvagem reprime a

expressão do gene GLUT-1 e GLUT-4 (Mathupala *et al*, 1997). Nas esferas obtidas a partir da linha celular de adenocarcinoma do endométrio ECC-1 deste estudo, o aumento de captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG e a ativação do primeiro passo da via glicolítica pode também ser relacionado com o aumento, embora sem significado estatístico, observado na expressão de  $\beta$ -catenina, proteína associada a EMT, a sobre-expressão de CD44 e a subexpressão de P53.

A glicólise é uma via metabólica de obtenção de ATP e NADH que resulta do catabolismo da glicose em duas moléculas de piruvato. Em condições aeróbicas o piruvato e o NADH são produzidos por glicólise e depois importados para a mitocôndria onde entram no ciclo de Krebs para obter ATP através da fosforilação oxidativa. Em condições de baixas pressões parciais de oxigênio, o piruvato pode ser convertido em lactato e regenera a nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ) necessária para a glicólise (Schieber & Chandel, 2013). O interesse no estudo do metabolismo da glicose nas células tumorais tem crescido com o conhecimento da preferência pela via glicolítica, mesmo em condições aeróbicas. O efeito de Warburg define essa dependência do cancro pela glicólise fermentativa. Este efeito é necessário para as células tumorais resistirem ao stresse oxidativo e se poderem adaptar a condições de hipoxia. Esta modificação metabólica pode ser um evento inicial ou tardio ou ser uma disfunção geneticamente determinada ou induzida por modificações metabólicas (Morfouace *et al*, 2012). A elevada taxa de glicólise de células em proliferação apresenta vantagens pois, por um lado permite a produção de ATP a partir da glicose e, apesar da quantidade de ATP obtida por glicólise ser baixa, o fluxo glicolítico é suficientemente elevado para produzir uma concentração de ATP que excede a da fosforilação oxidativa. Por outro lado obtêm-se os intermediários da degradação da glicose necessários a outras vias como a produção de ribose para os ácidos nucleicos, de glicerol e de citrato para a síntese de lípidos, de aminoácidos não essenciais e de NADPH para os múltiplos processos biossintéticos. Deste modo, o efeito Warburg apresenta benefícios bioenergéticos e também de biossíntese (Gatenby & Gillies, 2004).

Os estudos de espectroscopia por RMN permitiram avaliar em detalhe o destino intracelular da glicose para além da sua captação, processo avaliado nos estudos com  $^{18}\text{F}$ -FDG. Caracterizou-se assim, o perfil metabólico diferencial das células da linha celular ECC-1, das esferas ESI e das derivadas aderentes GI. Esta metodologia avalia a incorporação da marcação proveniente da  $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glicose em diferentes metabolitos celulares e assume que as células não distinguem entre a molécula de glicose que possui carbonos-12 e a que possui carbonos-13, o que permite desta forma caracterizar o metabolismo celular em consequência da  $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glicose adicionada às diferentes populações celulares (Jeffrey *et al*, 1991).

A produção de lactato, avaliada pela concentração  $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ lactato foi menor ao longo das 24 horas para ESI em relação às ECC-1 e às GI, o que indica a utilização preferencial da glicólise fermentativa pelas ECC-1 e pelas GI. Por outro lado o estado redox no citosol, inferido pela relação  $\text{C3\_Lac}/\text{C3\_Ala}$ , foi menor nas células ESI em comparação com as ECC-1 e com as GI, apesar de esta diminuição não ter significância



estatística. O acoplamento da via glicolítica com o ciclo de Krebs foi maior para a população ESI, sugerindo a entrada do piruvato no ciclo de Krebs, uma via energética que possibilita a completa oxidação.

O fenótipo metabólico das células tumorais sem propriedades de CSC é considerado sobretudo glicolítico uma vez que a célula apresenta elevada proliferação. Por outro lado, foi considerado em alguns estudos que as CSC apresentam um metabolismo essencialmente fosforilativo, uma vez que as CSC foram conotadas como uma população quiescente em termos proliferativos (Jang *et al*, 2015). Recentemente foi demonstrado que as CSC de diversos tumores sólidos têm alterações significativas do seu metabolismo energético. As CSC de pâncreas demonstraram aumento da atividade mitocondrial na cadeia de transferência de elétrões em comparação com as restantes células e a redução da fosforilação oxidativa inibiu da formação de tumor (Jang *et al*, 2015).

Nas células estaminais embrionárias a glicólise anaeróbica é o perfil metabólico mais comum, associado a um aumento de atividade da via das pentoses fosfato (Jang *et al*, 2015). Não está claramente definido se o metabolismo das CSC é semelhante ao das células estaminais normais (Shen *et al*, 2015). Existem alguns trabalhos que associam o metabolismo das CSC à glicólise fermentativa em detrimento da fosforilação oxidativa mitocondrial. A atividade da cadeia respiratória mitocondrial está diminuída nas CSC de gliomas e a inibição da glicólise pode criar uma crise energética que prejudica a sobrevivência desta população (Yuan *et al*, 2013). Num estudo com a linha celular de osteossarcoma 3AB-OS as CSC apresentaram um metabolismo energético semelhante ao das células estaminais normais, com redução da atividade mitocondrial e maior sensibilidade à inibição da glicólise. Esta linha mostrou maior expressão de lactato desidrogenase e maior acumulação de lactato no meio de cultura (Palorini *et al*, 2014) o que foi comprovado noutro trabalho com maior produção de lactato pelas CSC da mama ALDH<sup>high</sup> (Cioce *et al*, 2014). As células com propriedades estaminais originadas de glioblastoma foram sensíveis à inibição da glicólise que resultou em menor formação de tumores *in vivo*, o que sugere a glicólise como fonte energética preferencial destas células (Zhou *et al*, 2011a). No entanto, os estudos mais recentes apontam para um estado metabólico sobretudo relacionado com a fosforilação oxidativa, ao contrário do efeito Warburg descrito em muitos tumores (Jang *et al*, 2015). De fato, estudos realizados por Vlashi e colaboradores em células estaminais com origem em gliomas mostraram que o suprimento energético é mantido sobretudo à custa de fosforilação oxidativa (Vlashi *et al*, 2011). Também em CSC de mama foi demonstrada uma maior dependência da fosforilação oxidativa, com menor produção de lactato que as células progenitoras diferenciadas. A população de CSC apresentou maior número de mitocôndrias, maior atividade mitocondrial, maior produção de ATP, o que traduz um estado mais energético. Porém estas CSC também consumiram mais glicose que as células diferenciadas (Vlashi *et al*, 2014). Num outro estudo a população de CSC de cancro do ovário foi associada com a fosforilação oxidativa e maior entrada do piruvato no ciclo de Krebs. As CSC resistiram à privação de

glicose, mantendo o fenótipo de CSC e o perfil de fosforilação oxidativa, o que sugere também a resistência às terapêuticas antiangiogénicas (Pastò *et al*, 2014). À semelhança destes dados, os resultados obtidos neste trabalho experimental mostraram maior captação da glicose na população com propriedades de CSC do endométrio em relação à linha celular de origem e à população de derivadas aderente. Na população ESI, o piruvato resultante da glicólise é dirigido para a mitocôndria, tal como indicado pela diminuição do lactato e o aumento da relação C3\_Lac/C4\_Glut. O estado redox do citosol, dado pela relação C3\_Lac/C3\_Ala, foi menor na população ESI, o que corresponde a um estado oxidado do citosol. Assim, sugere-se que no cancro do endométrio, as células com propriedades de CSC apresentam preferencialmente fosforilação oxidativa e manifestam uma elevada afeição por glicose comparando com a linha celular parental e com a população GI, o que pode constituir uma alteração de metabolismo vantajosa em relação ao efeito Warburg descrito para as células tumorais em proliferação.

Relativamente ao *turnover* do ciclo de Krebs, não se observaram diferenças entre as populações, de acordo com a razão C4Q/C4D45 no espetro de RMN de carbono do glutamato. O crescimento celular em condições desfavoráveis está associado a adaptações metabólicas para permitir o crescimento e a proliferação, neste sentido a anaplerose é primordial (DeBerardinis *et al*, 2008). Este processo pode promover o crescimento de células indiferenciadas com adaptações do metabolismo intermediário que é fundamental nos processos de proliferação e de diferenciação (Voza *et al*, 2014). A relação C3\_Glut/C4\_Glut não apresentou diferenças entre as populações o que indica proliferação semelhante entre as populações.

Na perspetiva translacional, o conhecimento do comportamento bioenergético das células tumorais e o estabelecimento de um perfil distinto dentro da heterogeneidade tumoral pode ser uma informação indispensável ao desenvolvimento de terapêuticas dirigidas que permitam a inibição de vias oncogénicas para erradicação das CSC.

A proteómica permite a análise em larga escala de proteínas, o que contribui para a compreensão das interações proteicas na era da pós-genómica. Em oncologia, esta metodologia permite um esclarecimento das vias de regulação e o envolvimento de proteínas específicas na génese do cancro. Nos últimos anos assistiu-se à identificação massiva de biomarcadores, para a qual estas metodologias contribuíram. Estes biomarcadores podem ter uma extensa aplicação, nomeadamente para a deteção da presença de doença, a monitorização da doença, a monitorização da estabilidade e da progressão, a monitorização da resposta à terapêutica e a avaliação de fármacos dirigidos a um alvo particular de uma via molecular (Wong *et al*, 2009). A eletroforese bidimensional é uma das técnicas principais para separação de proteínas e é um método com acuidade para a quantificação relativa de proteínas, permitindo comparação intra e inter-gel. Assim, é possível identificar várias centenas de proteínas que se dispõem num único gel, detalhando uma visão direta e global de uma amostra de proteoma (Issaq & Veenstra, 2008). Esta metodologia pode ser

aplicada a todo o tipo de amostras contendo proteínas, nomeadamente a extratos derivados de tecidos, de células e de organelos, a líquidos biológicos como o plasma, o soro, a urina, o líquido cefalo-raquídeo, a saliva, as lágrimas, o muco nasal, o leite, o líquido amniótico e o esperma. Também se podem avaliar amostras de organismos vegetais, sementes e plantas (Carrette *et al*, 2006). Uma vez detetadas, as proteínas individualizadas do *spot* podem ser identificadas por espetrometria de massa. A imagem por espetrometria de massa MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry*) tem permitido a identificação de um novo perfil proteómico que aplicado à prática clínica pode ser diretamente avaliado em tecidos de doentes e correlacionado com diversos parâmetros clínico-patológicos (Wong *et al*, 2009).

A expressão diferencial do perfil proteómico através de eletroforese 2D em células com propriedades estaminais não foi anteriormente reportada no cancro do endométrio. Neste trabalho experimental, observou-se a expressão diferencial de *spots* na população de esferas e nas derivadas aderentes em relação à linha celular de origem ECC-1. Alguns *spots* identificados apresentam variação significativa, que no futuro poderão constituir uma perspetiva de identificação proteica. A sobre-expressão de *spots* foi descrita em 30,95% para a população de esferas ESI e numa percentagem menor, de 24,84% para a população de derivadas aderentes GI. Também a subexpressão de *spots* foi superior na população ESI, com valores de 32,14%, em relação ao observado na população GI, valores de 26,71%. Particularmente em relação aos *spots* com expressão semelhante, esta foi maior na população GI, atingindo valores de quase 50%. Estes dados apontam para uma expressão com mais diferenças na população ESI em relação à linha celular ECC-1. A população GI apresentou um perfil com menos diferenças em relação à linha celular ECC-1. Estes dados poderão corresponder a uma expressão diferencial de diversas proteínas, o que poderá contribuir para uma implementação de conhecimento de biomarcadores de CSC no cancro do endométrio.

Os perfis proteómicos foram descritos em outros estudos no âmbito do cancro do endométrio tendo mesmo já sido descritas algumas proteínas com potencial de biomarcadores. O diagnóstico precoce no cancro do endométrio é uma questão fundamental para a sobrevivência uma vez que em estádios iniciais é possível controlar a doença. No carcinoma do endométrio foram descritas proteínas com potencial de biomarcadores. Um estudo com cromatografia líquida multidimensional e espetrometria de massa foram discriminadas proteínas em tecido endometrial benigno e maligno, no entanto nenhuma destas proteínas teve a sensibilidade e a especificidade para ser utilizada individualmente para discriminar amostras normais de amostras tumorais. Um grupo de proteínas que incluiu a piruvato cinase, a chaperonina 10 e a  $\alpha$ 1-anti-tripsina apresentou a melhor sensibilidade, especificidade e valor preditivo (DeSouza *et al*, 2007). A análise proteómica com eletroforese bidimensional e espetrometria de massa MALDI foi a abordagem utilizada para identificar a expressão diferencial de proteínas em cancros do endométrio. A coloração do gel 2D com azul

de *Coomassie* permitiu selecionar 112 *spots* para análise representando um total de 99 proteínas. A ciclofilina A foi uma das proteínas com expressão diferencial mais significativa entre o carcinoma e o tecido normal e correlacionou-se com pior prognóstico (Li *et al*, 2008b). Outras proteínas foram também identificadas utilizando eletroforese bidimensional e espectrometria de massa como a proteína epidérmica ligadora de ácido gordos e a calcifosina, cuja sobre-expressão foi ubíqua no carcinoma do endométrio e se correlacionou com parâmetros clínico-patológicos (Li *et al*, 2008a). Esta metodologia permitiu ainda identificar proteínas diferencialmente expressas em carcinomas endometrioides diploides e aneuploides, representando um total de 27 proteínas. Em comparação com o endométrio normal, o carcinoma do endométrio diploide não apresentou proteínas sobre-expressas. Foi ainda descrita a subexpressão de algumas proteínas em relação ao precursor pré-neoplásico do carcinoma do endométrio, a hiperplasia atípica (Lomnytska *et al*, 2012). O estudo proteômico analisou a expressão de membros da família Ets ERM/ETV5, especificamente sobre-regulados em carcinomas endometrioides a qual se correlacionou com infiltração miometrial. Esta análise elucidou vias de regulação associadas a esta família realizadas na linha celular HEC-1A (Monge *et al*, 2009). Um outro trabalho comparou o soro de doentes com carcinoma do endométrio e com o soro de mulheres saudáveis voluntárias. Dos grupos testados, foram identificadas 13 proteínas diferencialmente expressas no soro das doentes com cancro do endométrio em comparação com o soro das mulheres sem patologia. Destas, sete proteínas estavam sobre-expressas e seis subexpressas no cancro do endométrio (Zhu *et al*, 2008). A aplicação da eletroforese 2D à avaliação da expressão diferencial de proteínas no cancro do endométrio, tecido pré-neoplásico e tecido normal foram descritas e demonstram algumas proteínas e vias envolvidas na regulação. Os estudos com eletroforese bidimensional com CSC revelaram alguns dados no conhecimento da expressão proteica nesta população. No cancro colorretal foram comparadas as proteínas expressas diferencialmente nas populações CD133<sup>+</sup> e CD133<sup>-</sup> de duas linhas celulares de carcinoma colorretal. A identificação proteica indicou alterações em dois processos principais, o metabolismo energético e a via WNT (Corbo *et al*, 2012). Outra publicação deste tipo de cancro associou a população CD133<sup>+</sup> com a sobre-expressão de nucleoporina a qual refere ainda que a supressão desta proteína ou de CD133 aumentou a suscetibilidade ao 5-fluorouracilo (Kim *et al*, 2014).

Os modelos animais têm fornecido uma plataforma fundamental para o estudo em oncologia. Os modelos de xenotransplantação que incorporam linhas celulares primárias ou geneticamente modificadas, derivadas de tumores primários ou metastáticos têm sido tradicionalmente utilizados (Carver & Pandolfi, 2006). Os modelos animais com ratos e ratinhos revolucionaram a capacidade de compreender os mecanismos moleculares da patogénese do cancro. Como modelo, o rato e o ratinho têm várias vantagens sobre modelos com outros mamíferos, nomeadamente as suas pequenas dimensões, menores custos com a manutenção, reproduzem-se rapidamente e podem ser geneticamente manipulados (Cheon & Orsulic, 2011).

A utilização de um modelo de xenotransplantação teve por objetivo esclarecer a capacidade tumorigênica das populações estudadas. No nosso trabalho experimental, esta capacidade foi avaliada para todas as populações através da injeção das células tumorais no dorso em ratinhos *Balb-c nu/nu*.

O crescimento tumoral de cada grupo foi avaliado até à obtenção de volumes tumorais de 100 mm<sup>3</sup> e verificou-se que os xenotransplantes das células das esferas ES3 apresentaram um crescimento mais rápido, demorando apenas 3,7 dias a atingir o referido volume. Ao final de mais 10 dias o volume tumoral relativo manteve-se superior nas esferas ES3 e verificaram-se níveis semelhantes nas esferas ES2. Estes resultados apontam para uma maior capacidade de iniciação e de manutenção do crescimento tumoral nas populações de esferas.

O modelo das CSC tem sugerido que uma pequena população das células tem capacidade tumorigênica baseado nas experiências que utilizam células cancerígenas humanas em ratos imunodeprimidos SCID/NOD. Os modelos de xenotransplantação melhoraram a possibilidade de estudo da hipótese das CSC, no entanto, salientam-se algumas limitações como as interações do tumor com o microambiente local que limitam a interpretação destes estudos (Tysnes, 2010). O crescimento do tumor pode ser mantido por células estaminais e depende da natureza da mutação, da origem das células e do microambiente, fatores que também contribuem para a propagação do tumor. A identificação de uma população tumorigênica com capacidade de originar a heterogeneidade fenotípica encontrada num tumor inicial foi descrita com apenas 100 células de uma população CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> de células tumorais da mama (Al-Hajj *et al*, 2003).

Outros estudos em cancro do endométrio abordaram o comportamento *in vivo* de células com propriedades de CSC. Friel e colaboradores avaliaram o comportamento da população lateral derivada da linha celular AN3CA em relação à população maioritária através da injeção subcutânea de  $2 \times 10^4$  células no dorso de ratinhos SCID/NOD. Neste modelo, a população lateral originou os tumores que aparecerem 15 dias depois da injeção, apesar da população maioritária não ter apresentado capacidade tumorigénicas no mesmo período de tempo, demonstrando o papel da população lateral na iniciação tumoral (Friel *et al*, 2008). Outro trabalho avaliou a população lateral da linha celular HEC-1, que foi inoculada no tecido subcutâneo de ratinhos *nude* e, também neste estudo, a população lateral originou tumores mais precocemente, após 4 semanas, em comparação com 10 semanas necessárias para a população maioritária. A população lateral apresentou ainda uma tendência para tumores de maiores dimensões e verificou-se invasão para os tecidos adjacentes e alguma dificuldade na resseção, ao contrário dos obtidos a partir da população maioritária que originou tumores encapsulados e separados da membrana basal da pele do animal. A avaliação histológica dos tumores com origem na população lateral apresentou células tumorais com tecido estromal enriquecido em matriz extracelular, enquanto os tumores com origem na população maioritária se encontravam encapsulados e não apresentavam esta característica do estroma (Kato *et al*, 2010). De igual modo a

população lateral e a população maioritária da linha celular HEC-50B foram injetadas na gordura subcutânea de ratinhos SCID/NOD. Nos animais que receberam as células da população lateral observou-se maior taxa de formação de tumor nos locais de implantação que os que receberam a população maioritária (Tomiyasu *et al*, 2014).

Outros autores reportaram a tumorigênese com base em tumorosferas derivadas de adenocarcinoma do endométrio. A metodologia foi semelhante à que desenvolvemos no nosso trabalho experimental descrita para as esferas ES1, ES2 e ES3, as células foram dissociadas das tumorosferas e foi utilizado um controlo com células diferenciadas derivadas das tumorosferas, cultivadas em meio de esferas sem suplementação com fatores de crescimento. Um dos trabalhos descreveu que a injeção subcutânea em dois locais distintos no dorso do mesmo animal permitiu comparar o comportamento das duas populações. As tumorosferas originaram tumores maiores e em todos os animais injetados. No grupo controlo com células diferenciadas derivadas de tumorosferas os tumores foram menores e apenas 3 de 17 locais injetados originaram tumores e de menores dimensões (Zhou *et al*, 2011a). Noutro trabalho, a população purificada CD133<sup>+</sup>, a população CD133<sup>-</sup> derivada de tumores endometriais humanos assim como a população tumoral de origem foram injetadas em ratinhos SCID/NOD e verificou-se que apenas 500 células CD133<sup>+</sup> originaram tumores. A injeção 20 a 200 vezes superior de células CD133<sup>-</sup> ou da população de origem foram tumorigénicas no mesmo período de latência, enfatizando a capacidade tumorigénica superior da população CD133<sup>+</sup> (Friel *et al*, 2010). Estes dados são consistentes com a presença de uma população com propriedades estaminais, que origina tumores mais precocemente e de dimensões superiores, semelhante ao que sucedeu com no nosso estudo com populações de esferas de cancro do endométrio em comparação com a linha celular ECC-1 e as populações derivadas aderentes.

A capacidade tumorigénica das esferas foi estudada noutro tipo de tumores. Um desses estudos utilizou as linhas celulares de melanoma WM115 e WM239A, a células das esferas foram injetadas subcutaneamente em ratinhos SCID e todos os animais desenvolveram tumores, na maioria dos casos em 28 a 40 dias. Também as esferas de melanoma de ratinho apresentaram maior capacidade de formar tumores em comparação com as células aderentes (Fang *et al*, 2005). Noutro estudo com células derivadas de linhas celulares de cancro da mama foram injetadas no flanco de ratinhos, comparando o comportamento da população de esferas e das culturas em monocamada. A inoculação de um elevado número de células da monocamada ou esferas das células S2 teve crescimento semelhante *in vivo* enquanto um número reduzido de células das esferas S2N apresentou tumorigênese elevada. A linha S2 apresentou um crescimento semelhante ao das esferas e das células de monocamada, inclusivamente observou-se um crescimento mais acentuado do xenotransplante derivado da monocamada (Lehmann *et al*, 2012). As células aderentes e provenientes de esferas do primeiro e do sétimo dia da linha celular de cancro o pulmão murino foram injetadas no flanco de ratinho por via

subcutânea. Neste trabalho foram avaliados animais imunocompetentes singênicos e os resultados foram comparados com os imunodeprimidos. As esferas apresentaram maior capacidade tumorigênica nos ratinhos singênicos em comparação com as células aderentes e as esferas do primeiro dia foram mais tumorigênicas que as do sétimo dia. Nos ratinhos imunodeprimidos todos os animais apresentaram tumores, no entanto este modelo foi considerado menos satisfatório uma vez que o modelo singênico imunocompetente permitiu interações com o sistema imune do hospedeiro para este tipo de tumor (Morrison *et al*, 2012). O potencial tumorigênico da linha celular de carcinoma não de pequenas células do pulmão foi avaliado pela injeção subcutânea de células de esferas e verificou-se o desenvolvimento de tumores xenotransplantados com morfologia semelhante ao tumor original, mostrando a capacidade das esferas reproduzirem a doença humana no rato (Tirino *et al*, 2009). Estes dados, apesar de se referirem a outro tipo de cancros, estão de acordo com o que se verificou no nosso estudo com esferas com origem em células do endométrio, consistentes com uma maior capacidade tumorigênicas nesta população.





## **CAPÍTULO VI — RESPOSTA À TERAPÊUTICA**



Neste capítulo descrevem-se os estudos em que se avaliou a resposta à terapêutica das populações celulares isoladas pelo protocolo de formação de esferas e pela sua cultura em condições aderentes. As culturas celulares foram submetidas ao tratamento com ciclofosfamida, com doxorrubicina, com carboplatina e com paclitaxel, assim como com a irradiação com 0,5 Gy, com 15 Gy e com 30 Gy. Os tipos de morte celular e a expressão de proteínas envolvidas nestes processos e a avaliação dos danos no DNA associados a cada tipo de tratamento também foram estudados.

## Material e Métodos

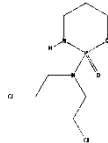
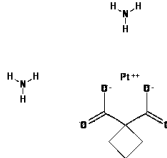
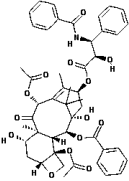
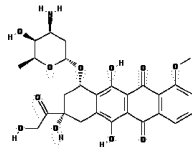
A linha celular de adenocarcinoma do endométrio ECC-1, as populações de esferas ES1, ES2 e ES3, assim como as respetivas populações derivadas aderentes G1, G2 e G3 foram cultivadas e obtidas de acordo com o procedimento descrito no capítulo V. Com o propósito de caracteriza a resposta à terapêutica foi testada a resposta a citostáticos e à radiação.

### Quimioterapia

A linha celular ECC-1 foi submetida a incubação com diferentes concentrações de ciclofosfamida, de carboplatina, de paclitaxel e de doxorrubicina, cujas características químicas estão descritas na Tabela 7. Os fármacos utilizados para este estudo experimental foram cedidos pelos Serviços Farmacêuticos do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Para todos os estudos prepararam-se diluições dos citostáticos numa concentração que permitiu administrar sempre um volume de cerca de 1% em relação ao volume de meio de cultura em que as culturas celulares foram incubadas. Os fármacos foram adicionados com diferentes concentrações para obter as curvas dose-resposta para a linha celular ECC-1 e para os respetivos fármacos. Assim, as concentrações da ciclofosfamida variaram entre 500 nM e 7,7  $\mu$ M, de doxorrubicina entre 50 pM e 37  $\mu$ M, de carboplatina entre 1  $\mu$ M e 500  $\mu$ M e de paclitaxel entre 1 fM e 40  $\mu$ M. A análise da atividade metabólica foi realizada às 24, 48 e 72 horas após a incubação com o fármaco. As populações ES1, ES2 e ES3 assim como as derivadas aderentes G1, G2 e G3, foram submetidas tratamento com concentrações de ciclofosfamida de 7,7  $\mu$ M, doxorrubicina de 50 nM, de 300 nM e de 7,3  $\mu$ M, de carboplatina de 200  $\mu$ M e

de 500  $\mu$ M e de paclitaxel de 300 nM, de 600 nM e de 1,2  $\mu$ M durante 24, 48 e 72 horas de incubação.

Tabela 7: Características químicas dos citostáticos utilizados. Estruturas químicas retiradas de *Pubmed compound*, ciclofosfamida CID 2907, carboplatina CID 10339178, paclitaxel CID 36314 e doxorubicina CID 31703.

	Ciclofosfamida	Carboplatina	Paclitaxel	Doxorrubicina
Fórmula química	$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$	$C_6H_{14}N_2O_4P$	$C_{47}H_{51}NO_{14}$	$C_{27}H_{29}NO_{11}$
Estrutura química				
Concentração	2 g/mL	10 mg/dL	6 mg/mL	2 mg/mL
Massa molecular	261,8 g/mol	373,25 g/mol	853,83 g/mol	543,46 g/mol

## Radioterapia

Para avaliar e comparar a ação da radioterapia as populações celulares consideradas para este trabalho experimental foram submetidas a três doses de radiação 0,5 Gy, 15 Gy e 30 Gy. Prepararam-se suspensões celulares das populações numa concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL, colocadas em *ependorfs* num volume que atingiu o máximo da sua capacidade, de modo a não conter ar aquando da irradiação. Para cada experiência foi considerado um controlo que acompanhou todos os passos do ensaio mas que não foi submetido a radiação. Os resultados foram avaliados às 24, às 48 e às 72 horas.

A irradiação foi realizada no Serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra por Especialistas em Física Médica, num acelerador linear Varian Clinac 600 C (Varian Medical Systems) com um feixe de fótons de 4 MV, utilizado na rotina clínica para tratamento. Os *ependorfs* foram irradiados e acondicionados numa caixa para irradiação especialmente concebida para este efeito no Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. A caixa foi construída com material acrílico e as suas paredes possuem uma espessura de 1 cm. As dimensões da caixa e as referências de posicionamento que possui permitem garantir condições de posicionamento e de acondicionamento reprodutíveis assim como garantir a homogeneidade da dose de radiação. Numa primeira fase foi realizado um estudo dosimétrico orientado por TC, o que permitiu realizar um planeamento tridimensional com o sistema de planeamento Eclipse™ (Varian Medical Systems), para garantir uma homogeneidade na distribuição da dose de radiação. As dimensões da caixa para irradiação e do campo de irradiação (40 cm x 40 cm), bem como a distância da fonte do feixe ao centro da caixa permitem calcular o tempo

de irradiação necessário para administrar a dose pretendida, que é medida em unidades de monitor (MU, do inglês *Monitor Units*). Na Figura 51 representa-se o planeamento tridimensional descrito baseado em TC de planeamento, assim como o perfil da dose administrada na irradiação celular.

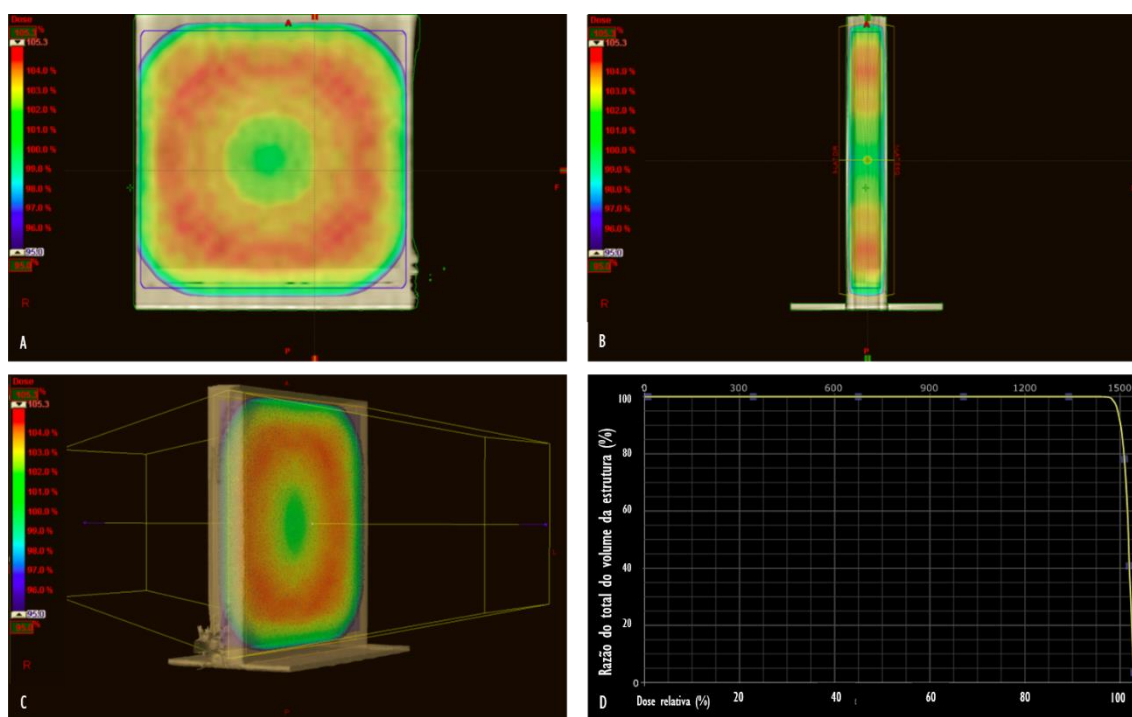


Figura 51: Planeamento realizado para irradiação celular em caixa de acrílico, construída para este tipo de procedimento: A imagem A corresponde à representação frontal, a imagem B à representação lateral e a imagem C à representação tridimensional da caixa para irradiação. A distribuição de dose encontra-se representada nas três imagens por esquema de cor, variando de um mínimo de 95% (azul) a um máximo de 105,3% (vermelho); a imagem D representa o histograma dose-volume, considerando como volume alvo todo o interior da caixa onde é possível colocar material para irradiação.

Para se proceder à irradiação de células, a caixa para irradiação foi colocada na mesa de tratamento contendo os frascos, sendo o restante espaço vazio preenchido com água destilada a uma temperatura de 37°C. O posicionamento da caixa foi orientado por referências através de um sistema ortogonal de lasers. A administração da dose foi realizada com recurso a dois campos laterais, por rotação da *gantry* a 90° e a 270°, de modo a garantir uma distribuição de dose homogênea, de acordo com o planeamento. Para todas as doses foram colocados o colimador e a mesa a 0°, encontrando-se todas as lâminas do colimador multifolhas (MLC, do inglês *multileaf collimator*) recolhidas. Na Tabela 8 descrevem-se as doses de radiação e as respetivas condições utilizadas para a irradiação.

Tabela 8: Doses administradas às amostras na caixa de irradiação

Dose	0,5 Gy	15 Gy (0,5+14,5)	30Gy (15+15)
<i>Gantry</i> a 90°	23 MU	+670 MU	+694 MU
<i>Gantry</i> a 180°	23 MU	+671 MU	+693 MU

MU, unidades de monitor (do *inglês monitor units*)

## Atividade metabólica

Os estudos de citotoxicidade realizados nas culturas celulares submetidas à quimioterapia e à radioterapia foram realizados na linha celular ECC-1, nas populações de esferas ES1, ES2 e ES3 e nas populações derivadas aderentes G1, G2 e G3.

Para avaliar o efeito dos citostáticos e da irradiação na atividade metabólica das células aderentes foi realizado o ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Nas células metabolicamente ativas este composto é reduzido pela ação das enzimas desidrogenases, principalmente através da ação do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, nomeadamente a succinato desidrogenase ou succinato-coenzima Q reductase. As desidrogenases têm a capacidade de clivar os anéis de tetrazólio do MTT e formar cristais de formazano de cor azul escura que após solubilização podem ser quantificados por meios espectrofotométricos. Esta metodologia constitui uma forma indireta de avaliar a atividade mitocondrial da célula pois a quantidade de cristais de formazano obtidos é diretamente proporcional à sua atividade metabólica da célula (Freshney RI, 2010).

A concentração celular de cada suspensão foi ajustada a  $8 \times 10^5$  células/ml de meio de cultura. As suspensões foram distribuídas por placas de 48 poços. As células foram incubadas durante a noite de forma a permitir a sua adesão. Para avaliar a atividade metabólica o meio de cultura foi descartado e procedeu-se a lavagem com PBS. Posteriormente, colocaram-se 100  $\mu$ L de uma solução de MTT (0,5 mg/ml; Sigma M2128) em PBS, com pH de 7,4, e incubou-se no escuro a 37°C durante 4 horas. De forma a solubilizar os cristais de formazano formados, acrescentaram-se a cada poço 100  $\mu$ L de uma solução de ácido clorídrico na concentração de 0,04 M em isopropanol e deixaram-se as placas em agitação durante 30 minutos. O conteúdo de cada poço foi, posteriormente, homogeneizado e transferido para uma placa de 96 poços (Sarstedt 83.1835) e a absorvância foi quantificada a 570 nm com um filtro de referência de 620 nm, usando o espectrofotómetro Biotek® Synergy HT.

O ensaio *Alamar Blue*® foi utilizado para avaliar o efeito citotóxico da radioterapia e dos citostáticos na linha celular ECC1 e nas esferas ES1, ES2 e ES3. A resazurina, que é um corante indicador de reações de oxidação-redução, é utilizada neste ensaio para avaliar a atividade metabólica celular. A conversão da forma oxidada para a forma reduzida é acompanhada pela alteração da cor da azul para o rosa e pode ser

quantificada por espectrofotometria.

Nos estudos para avaliar os efeitos da irradiação, as três populações de esferas previamente obtidas de acordo com o protocolo descrito no capítulo V, foram gentilmente separadas com recurso a uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma T4049). Após o tratamento, as células foram distribuídas em placas de 48 poços (Costar, 3548) com o meio de cultura previamente descrito para o protocolo de formação de esferas. Para a linha celular ECC-I foi utilizado o meio de cultura RPMI, respeitando as suas condições de cultura. Para avaliar o efeito dos citostáticos na atividade metabólica, no último dia do protocolo de formação de esferas, as células foram distribuídas por placas de 96 poços e incubadas com os citostáticos.

Para a avaliação da atividade metabólica celular foi adicionado a cada poço o reagente *Alamar Blue*<sup>®</sup> de modo a obter uma concentração de 10% e incubou-se no escuro a 37°C até se verificar uma alteração significativa da cor do corante. O conteúdo dos poços foi transferido para placas de 96 poços (734-2327, VWR), e a absorvância foi quantificada a 570nm e a 600nm. Os resultados foram expressos em percentagem em relação ao controlo, considerando as 24, as 48 e as 72 horas e usando o espectrofotómetro Biotek<sup>®</sup> Synergy HT.

A atividade metabólica foi expressa em percentagem em relação ao controlo que não foi submetido a qualquer tipo de tratamento. Com base neste procedimento foram determinadas curvas de dose-resposta para a linha celular ECC-I considerando os citostáticos detalhados previamente e determinada a concentração que inibiu a atividade metabólica das culturas em 50% (IC<sub>50</sub>, do inglês *half maximal inhibitory concentration*). Os fármacos testados foram a ciclofosfamida na concentração de 7,7 µM, a doxorrubicina nas concentrações de 50 nM, de 300 nM e de 7,3 µM, a carboplatina nas concentrações de 200 µM e de 500 µM e o paclitaxel nas concentrações de 300 nM, de 600 nM e de 1,2 µM e avaliados os efeitos após 24, 48 e 72 horas de incubação. No que respeita à radioterapia as doses de irradiação foram de 0,5 Gy, 15 Gy e 30 Gy após 24, 48 e 72 horas.

## Ensaio clonogénico

Para avaliar a capacidade clonogénica das células submetidas ao tratamento com radioterapia e com citostáticos, foi realizado o ensaio clonogénico. As células com esta capacidade formam colónias que são grupos com mais de 50 células em condições que permitem o seu crescimento (Franken *et al*, 2006). Neste trabalho, o ensaio clonogénico foi realizado nas células da linha celular ECC-I, nas populações de esferas ES1, ES2 e ES3 e na população de derivadas aderentes G1, G2 e G3 submetidas a irradiação com as doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e 30 Gy. Esta metodologia também foi utilizada para avaliar o efeito do tratamento com ciclofosfamida na concentração de 7,7 µM, com carboplatina nas concentrações de 200 µM e de

500  $\mu\text{M}$ , com doxorubicina nas concentrações de 50 nM e de 300 nM e 7,3  $\mu\text{M}$ , assim como com o paclitaxel nas concentrações de 300 nM, de 600 nM e de 1,2  $\mu\text{M}$  para as populações ECC-I, ESI e GI. O mesmo procedimento foi realizado em células que não receberam qualquer tratamento e que constituíram o grupo de controlo.

Após um período de tempo definido (12 dias), as colónias não contabilizadas e é calculada a eficiência clonogénica e o fator de sobrevivência, segundo a Equação 9 e Equação 10, respetivamente.

$$\text{Eficiência clonogénica} = \frac{N^{\circ} \text{ de colónias contadas}}{N^{\circ} \text{ de células distribuídas por poço}} \quad \text{Equação 9}$$

$$\text{Fator de sobrevivência} = \frac{\text{Eficiência clonogénica com o tratamento}}{\text{Eficiência clonogénica no controlo}} \quad \text{Equação 10}$$

As placas foram mantidas na incubadora a 37°C e no décimo segundo dia de incubação, removeu-se o meio de cultura dos poços, lavou-se cada poço com uma solução de PBS e, de seguida adicionou-se 1 mL de metanol a 100% (20847.360, VWRProlabo). Após 10 minutos à temperatura ambiente, o metanol foi descartado e adicionaram-se 2 mL de solução de violeta de cristal (C3886, Sigma-Aldrich) a 0,5% em metanol, a qual permaneceu durante 5 minutos à temperatura ambiente. No final deste procedimento as colónias ficaram coradas e a solução corante foi aspirada e as placas lavadas com água para remover o excesso de corante. As placas secaram à temperatura ambiente e procedeu-se à contagem das colónias e ao cálculo da eficiência das placas e do fator de sobrevivência.

## Morte celular

De modo a caracterizar as vias de morte celular implicadas no processo fotodinâmico realizaram-se estudos de microscopia de fluorescência e avaliou-se a expressão de proteínas por western blot.

## Microscopia de fluorescência

A viabilidade e os tipos de morte celular foram avaliados por microscopia de fluorescência, conforme descrita por outros autores (Miao *et al*, 2013). Para avaliar a morte celular consequente da radioterapia e da quimioterapia, utilizou-se a dupla marcação com a anexina V (AnV) ligada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e com o iodeto de propídeo (IP), que permitem quantificar a viabilidade celular distinguindo os diferentes tipos de morte celular, a necrose e a apoptose. A anexina V identifica células que se encontram



em apoptose, uma vez que se liga especificamente à fosfatidilserina, um fosfolípido da bicamada lipídica que, nas células em apoptose, se desloca do folheto interno para o folheto externo da membrana celular (Zhu *et al.*, 2008). Por sua vez, o iodeto de propídeo intercala-se no DNA das células, acessível quando se encontram em apoptose tardia ou em necrose. Os núcleos podem ser ainda marcados com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), um corante que se liga com grande afinidade às regiões ricas em A-T do DNA (Kapuscinski, 1995).

Com esta marcação foi possível distinguir células vivas, que se apresentam positivas para o DAPI e negativas para a marcação com a anexina V e para o iodeto de propídeo; células em apoptose, que se apresentam positivas para a marcação com a DAPI e para a marcação com anexina V e negativas para o iodeto de propídeo; células que se encontram em apoptose tardia/necrose, que se apresentam positivas para o DAPI, a anexina V e o iodeto de propídeo; e, células em necrose, que se apresentam positivas para a marcação com o DAPI e o iodeto de propídeo e negativas para a anexina V.

Para os estudos com citostáticos foram considerados os fármacos carboplatina com a concentração de 500  $\mu\text{M}$  e o paclitaxel com a concentração de 300 nM, para as mesmas populações celulares referidas e após 24 horas de tratamento. Nos estudos das vias de morte celular foram avaliadas as células ECC1, as ESI e as GI 24 horas após terem sido submetidas a radiação com 0,5 Gy, 15 Gy e 30 Gy às 24 horas. Foram utilizados como controlos positivos culturas celulares submetidas a peróxido de hidrogénio nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$  e de 500  $\mu\text{M}$ , respetivamente, para confirmar a apoptose e a necrose (Saito *et al.*, 2006). Após o tratamento, as células foram distribuídas com uma concentração de  $1,5 \times 10^6$  células por poço em placa de 6 poços, respeitando as condições aderentes ou em suspensão com meio adequado, conforme já mencionado.

Após as 24 horas do tratamento com os citostáticos ou a radioterapia, foram utilizadas suspensões celulares de  $5 \times 10^5$  células, para cada condição e submetidas a centrifugação a 300 G durante 5 minutos. O *pellet* foi incubado com 100  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação (constituído por 0,01 M de Hepes [Sigma, H7523], 0,14 M de NaCl [Sigma, S7653] e 0,25 mM de  $\text{CaCl}_2$  [Sigma, C4901]), 2,5  $\mu\text{L}$  de An-V FITC (Immunostep ANXVFKIT Immunotech) e 1  $\mu\text{L}$  de iodeto de propídeo (KIT Immunotech), durante 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Após a incubação, as suspensões foram centrifugadas a 300 G durante 5 minutos e uma alíquota de células marcadas foi colocada entre uma lâmina e uma lamela após suspensão em 8  $\mu\text{L}$  de meio de montagem *ProLong® gold antifade reagent with DAPI* (Life Technologies™, P36931) e deixou-se *overnight*, tendo em vista também a marcação dos núcleos. As lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência (Leica, DM 4000B). Cada condição em cada experiência foi fotografada aleatoriamente em 10 planos com a ampliação de 400x. Cada conjunto de imagens com as três marcações foi analisado com o *software ImageJ*. Os resultados são apresentados sob a forma de percentagem de células vivas, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e em necrose de acordo com esta marcação.

### Western blot

Para a realização destes estudos, as células ECC-1, as esferas ESI e as derivadas aderentes GI foram submetidas ao tratamento de radioterapia com as doses de 0,5 Gy, 15 Gy e 30 Gy e foram preparados extratos proteicos após 24 horas, com a metodologia descrita no capítulo V. Relativamente ao tratamento com citostáticos, foram avaliadas para as mesmas populações celulares a carboplatina com a concentração de 500  $\mu\text{M}$  e o paclitaxel com a concentração de 300 nM, também após 24 horas. Em ambos os tratamentos para o mesmo ensaio foi considerado um controlo que acompanhou o procedimento sem ser submetido ao tratamento.

A técnica de western blot, descrita no capítulo V, foi utilizada para avaliar as proteínas envolvidas na morte celular, nomeadamente a expressão das proteínas P53 e Caspase 3.

Para a deteção da P53 utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-P53 (D07) preparado em ratinho (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-47698), que detetou uma banda a cerca de 53 kDa. Para a deteção da Caspase 3 utilizou-se o anticorpo policlonal anti-Caspase 3 (H277) preparado em coelho (Santa Cruz Biotechnology, Inc, sc-7148), que detetou uma banda a cerca de 32 kDa, correspondente à pró-caspase 3.

### Danos no DNA

Para estudar os efeitos dos tratamentos de radioterapia e de quimioterapia ao nível do DNA, foi realizado o ensaio cometa. O ensaio cometa foi realizado nas células ECC-1, na população de esferas ESI e nas derivadas aderentes GI de modo a avaliar as consequências do tratamento com 0,5 Gy, 15 Gy e 30 Gy após 24 horas. Para o tratamento de quimioterapia foi testada a carboplatina com a concentração de 500  $\mu\text{M}$  e paclitaxel com a concentração de 300 nM nas mesmas células e também no mesmo tempo. Este ensaio constitui uma eletroforese em microgel de agarose que permite avaliar os danos no DNA, ou seja, a genotoxicidade de compostos. Após coloração, as células ficam com aspeto de cometa, em que a cabeça representa o núcleo e a cauda os fragmentos de DNA migrantes, cujo comprimento é proporcional à extensão dos danos. A realização desta técnica em condições alcalinas permitiu avaliar as quebras de cadeia única no DNA (Olive & Banáth, 2006).

Nesta metodologia iniciou-se o protocolo pelo revestimento de lâminas de vidro (Star Frost, Alemanha) com uma camada de agarose utilizando uma solução 1% de agarose (Sigma A2790). Preparou-se a agarose de baixo ponto de fusão (Sigma A9414) a 1% que constituiu a segunda camada nas lâminas. Esta agarose, em virtude do seu ponto de fusão, permite adicioná-la ainda líquida às células a 37°C. As suspensões celulares foram centrifugadas a 500 G durante 5 minutos, lavadas com PBS e diluídas de modo a obter uma concentração de  $5 \times 10^4$  células/ml. Num *eppendorf* homogeneizaram-se as suspensões celulares obtidas com a

solução de agarose e colocaram-se cerca de 500 mL sobre as lâminas já revestidas.

Após a solidificação da segunda camada de agarose, colocaram-se as lâminas em solução de lise constituída por NaCl na concentração de 2,5 M, EDTA na concentração de 100 mM, Trizma Base na concentração de 10 mM, Triton X-100 na concentração de 1% e DMSO na concentração de 10%, à temperatura de 4°C, durante a noite, para promover a degradação dos organelos celulares. No final deste período as lâminas foram colocadas em tampão de eletroforese, constituído por NaOH na concentração de 300 mM e de EDTA na concentração de 1 mM, com pH > 13, durante uma hora, para que as células adquirissem características alcalinas. Em seguida foi realizada a eletroforese utilizando uma tensão de 25 V e uma corrente de 600 mA durante 15 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram depois submetidas a uma solução de neutralização constituída por Trizma Base na concentração de 0,4 M, com pH de 7,5 e coradas com brometo de etídeo na concentração de 20 µg/mL. Estas lâminas assim tratadas foram deixadas a secar durante alguns minutos.

As observações foram realizadas num microscópio Motic AE31 equipado com sistema de epifluorescência Motic AE31 EF-INV-II. As imagens foram adquiridas em câmara Moticom 5000 Cooled acoplada a computador dedicado com o *software* Motic Images Advanced 3.2 de forma a obter no mínimo 100 exemplares de cometas para cada condição de tratamento.

Em todas as imagens adquiridas, os cometas foram processados com o *software* CometScore™ 1.5 (TriTek Corp.), que analisa cada cometa individualmente para parâmetros como o comprimento da cauda, a área da cauda, a percentagem de DNA na cauda e o momento da cauda. O parâmetro de interesse neste estudo foi o momento da cauda que representa o produto do comprimento da cauda com a percentagem de DNA na cauda.

## Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM® SPSS® *Statistics* versão 20. Na análise descritiva foram determinados valores de tendência central, dispersão e localização. Os resultados das variáveis quantitativas foram expressos ao longo do texto sob a forma de média ± desvio-padrão.

Os resultados obtidos relativamente à atividade metabólica para a linha celular ECC-I submetidas ao tratamento com ciclofosfamida, carboplatina, doxorrubicina e paclitaxel, foram analisados e processados no programa *OriginPro* (OriginLab Corporation, Northampton, EUA), versão 8.0 e ajustados a uma curva sigmoide de acordo com a Equação II,

$$AM = \frac{100}{1 + e^{(\log x_0 - \log C) \times p}} \quad \text{Equação II}$$

onde  $AM$  representa a atividade metabólica,  $C$  a concentração,  $p$  o declive da região central da sigmoide e  $x_0$  o  $IC_{50}$ . Foram obtidos os intervalos de confiança a 95% para o  $IC_{50}$  a partir dos parâmetros obtidos pelo ajuste da curva ( $\log x_0$  e respetivo erro padrão). Os parâmetros que definem as curvas de dose-resposta referentes aos resultados da atividade metabólica foram comparados utilizando o teste ANOVA de um factor. Seguidamente foram realizadas comparações múltiplas entre os pares de grupos experimentais.

As comparações entre as populações celulares, para a atividade metabólica, para a sobrevivência celular e para as vias de morte celular, foram obtidas segundo o teste ANOVA de um fator nos casos em que se verificou distribuição normal e homogeneidade das variâncias e segundo o teste de Kruskal-Wallis no caso contrário. Seguidamente foram realizadas comparações múltiplas entre os pares de grupos experimentais.

Para os resultados obtidos nos estudos de western blot, relativos à análise da expressão da P53 e da caspase 3, as comparações foram realizadas com o teste *t-student* para uma média e utilizado o valor de normalização 1.

No ensaio cometa a comparação entre condições foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis uma vez que a distribuição dos valores é assimétrica com cauda à direita. Foram realizadas comparações múltiplas entre os pares de grupos experimentais.

Todas as comparações múltiplas foram corrigidas segundo o método de Bonferroni e foi considerado um valor de significância de 5% para todas as comparações.

## RESPOSTA AOS CITOSTÁTICOS

### Resultados

#### Atividade metabólica

Os estudos de citotoxicidade avaliaram o efeito na atividade metabólica dos citostáticos ciclofosfamida, doxorrubicina, carboplatina e paclitaxel na linha celular ECC1. Nos casos em que os pontos experimentais permitiram, os resultados do ensaio do MTT foram ajustados ao modelo sigmoidal de dose-resposta, com vista a extrapolar o valor do  $IC_{50}$ , correspondente ao ponto médio da curva.

A atividade metabólica em resposta à ciclofosfamida após 24, 48 e 72 horas de incubação está representada na Figura 52. A atividade metabólica das culturas da linha celular de ECC-1 submetidas à

ciclofosfamida na concentração de 7,7  $\mu\text{M}$  foi de  $100,60 \pm 7,70\%$  às 24 horas,  $90,74 \pm 10,49\%$  às 48 horas e  $93,17 \pm 8,44\%$  às 72 horas. Assim, neste caso não foi possível estabelecer curvas de dose resposta e verificou-se que o  $\text{IC}_{50}$  correspondia a uma concentração superior à concentração máxima testada de 7,7  $\mu\text{M}$ .

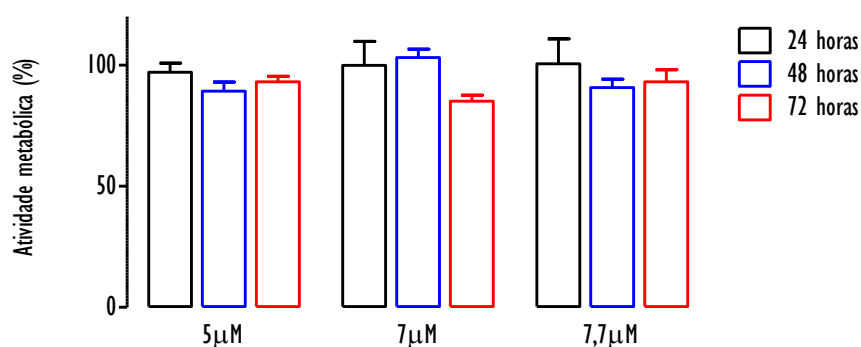


Figura 52: Atividade metabólica da linha celular ECC-1 após tratamento com ciclofosfamida na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , de 7  $\mu\text{M}$ , e de 7,7  $\mu\text{M}$ . Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão em nove ensaios. Não se observaram diferenças significativas entre as condições.

A atividade metabólica das culturas da linha celular ECC-1 após o tratamento com doxorubicina está representada na Figura 53, onde se podem observar as curvas dose-resposta obtidas para as 24, as 48 e as 72 horas de incubação. Verificou-se que o tratamento levou à diminuição da atividade metabólica de forma dependente da concentração do fármaco e do tempo de incubação. A partir das curvas de dose-resposta foi possível calcular os valores de  $\text{IC}_{50}$  que corresponderam a 7,3  $\mu\text{M}$ , a 287 nM e a 47 nM, respectivamente, para as 24, as 48 e as 72 horas.

No que respeita à carboplatina, os gráficos representativos da atividade metabólica após 24 e 48 horas de incubação estão representados na Figura 54-A. Não foi possível fazer o ajuste dos resultados obtidos para estes tempos ao modelo matemático sigmoidal de dose-resposta e constatou-se que o valor do  $\text{IC}_{50}$  é superior ao valor da concentração máxima testada, neste caso 500  $\mu\text{M}$ . Para esta concentração (500  $\mu\text{M}$ ) a atividade metabólica foi de  $114,72 \pm 2,60\%$  às 24 horas e de  $93,88 \pm 9,32\%$  às 48 horas. Para as 72 horas, foi possível determinar a curva dose-resposta, representada na Figura 54-B, e obter o valor de  $\text{IC}_{50}$  correspondente a 365  $\mu\text{M}$ .

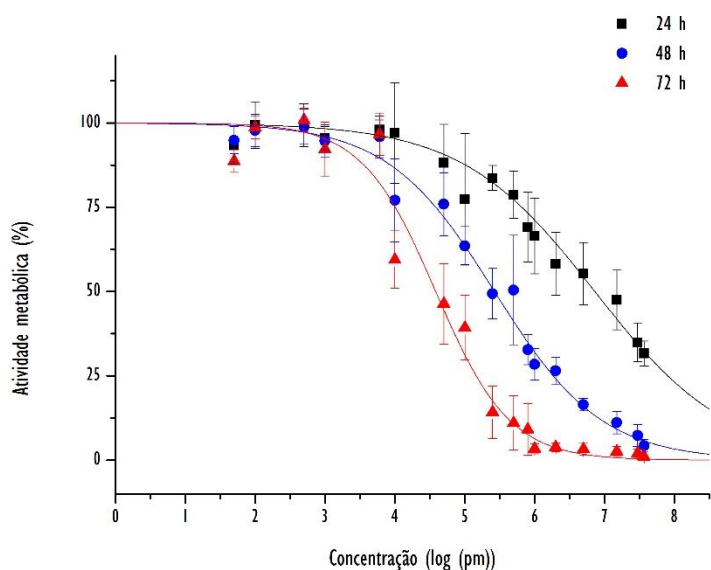


Figura 53: Atividade metabólica da linha celular ECC-1 após 24, 48 e 72 horas de incubação com doxorubicina. Os valores apresentados exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos nove ensaios. Os pontos experimentais foram ajustados a um modelo sigmoidal de dose-resposta, tendo-se obtido um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,988 para as 24 horas, de 0,995 para as 48 horas e de 0,987 para as 72 horas.

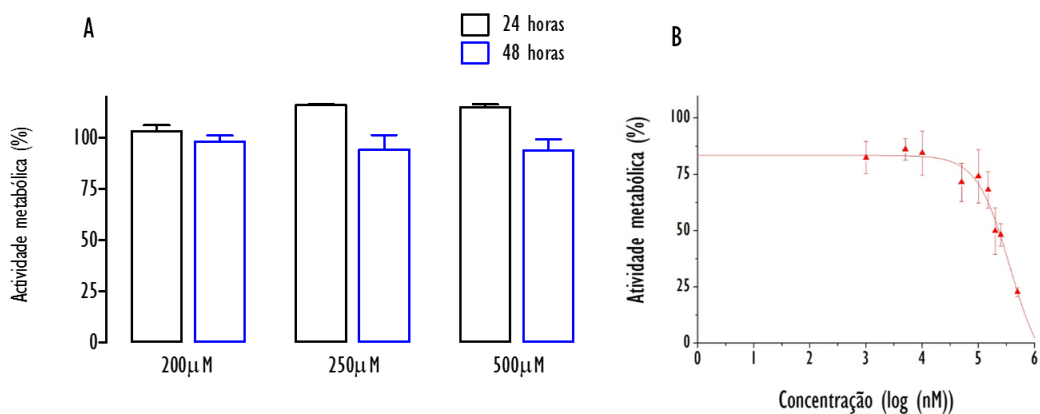


Figura 54: Atividade metabólica da linha celular ECC-1 após o tratamento com carboplatina. A) Atividade metabólica após o tratamento com carboplatina nas concentrações de 200  $\mu$ M, de 250  $\mu$ M e de 500  $\mu$ M durante 24 e 48 horas de incubação. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos nove ensaios. B) Curva de dose-resposta para as 72 horas de incubação com carboplatina. Os valores apresentados exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos nove ensaios. Os pontos experimentais obtidos para as 72 horas foram ajustados a um modelo sigmoidal de dose/resposta, tendo-se obtido um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,996 para as 72 horas.

A atividade metabólica foi avaliada após incubação com paclitaxel durante os mesmos tempos, conforme representada na Figura 55. O valor do  $IC_{50}$  para as 24 horas foi de 87,1 nM, para as 48 horas foi de 5,6 nM e para as 72 horas de 884,0 pM.

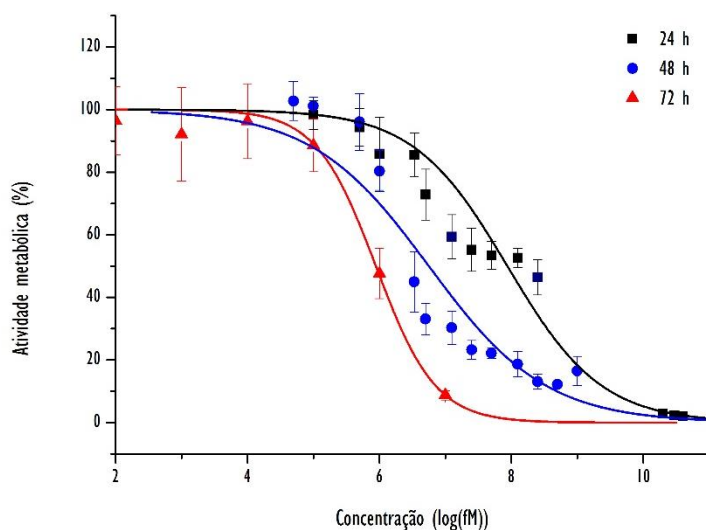


Figura 55: Atividade metabólica linha celular ECC-1 após 24, 48 e 72 horas de incubação com paclitaxel. Os valores apresentados exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos nove ensaios. Os pontos experimentais foram ajustados a um modelo sigmoidal de dose/resposta, tendo-se obtido um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,936 para as 24 horas, de 0,980 para as 48 horas e de 0,998 para as 72 horas.

Os valores de  $IC_{50}$  e respectivos intervalos de confiança a 95% para os fármacos ciclofosfamida, doxorubicina, carboplatina e paclitaxel obtidos após 24, 48 e 72 horas de incubação estão sistematizado na Tabela 9.

Tabela 9:  $IC_{50}$  e respectivos intervalos de confiança a 95% da ciclofosfamida, carboplatina e paclitaxel na linha celular ECC-1 após 24, 48 e 72 horas de incubação.

	Ciclofosfamida	Doxorubicina	Carboplatina	Paclitaxel
24 horas	>7,7 $\mu$ M	7,3[6,5; 8,1] $\mu$ M	>500 $\mu$ M	87,1[50,2; 151,1]nM
48 horas	>7,7 $\mu$ M	287,0[246; 336]nM	>500 $\mu$ M	5,6[2,0; 15,5]nM
72 horas	>7,7 $\mu$ M	47[34; 64]nM	365[188; 302] $\mu$ M	884,0[686,5; 1138,4]pM

O efeito da ciclofosfamida na concentração de 7,7  $\mu$ M na atividade metabólica das populações de derivadas aderentes G1, G2 e G3 foi também avaliada, em comparação com a linha celular parental ECC-1 e os resultados estão representados na Figura 56. Após 24 horas de incubação a atividade metabólica das ECC-1 foi de  $100,60 \pm 7,70\%$ , enquanto das G1 foi de  $100,93 \pm 9,98\%$ , das G2 foi de  $97,20 \pm 11,91\%$  e das G3 foi de  $97,96 \pm 8,90\%$ . Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-1 foi de  $90,74 \pm 10,49\%$ , enquanto das G1 foi de  $102,27 \pm 10,30\%$ , das G2 foi de  $97,78 \pm 5,73\%$  e das G3 foi de  $100,62 \pm 8,19\%$ . Após 72 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-1 foi de  $93,17 \pm 8,44\%$ , das

G1 foi de  $93,04 \pm 8,42\%$ , das G2 foi de  $92,67 \pm 6,55\%$  e das G3 foi de  $100,39 \pm 10,59\%$ . Não se observaram portanto atividades metabólicas significativamente diferentes entre as populações estudadas.

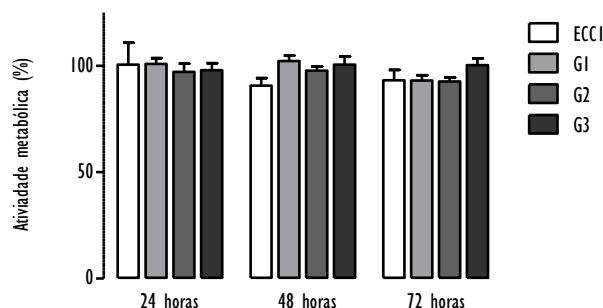


Figura 56: Atividade metabólica da linha celular ECC-I, das G1, das G2 e das G3 após incubação com ciclofosfamida na concentração de  $7,7 \mu\text{M}$  durante 24, 48 e 72 horas. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos nove ensaios. Não se observaram diferenças significativas entre as populações.

A atividade metabólica das células da linha celular ECC-I e das derivadas aderentes G1, G2 e G3 após incubação com a carboplatina na concentração de  $200 \mu\text{M}$  e de  $500 \mu\text{M}$  está representada na Figura 57. Para a concentração de  $200 \mu\text{M}$ , após 24 horas de incubação, a atividade metabólica das ECCI foi de  $103,05 \pm 6,63\%$ , enquanto das G1 foi de  $88,85 \pm 5,61\%$ , das G2 foi de  $88,15 \pm 7,78\%$  e das G3 foi de  $87,07 \pm 14,55\%$ . Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica das G1 foi de  $43,43 \pm 18,20\%$  ( $p < 0,001$ ), das G2 foi de  $52,72 \pm 9,92\%$  ( $p = 0,001$ ) e das G3 foi de  $53,25 \pm 17,66\%$  ( $p = 0,001$ ), inferiores à atividade das ECC-I que apresentou um valor de  $98,09 \pm 5,15\%$ . Após 72 horas de incubação, a atividade metabólica das G1 foi de  $1,56 \pm 1,02\%$ , ( $p < 0,001$ ), das G2 foi de  $3,10 \pm 1,49\%$  ( $p < 0,001$ ) e das G3 foi de  $3,40 \pm 1,96\%$  ( $p < 0,001$ ), inferiores à atividade das ECC-I que apresentou um valor de  $49,90 \pm 10,34\%$ . Para a concentração de  $500 \mu\text{M}$ , após 24 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-I foi de  $113,42 \pm 2,60\%$ , das G1 foi de  $83,60 \pm 15,15\%$ , das G2 foi de  $73,51 \pm 13,97\%$  e das G3 foi de  $83,53 \pm 12,43\%$ . Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica das G1 foi de  $13,79 \pm 3,25\%$  ( $p < 0,001$ ), das G2 foi de  $13,49 \pm 10,73\%$  ( $p = 0,002$ ) e das G3 foi de  $20,24 \pm 8,45\%$  ( $p < 0,001$ ), inferiores às atividade das ECC-I que apresentou um valor de  $93,88 \pm 9,32\%$ . Após 72 horas de incubação, a atividade metabólica das G1 foi de  $0,74 \pm 0,43\%$  ( $p < 0,001$ ), das G2 foi de  $0,91 \pm 0,55\%$  ( $p < 0,001$ ) e das G3 foi de  $1,46 \pm 1,21\%$  ( $p < 0,001$ ), inferior à atividade de ECC-I correspondente a  $22,69 \pm 1,9\%$ .

A atividade metabólica da linha celular ECC-I e das derivadas aderentes G1, G2 e G3 após incubação com a doxorubicina nas concentrações de  $50 \text{ nM}$ , de  $300 \text{ nM}$  e de  $7,3 \mu\text{M}$  está descrita na Figura 58. Para a concentração de  $50 \text{ nM}$ , após 24 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-I foi de



90,68±3,99%, das G1 foi de 98,89±12,23%, das G2 foi de 93,06±7,87% e das G3 foi de 93,52±15,58%. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-I foi de 72,12±8,93%, das G1 foi de 83,01±15,59%, das G2 foi de 81,20±9,81% e das G3 foi de 88,43±8,27%. Após 72 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-I foi de 44,57±27,59%, das G1 foi de 75,13±10,45%, das G2 foi de 68,97±11,72% e das G3 foi de 68,61±15,97%. Para a concentração de 300 nM, após 24 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-I foi de 81,12±5,14%, das G1 foi de 85,33±14,63%, das G2 foi de 86,14±9,19% e das G3 foi de 85,62±14,79%. Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-I foi de 48,33±6,49%, das G1 foi de 66,00±5,97%, das G2 foi de 64,10±8,64% e das G3 foi de 59,45±11,46%. Após 72 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-I foi de 15,54±11,50%, das G1 foi de 23,73±13,64%, das G2 foi de 29,04±10,09% e das G3 foi de 34,53±10,00%. Para a concentração de 7,3 µM, após 24 horas de incubação, a atividade metabólica das G2 foi de 71,37±13,72% (p=0,017), superior à das ECC-I com um valor de 50,01±5,15%.

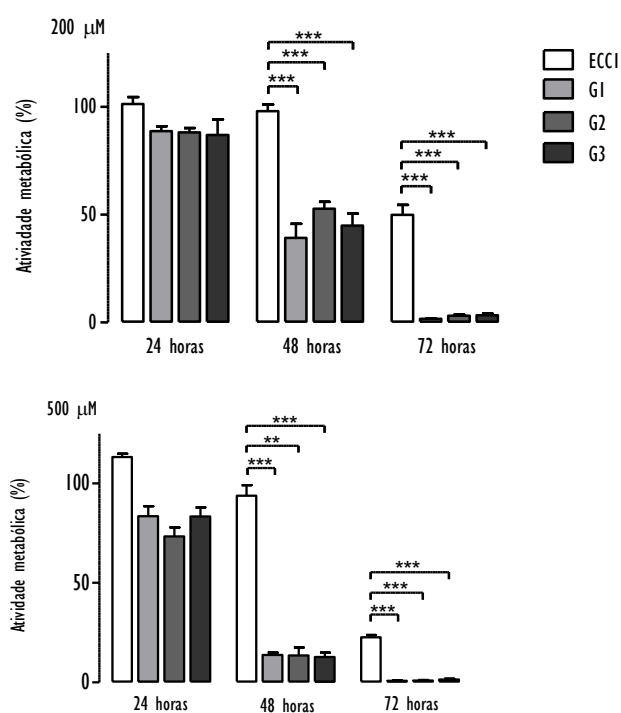


Figura 57: Atividade metabólica da linha celular ECC-I, das G1, das G2 e das G3 após incubação com carboplatina na concentração de 200 µM (gráfico superior) e de 500 µM (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos seis ensaios. A significância estatística está representada com \*\* para p<0,01 e com \*\*\* para p <0,001.

A atividade metabólica das G1 foi de 74,83±11,43% e das G3 foi de 69,11±17,83%. Após 48 horas de

incubação, a atividade metabólica das G1 foi de  $42,26 \pm 16,70\%$  ( $p=0,005$ ) e das G2 foi de  $27,42 \pm 10,90\%$  ( $p<0,001$ ), superiores à atividade de ECC-I com um valor de  $13,26 \pm 2,95\%$ . A atividade metabólica das G3 foi de  $23,47 \pm 10,89\%$ . Após 72 horas de incubação, a atividade metabólica das G1 foi de  $18,07 \pm 10,84\%$ , superior à das ECC-I que foi de  $1,31 \pm 1,27\%$  ( $p=0,029$ ) e à das G3 que foi de  $3,06 \pm 1,35\%$  ( $p=0,036$ ). A atividade metabólica das G2 foi de  $12,78 \pm 4,36\%$ .

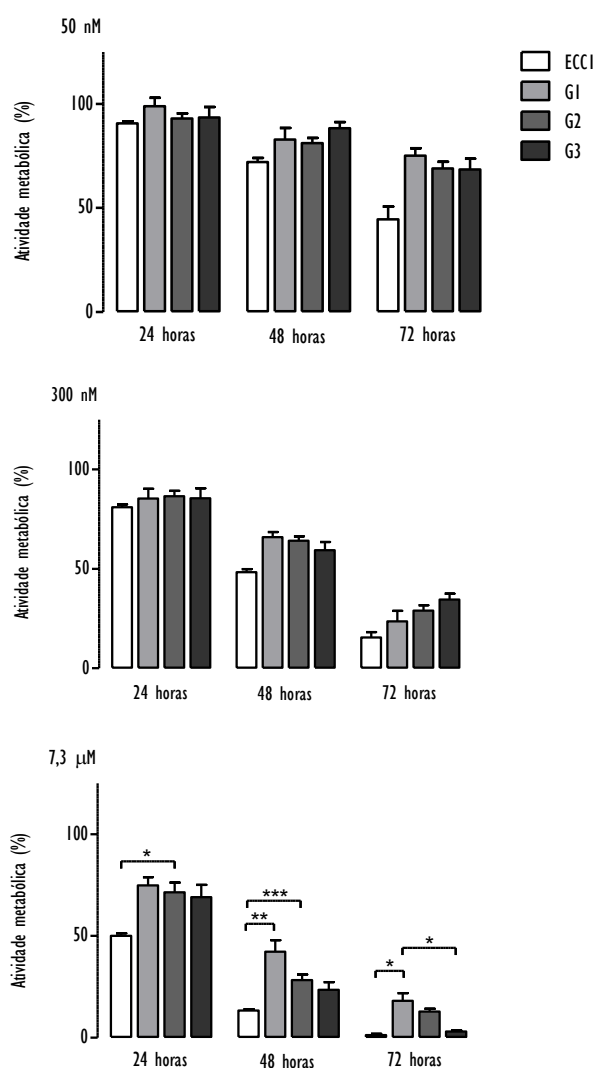


Figura 58: Atividade metabólica da linha celular ECC-I, das G1, das G2 e das G3 após incubação com doxorubicina na concentração de 50 nM (gráfico superior), de 300 nM (gráfico do meio) e de 7,3  $\mu$ M (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos seis ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$ , com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

A atividade metabólica das células parentais ECC-I e das derivadas aderentes G1, G2 e G3 após

incubação com paclitaxel na concentração de 300 nM, de 600 nM e de 1,2  $\mu$ M, está descrita na Figura 59. Para a concentração de 300 nM, após 24 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-I foi de  $31,98 \pm 5,87\%$ , das G1 foi de  $82,43 \pm 12,72\%$ , das G2 foi de  $55,63 \pm 8,25\%$  e das G3 foi de  $79,13 \pm 18,72\%$ .

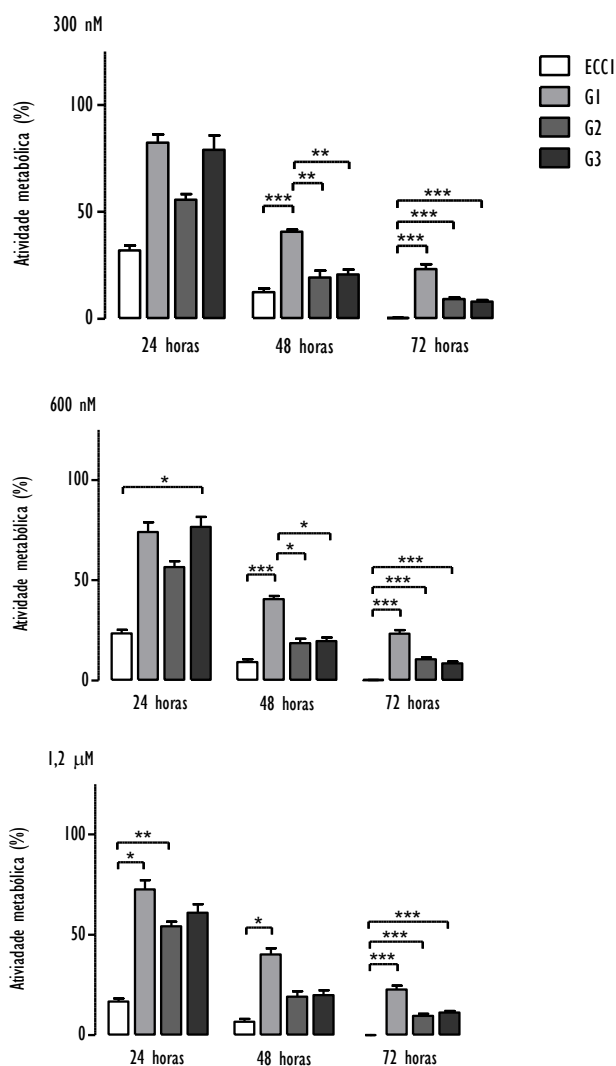


Figura 59: Atividade metabólica da linha celular ECC-I, das G1, das G2 e das G3 após incubação com paclitaxel na concentração de 300 nM (gráfico superior), de 600 nM (gráfico do meio) e de 1,2  $\mu$ M (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos seis ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$ , com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica das G1 foi de  $40,63 \pm 2,98\%$ , superior à atividade das ECC-I que foi de  $12,44 \pm 5,91\%$  ( $p < 0,001$ ), das G2 que foi de  $19,29 \pm 8,50\%$  ( $p = 0,006$ ) e das G3 que

foi de  $20,64 \pm 6,53\%$  ( $p=0,004$ ). Após 72 horas de incubação, a atividade metabólica das G1 foi de  $23,24 \pm 7,61\%$  ( $p<0,001$ ), das G2 foi de  $9,19 \pm 2,73\%$  ( $p<0,001$ ) e das G3 foi de  $7,94 \pm 2,51\%$  ( $p<0,001$ ), superior à atividade das ECC-I com um valor de  $0,36 \pm 0,24\%$ . Para a concentração para 600 nM, após 24 horas de incubação, a atividade metabólica das G3 foi de  $76,61 \pm 12,44\%$  ( $p=0,036$ ), superior à atividade das ECC-I com um valor de  $23,55 \pm 4,84\%$ . A atividade metabólica das G1 foi de  $71,84 \pm 15,55\%$  e das G2 foi de  $70,19 \pm 12,42\%$ . Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica para G1 foi de  $40,70 \pm 4,07\%$ , superior à atividade das ECC-I com um valor de  $9,18 \pm 5,31\%$  ( $p<0,001$ ), das G2 com um valor de  $18,69 \pm 6,26\%$  ( $p=0,012$ ) e das G3 com um valor de  $19,71 \pm 5,07\%$  ( $p=0,014$ ). Após 72 horas de incubação, a atividade metabólica das G1 foi de  $23,38 \pm 6,25\%$  ( $p<0,001$ ), das G2 foi de  $10,70 \pm 2,75\%$  ( $p<0,001$ ) e das G3 foi de  $8,60 \pm 2,72\%$  ( $p<0,001$ ), superior à atividade de ECC-I com um valor de  $0,19 \pm 0,14\%$ . Para a concentração de 1,2  $\mu\text{M}$ , após 24 horas de incubação, a atividade metabólica das G1 foi de  $72,66 \pm 15,55\%$  ( $p=0,048$ ) e das G2 foi de  $54,22 \pm 5,54\%$  ( $p=0,002$ ), superior à das ECC-I com um valor de  $16,79 \pm 3,95\%$ . A atividade metabólica das G3 foi de  $60,94 \pm 14,28\%$ . Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica para G1 foi de  $40,23 \pm 8,74\%$  ( $p=0,034$ ), superior a ECC-I ( $6,71 \pm 4,67\%$ ), para G2 foi de  $9,23 \pm 7,76\%$  e para G3 foi de  $19,90 \pm 7,24\%$ . Após 72 horas de incubação, a atividade metabólica das G1 foi de  $22,71 \pm 6,27\%$  ( $p<0,001$ ), das G2 foi de  $9,61 \pm 3,52\%$  ( $p<0,001$ ) e das G3 foi de  $11,28 \pm 2,89\%$  ( $p<0,001$ ), superior à atividade das ECC-I com um valor de  $0,09 \pm 0,08\%$ .

O efeito da ciclofosfamida na atividade metabólica das populações de esferas ES1, ES2 e ES3, foi também avaliada em comparação com a linha celular ECC-I e os resultados estão representados na Figura 60. Após 24 horas de incubação a atividade metabólica das ECC-I foi de  $106,15 \pm 13,15\%$ , das ES1 foi de  $91,56 \pm 9,91\%$ , das ES2 foi de  $101,80 \pm 10,17\%$  e das ES3 foi de  $101,79 \pm 3,96\%$ . Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-I foi de  $102,76 \pm 7,55\%$ , das ES1 foi de  $95,66 \pm 12,15\%$ , das ES2 foi de  $96,69 \pm 9,70\%$  e das ES3 foi de  $95,58 \pm 7,35\%$ . Após 72 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-I foi de  $87,78 \pm 16,46\%$ , das ES1 foi de  $107,18 \pm 7,38\%$ , das ES2 foi de  $101,60 \pm 9,96\%$  e das ES3 foi de  $105,27 \pm 14,24\%$ .

A atividade metabólica das esferas ES1, ES2 e ES3 em comparação com a linha celular ECC-I após a incubação com carboplatina nas concentrações de 200  $\mu\text{M}$  e de 500  $\mu\text{M}$  está representada na Figura 61. Para a concentração de 200  $\mu\text{M}$ , após 24 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-I foi de  $94,64 \pm 12,56\%$ , das ES1 foi de  $92,00 \pm 10,39\%$ , das ES2 foi de  $91,37 \pm 9,42\%$  e das ES3 foi de  $92,23 \pm 9,55\%$ . Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-I foi de  $95,09 \pm 4,94\%$ , das ES1 foi de  $81,47 \pm 16,29\%$ , das ES2 foi de  $84,21 \pm 12,91\%$  e das ES3 foi  $85,12 \pm 16,50\%$ . Após 72 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-I foi de  $52,12 \pm 18,8\%$ , das ES1 foi de  $32,30 \pm 9,21\%$ , das ES2 foi de  $35,48 \pm 9,70\%$  e das ES3 foi de  $35,67 \pm 19,79\%$ .

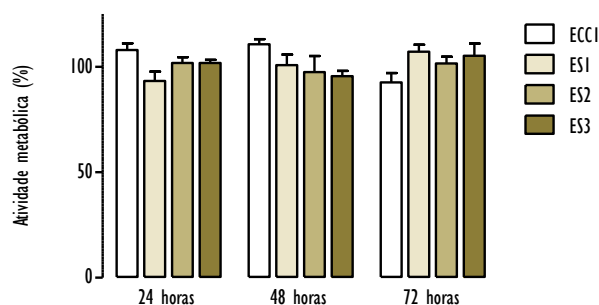


Figura 60: Atividade metabólica da linha celular ECC-1, das ES1, das ES2, das ES3 após incubação com ciclofosfamida na concentração de 7,7  $\mu\text{M}$  durante 24, 48 e 72 horas. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos seis ensaios. Não se observaram diferenças significativas entre as populações.

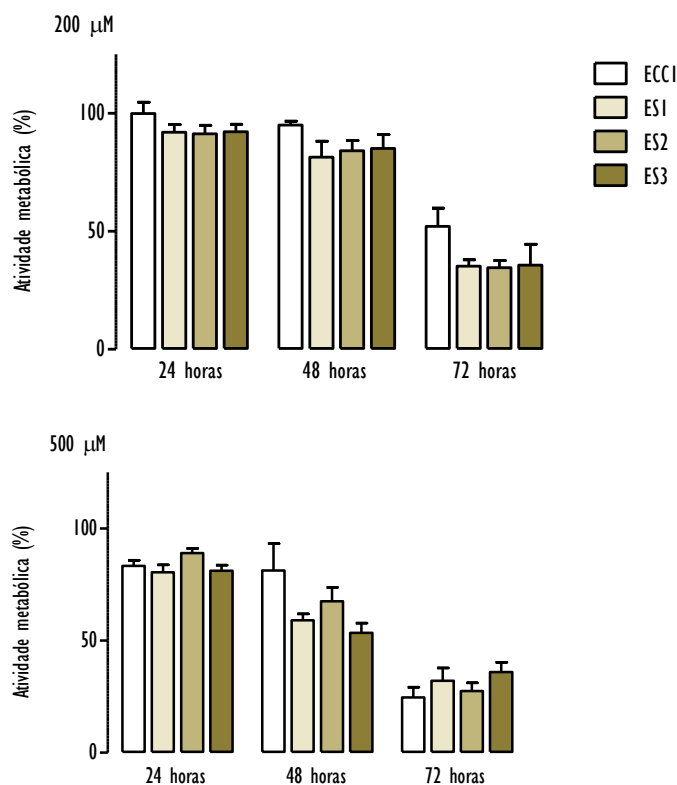


Figura 61: Atividade metabólica da linha celular ECC-1, das ES1, das ES2, das ES3 após incubação com carboplatina na concentração de 200  $\mu\text{M}$  (gráfico superior) e de 500  $\mu\text{M}$  (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos seis ensaios. Não se observaram diferenças significativas entre as populações.

Para a concentração de 500  $\mu\text{M}$ , após 24 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-1 foi de  $83,24 \pm 6,39\%$ , das ES1 foi de  $80,43 \pm 10,67\%$ , das ES2 foi de  $88,99 \pm 6,77\%$  e das ES3 foi de  $81,18 \pm 8,59\%$ . Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-1 foi de  $81,29 \pm 26,81\%$ , das ES1 foi de  $59,14 \pm 6,90\%$ , das ES2 foi de  $67,55 \pm 18,50\%$  e das ES3 foi de  $53,50 \pm 12,18\%$ . Após 72 horas

de incubação, a atividade metabólica das ECC-I foi de  $24,72 \pm 11,16\%$ , das ESI foi de  $32,04 \pm 14,04\%$ , das ES2 foi de  $27,44 \pm 10,87\%$  e das ES3 foi de  $36,00 \pm 10,44\%$ .

A atividade metabólica das esferas ESI, ES2 e ES3 em comparação com ECC-I após incubação com doxorubicina nas concentrações de 50 nM, de 300 nM e de 7,3  $\mu$ M está representada na Figura 62. Para a concentração de 50 nM, após 24 horas de incubação, a atividade metabólica das ECC-I foi de  $92,26 \pm 10,38\%$ , das ESI foi de  $102,31 \pm 3,71\%$ , das ES2 foi de  $98,78 \pm 10,94\%$  e das ES3 foi de  $100,31 \pm 6,79\%$ . Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica das ESI foi de  $99,33 \pm 4,15\%$  ( $p < 0,046$ ), das ES2 foi de  $104,06 \pm 4,56\%$  ( $p = 0,001$ ) e das ES3 foi de  $101,84 \pm 7,60\%$  ( $p = 0,004$ ), superior à atividade das ECC-I, que apresentou um valor de  $76,72 \pm 10,87\%$ . Após 72 horas de incubação, a atividade metabólica das ESI foi de  $91,53 \pm 11,96\%$  ( $p = 0,001$ ), das ES2 foi de  $92,72 \pm 11,92\%$  ( $p = 0,001$ ), e das ES3 foi de  $86,12 \pm 12,54\%$  ( $p = 0,005$ ), superior à atividade das ECC-I que apresentou um valor de  $62,65 \pm 7,37\%$ . Para a concentração de 300 nM, após 24 horas de incubação, a atividade metabólica das ESI foi de  $103,63 \pm 5,08\%$  ( $p < 0,001$ ), das ES2 foi de  $99,26 \pm 11,79\%$  ( $p = 0,001$ ) e das ES3 foi de  $102,10 \pm 3,14\%$  ( $p = 0,005$ ), superior à atividade das ECC-I, que apresentou um valor de  $81,42 \pm 6,64\%$ . Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica das ESI foi de  $98,54 \pm 4,02\%$  ( $p = 0,007$ ) e das ES2 foi de  $98,28 \pm 6,83\%$  ( $p = 0,011$ ), superior à atividade das ECC-I, que apresentou um valor de  $59,45 \pm 15,91\%$ . A atividade metabólica das ES3 foi de  $96,06 \pm 8,36\%$ . Após 72 horas de incubação, a atividade metabólica das ESI foi de  $86,88 \pm 27,36\%$  ( $p < 0,001$ ), das ES2 foi de  $83,09 \pm 11,50\%$  ( $p < 0,001$ ) e das ES3 foi de  $80,74 \pm 15,75\%$  ( $p < 0,001$ ), superior à atividade das ECC-I, que apresentou um valor de  $19,70 \pm 14,43\%$ . Para a concentração de 7,3  $\mu$ M, após 24 horas de incubação, a atividade metabólica das ESI foi de  $91,80 \pm 8,82\%$  ( $p = 0,001$ ), das ES2 foi de  $92,61 \pm 10,57\%$  ( $p < 0,001$ ) e das ES3 foi de  $98,17 \pm 5,44\%$  ( $p < 0,001$ ), superior à atividade das ECC-I que apresentou um valor de  $49,59 \pm 18,99\%$ . Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica das ESI foi de  $75,53 \pm 11,29\%$  ( $p = 0,012$ ), das ES2 foi de  $80,10 \pm 17,63\%$  ( $p = 0,009$ ) e das ES3 foi de  $80,95 \pm 8,95\%$  ( $p = 0,003$ ), superior à atividade das ECC-I que apresentou um valor de  $15,60 \pm 4,89\%$ . Após 72 horas de incubação, a atividade metabólica das ESI foi de  $45,6 \pm 12,48\%$  ( $p = 0,013$ ), das ES2 foi de  $54,31 \pm 13,75\%$  ( $p = 0,005$ ) e das ES3 foi de  $60,09 \pm 18,41\%$  ( $p = 0,001$ ), superior à atividade das ECC-I que apresentou um valor de  $0,46 \pm 1,15\%$ .

A atividade metabólica das esferas ESI, ES2 e ES3 em comparação com ECC-I após a incubação com paclitaxel nas concentrações de 300 nM, de 600 nM e de 1,2  $\mu$ M está representada na Figura 63. Para a concentração de 300 nM, após 24 horas de incubação, a atividade metabólica das ESI foi de  $90,70 \pm 11,89\%$  ( $p = 0,022$ ), das ES2 foi de  $93,05 \pm 6,68\%$  ( $p = 0,002$ ) e das ES3 foi de  $93,96 \pm 8,13\%$  ( $p = 0,001$ ), superior à atividade das ECC-I que apresentou um valor de  $57,81 \pm 8,56\%$ . Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica das ESI foi de  $93,84 \pm 6,28\%$  ( $p = 0,004$ ), das ES2 foi de  $90,77 \pm 15,37\%$

( $p=0,001$ ) e das ES3 foi de  $91,51 \pm 12,53\%$  ( $p=0,005$ ), superiores à atividade das ECC-I que apresentou um valor de  $14,39 \pm 16,29\%$ .

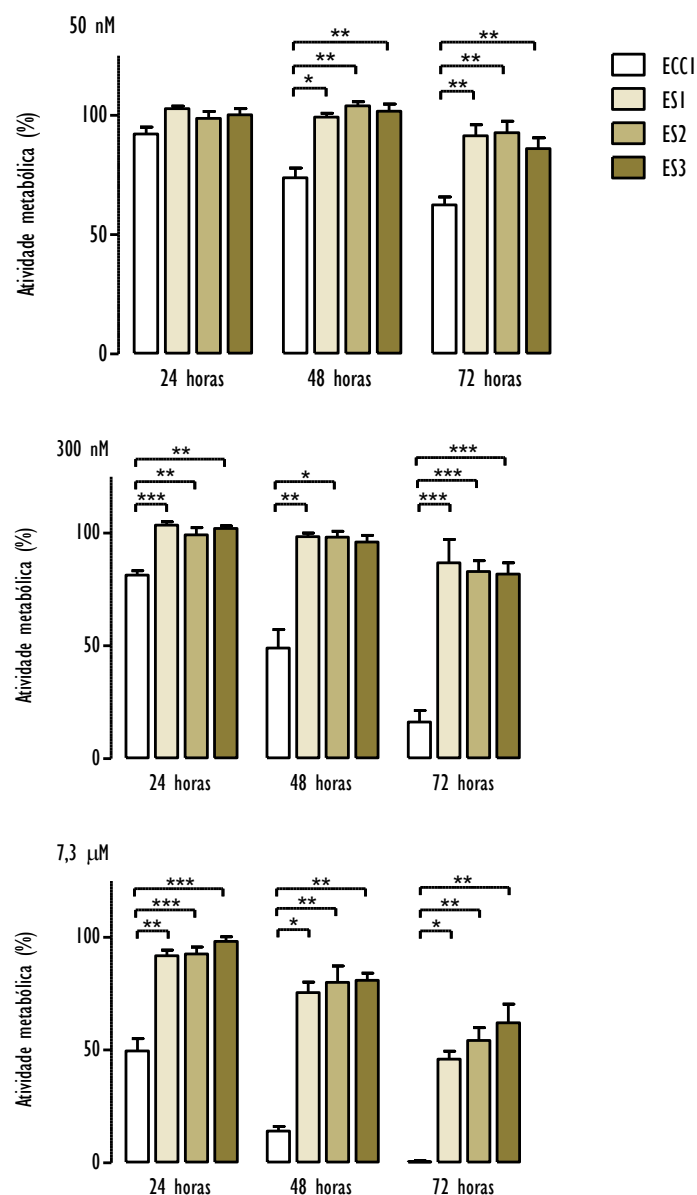


Figura 62: Atividade metabólica da linha celular ECC-I, das ES1, das ES2, das ES3 após incubação com doxorubicina na concentração de 50 nM (gráfico superior), de 300 nM (gráfico do meio) e de 7,3 μM (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos seis ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$ , com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

Após 72 horas de incubação, a atividade metabólica das ES1 foi de  $80,24 \pm 9,66\%$  ( $p < 0,001$ ), das ES2

foi de  $72,87 \pm 15,57\%$  ( $p < 0,001$ ) e das ES3 foi de  $82,39 \pm 11,26\%$  ( $p < 0,001$ ), superior à atividade das ECC-I que apresentou um valor de  $18,08 \pm 14,69\%$ .

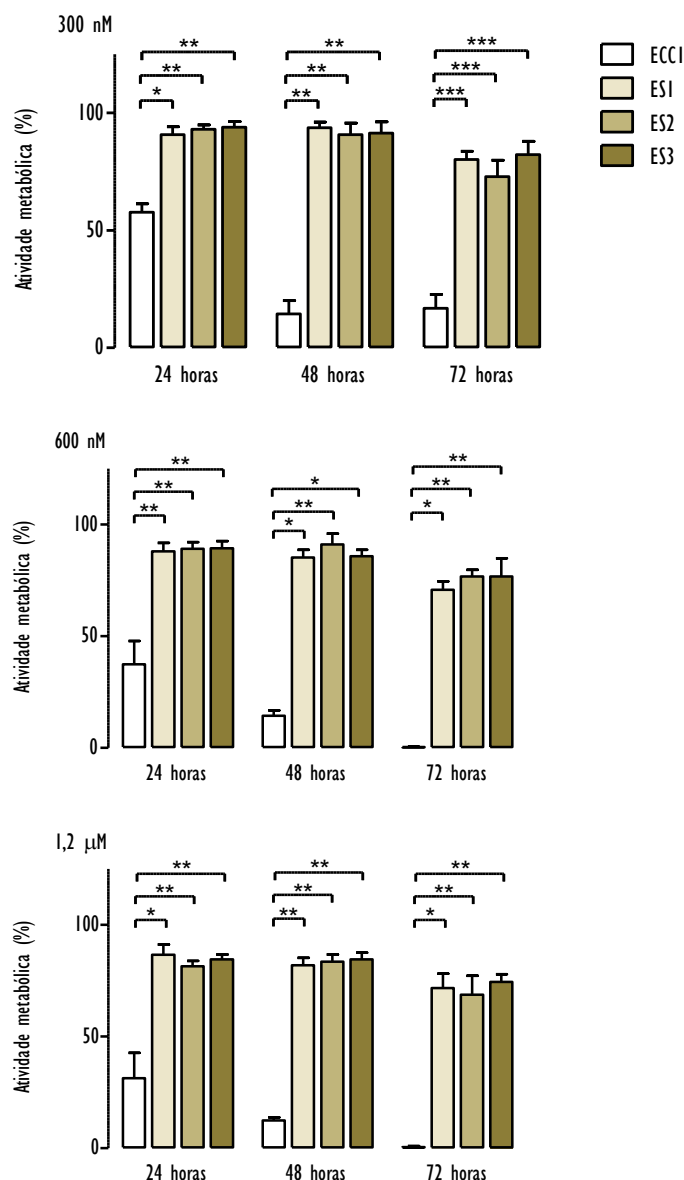


Figura 63: Atividade metabólica da linha celular ECC-I, das ES1, das ES2, das ES3 após incubação com paclitaxel na concentração de 300 nM (gráfico superior), de 600 nM (gráfico do meio) e de 1,2 μM (gráfico inferior) durante 24, 48 e 72 horas. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos seis ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$ , com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

Para a concentração de 600 nM, após 24 horas de incubação, a atividade metabólica das ES1 foi de  $88,08 \pm 12,79\%$  ( $p = 0,006$ ), das ES2 foi de  $89,24 \pm 10,49\%$  ( $p = 0,001$ ) e das ES3 foi de  $89,38 \pm 8,76\%$



( $p=0,003$ ), superior à atividade das ECC-I que apresentou um valor de  $37,41 \pm 27,53\%$ . Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica das ES1 foi de  $83,26 \pm 8,74\%$  ( $p=0,046$ ), das ES2 foi de  $91,09 \pm 13,72\%$  ( $p=0,001$ ) e das ES3 foi de  $85,93 \pm 6,83\%$  ( $p=0,018$ ), superior à atividade das ECC-I que apresentou valores de  $12,41 \pm 5,81\%$ . Após 72 horas de incubação, a atividade metabólica das ES1 foi de  $70,76 \pm 11,06\%$  ( $p=0,027$ ), das ES2 foi de  $76,84 \pm 7,06\%$  ( $p=0,005$ ) e das ES3 foi de  $76,79 \pm 18,36\%$  ( $p=0,009$ ), superior à atividade das ECC-I que apresentou um valor de  $0,22 \pm 0,54\%$ . Para a concentração de  $1,2 \mu\text{M}$ , após 24 horas de incubação, a atividade metabólica das ES1 foi  $86,58 \pm 15,97\%$  ( $p=0,006$ ), das ES2 foi de  $81,53 \pm 8,22\%$  ( $p=0,001$ ) e das ES3 foi de  $84,54 \pm 5,93\%$  ( $p=0,003$ ), superior à atividade das ECC-I que apresentou um valor de  $31,25 \pm 28,05\%$ . Após 48 horas de incubação, a atividade metabólica das ES1 foi de  $81,89 \pm 9,56\%$  ( $p=0,008$ ), das ES2 foi de  $83,63 \pm 8,10\%$  ( $p=0,005$ ) e das ES3 foi de  $84,56 \pm 7,88\%$  ( $p=0,003$ ), superior à atividade das ECC-I que apresentou um valor de  $12,40 \pm 3,78\%$ . Após 72 horas de incubação, a atividade metabólica das ES1 foi de  $71,75 \pm 14,41\%$  ( $p=0,021$ ), das ES2 foi de  $68,74 \pm 18,99\%$  ( $p=0,008$ ) e das ES3 foi de  $74,57 \pm 8,23\%$  ( $p=0,007$ ), superior à atividade das ECC-I que apresentou um valor de  $0,45 \pm 1,21\%$ .

O efeito dos citostáticos na atividade metabólica da linha celular ECC-I foi avaliado com recurso aos ensaios do MTT e do *Alamar Blue*<sup>®</sup> e verificou-se a ausência de diferenças significativas entre os resultados obtidos por estas metodologias, conforme descrito na Figura 64.

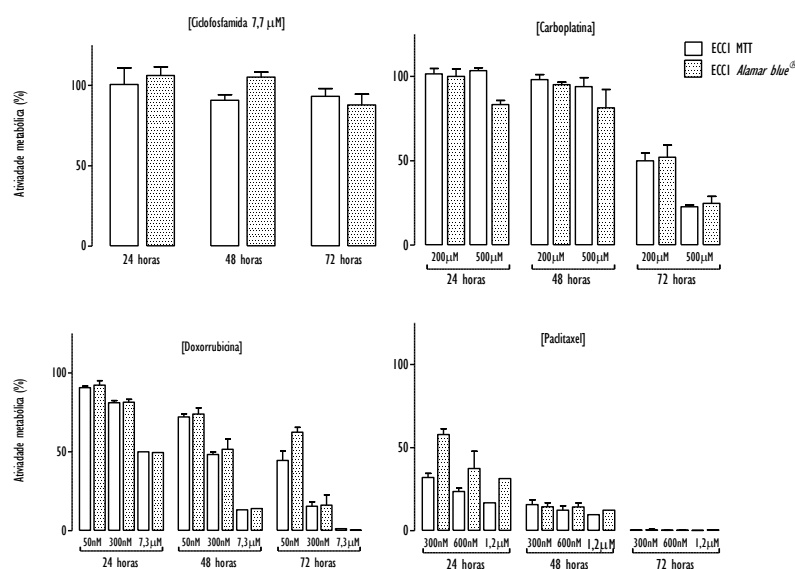


Figura 64: Atividade metabólica da linha celular ECC-I, comparando o ensaio do MTT e o ensaio do *Alamar Blue*<sup>®</sup> após incubação com ciclofosfamida na concentração de  $7,7 \mu\text{M}$ , doxorubicina na concentração de  $50 \text{ nM}$ , de  $300 \text{ nM}$  e de  $7,3 \mu\text{M}$  carboplatina na concentração de  $200 \mu\text{M}$  e de  $500 \mu\text{M}$  e paclitaxel na concentração de  $300 \text{ nM}$ ,  $600 \text{ nM}$  e  $1,2 \mu\text{M}$  às 24, 48 e 72 horas. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos seis ensaios. Não se observaram diferenças significativas entre os dois ensaios.

## Sobrevivência celular

O fator de sobrevivência da linha celular ECC-1, das esferas ESI e das células derivadas aderentes GI após o tratamento com a ciclofosfamida foi inferior à de culturas celulares controlo, com valores de  $0,49 \pm 0,21$  ( $p < 0,001$ ), de  $0,65 \pm 0,23$  ( $p = 0,003$ ) e de  $0,48 \pm 0,28$  ( $p < 0,001$ ), respetivamente, como se pode observar na Figura 65.

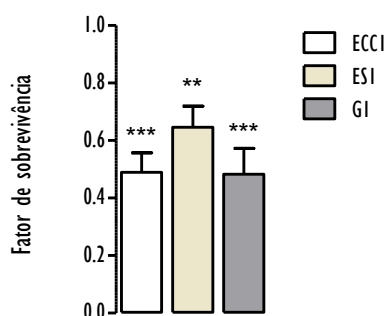


Figura 65: Sobrevivência da linha celular ECC-1, das ESI e das GI após o tratamento com ciclofosfamida na concentração de  $7,7 \mu\text{M}$ . Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos oito ensaios. A significância estatística está representada com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

O fator de sobrevivência para as células ECC-1, as esferas ESI e derivadas aderentes GI após o tratamento com doxorubicina nas concentrações de 50 nM, de 300 nM e de  $7,3 \mu\text{M}$  foi inferior à das respetivas culturas celulares controlo ( $p < 0,001$ ), conforme representado na Figura 66.

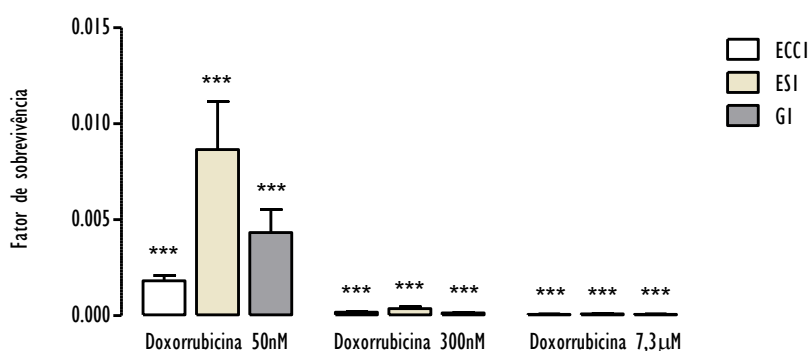


Figura 66: Sobrevivência da linha celular ECC-1, das esferas ESI e das derivadas aderentes GI após o tratamento com doxorubicina nas concentrações de 50 nM, de 300 nM e de  $7,3 \mu\text{M}$ . Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos sete ensaios. A significância estatística está representada com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

O fator de sobrevivência após o tratamento com a menor concentração (50nM) foi de  $1,8 \times 10^{-3} \pm 7,4 \times 10^{-4}$  para as ECC-1, de  $8,6 \times 10^{-3} \pm 6,1 \times 10^{-3}$  para as ESI e de  $4,3 \times 10^{-3} \pm 4,1 \times 10^{-3}$  para as GI. O tratamento com a concentração de 300 nM resultou num fator de sobrevivência de  $1,8 \times 10^{-4} \pm 9,7 \times 10^{-5}$  para as ECC1, de  $3,7 \times 10^{-4} \pm 2,9 \times 10^{-4}$  para as ESI e de  $1,4 \times 10^{-4} \pm 7,9 \times 10^{-5}$  para as GI. O tratamento com a concentração de 7,3  $\mu$ M resultou num fator de sobrevivência de  $6,7 \times 10^{-5} \pm 2,8 \times 10^{-5}$  para as ECC1, de  $8,9 \times 10^{-5} \pm 4,5 \times 10^{-5}$  para as ESI e de  $6,7 \times 10^{-5} \pm 4,3 \times 10^{-5}$  para as GI.

O fator de sobrevivência para as células ECC-1, as esferas ESI e derivadas aderentes GI após o tratamento com a carboplatina nas concentrações de 200  $\mu$ M e de 500  $\mu$ M foi sempre inferior ao das culturas celulares controlo ( $p < 0,001$ ), como representado na Figura 67. No tratamento com a concentração de 200  $\mu$ M, a sobrevivência foi de  $9,2 \times 10^{-5} \pm 5,3 \times 10^{-5}$  para as ECC1, de  $6,5 \times 10^{-5} \pm 5,0 \times 10^{-5}$  para as ESI e de  $4,4 \times 10^{-5} \pm 2,4 \times 10^{-5}$  para as GI. O tratamento com a concentração de 500  $\mu$ M resultou numa sobrevivência de  $9,2 \times 10^{-5} \pm 6,6 \times 10^{-5}$  para as ECC-1, de  $7,6 \times 10^{-5} \pm 5,4 \times 10^{-5}$  para as ESI e de  $6,2 \times 10^{-5} \pm 2,2 \times 10^{-5}$  para as GI.

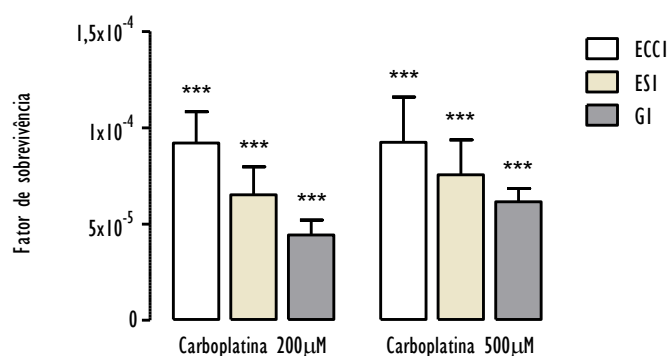


Figura 67: Sobrevivência da linha celular ECC-1, das esferas ESI e das derivadas aderentes GI após o tratamento com carboplatina nas concentrações de 200  $\mu$ M e de 500  $\mu$ M. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos nove ensaios. A significância estatística está representada com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

O fator de sobrevivência para as células ECC-1, as esferas ESI e derivadas aderentes GI após o tratamento com paclitaxel nas concentrações de 300 nM e de 600 nM foi sempre inferior ao das culturas celulares controlo ( $p < 0,001$ ), conforme representado na Figura 68. O tratamento com a concentração de 300 nM resultou numa sobrevivência de  $2,8 \times 10^{-5} \pm 1,6 \times 10^{-5}$  para as ECC-1, de  $2,9 \times 10^{-4} \pm 1,4 \times 10^{-4}$  para as ESI e de  $1,0 \times 10^{-4} \pm 9,2 \times 10^{-5}$  para as GI. O tratamento com a concentração de 600 nM resultou numa sobrevivência de  $3,8 \times 10^{-5} \pm 2,9 \times 10^{-5}$  para as ECC-1, de  $2,9 \times 10^{-4} \pm 1,5 \times 10^{-4}$  para as ESI e de  $1,0 \times 10^{-4} \pm 8,9 \times 10^{-5}$  para as GI. A sobrevivência das ESI foi superior à das ECC-1 ( $p < 0,001$ ) e à das GI

( $p=0,021$ ) após o tratamento com a concentração de 300 nM. No caso do tratamento com a concentração de 600 nM observou-se um resultado semelhante em que a sobrevivência das ESI foi superior à das ECC-I ( $p<0,001$ ) e à das GI ( $p=0,029$ ).

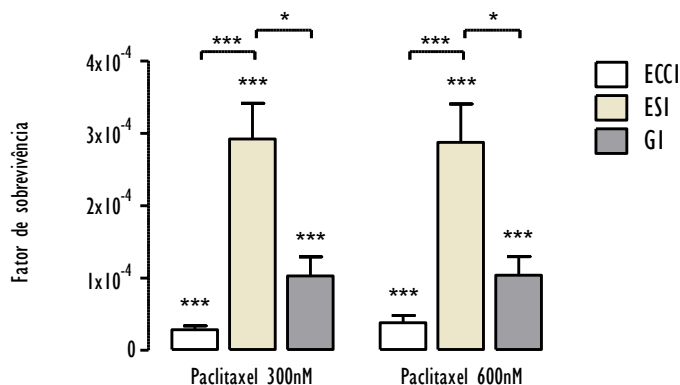


Figura 68: Sobrevivência da linha celular ECC-I, das esferas ESI e das derivadas aderentes GI após o tratamento com paclitaxel na concentração de 300 nM e de 600 nM. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos oito ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

## Morte celular

A avaliação das vias de morte nas populações ECC-I, ESI e GI submetidas ao tratamento com carboplatina na concentração de 500  $\mu$ M e com paclitaxel na concentração de 300 nM está representada na Figura 69, na Figura 70 e na Figura 71, respetivamente.

Na linha celular ECC-I não submetida a tratamento, a população de células vivas foi de  $86,92 \pm 4,50\%$ , de células em apoptose foi de  $7,34 \pm 3,90\%$ , de células em apoptose tardia/necrose foi de  $0,76 \pm 1,96\%$  e de células em necrose foi de  $4,99 \pm 4,16\%$ . Com o tratamento com carboplatina na concentração de 500  $\mu$ M, a população de células vivas foi inferior à da população controlo, com um valor de  $66,86 \pm 16,61\%$  ( $p < 0,001$ ). De forma concomitante, verificou-se que a população de células em apoptose foi superior à das células do controlo com um valor de  $23,11 \pm 11,43\%$  ( $p < 0,001$ ). No que respeita às populações em morte por apoptose tardia/necrose e por necrose verificaram-se valores de  $2,68 \pm 4,48\%$  e de  $7,34 \pm 9,52\%$ , respetivamente. Com o tratamento com paclitaxel na concentração de 300 nM, a população de células vivas foi inferior à da população controlo, com um valor de  $62,2 \pm 17,76\%$  ( $p < 0,001$ ). De forma concomitante, verificou-se que a população de células em apoptose foi superior à das culturas celulares controlo com um valor de  $18,20 \pm 8,20\%$  ( $p < 0,001$ ). No que respeita às populações em morte por apoptose tardia/necrose e por necrose verificaram-se valores de  $1,16 \pm 2,77\%$  e  $18,45 \pm 21,19\%$ , respetivamente.

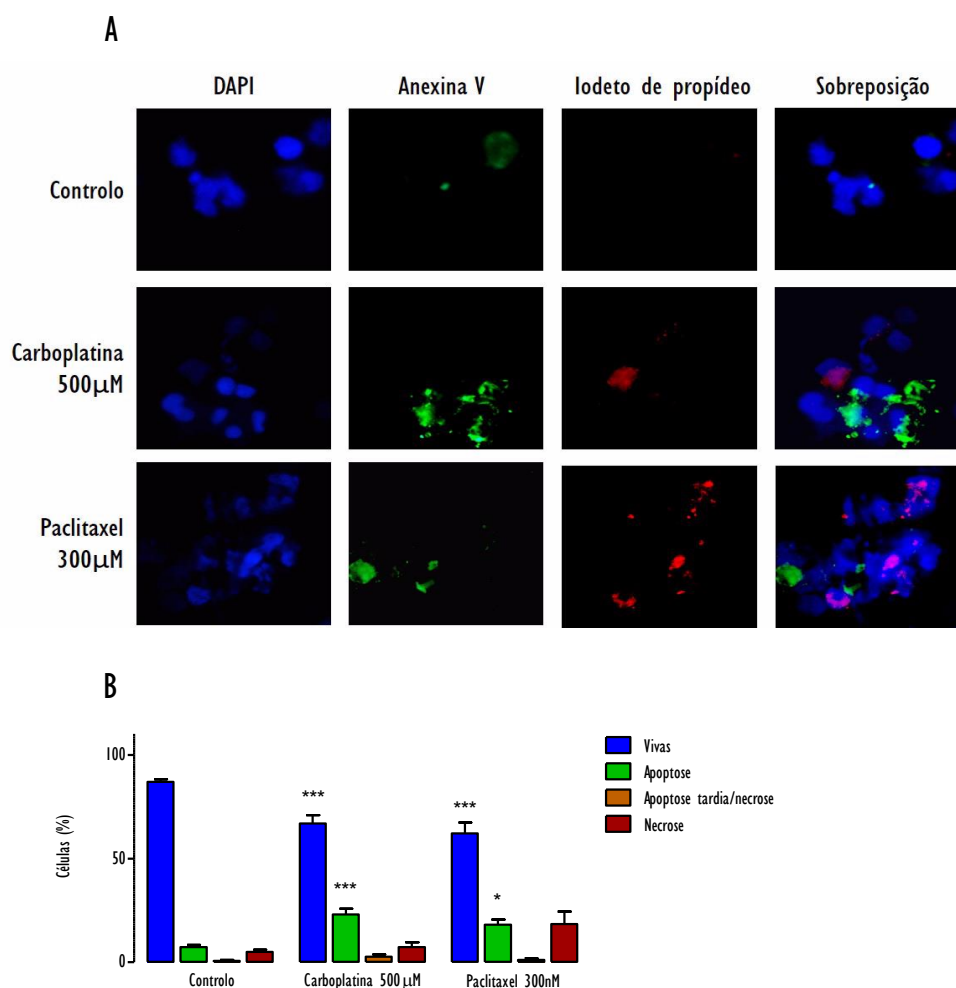


Figura 69: Tipos de morte celular nas células ECC-1 após 24 horas de tratamento com carboplatina na concentração de 500 µM e com paclitaxel na concentração de 300 nM. A figura (A) corresponde a imagens exemplificativas das obtidas no estudo das vias de morte. Na coluna da esquerda está representada a azul a marcação nuclear com DAPI, a segunda coluna mostra a coloração verde que corresponde à anexina V, a terceira coluna mostra a coloração vermelha que corresponde à marcação com iodeto de propídeo e a quarta coluna mostra a sobreposição das 3 imagens anteriores. O gráfico (B) mostra os resultados que estão representados na forma de percentagem de células vivas, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e em necrose. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de três ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

Nas esferas ESI não submetidas a tratamento, a população de células vivas foi de  $92,37 \pm 6,10\%$ , de células em apoptose foi de  $6,65 \pm 6,65\%$ , de células em apoptose tardia/necrose foi de  $0,00 \pm 0,00\%$  e de células em necrose foi de  $0,99 \pm 2,65\%$ .

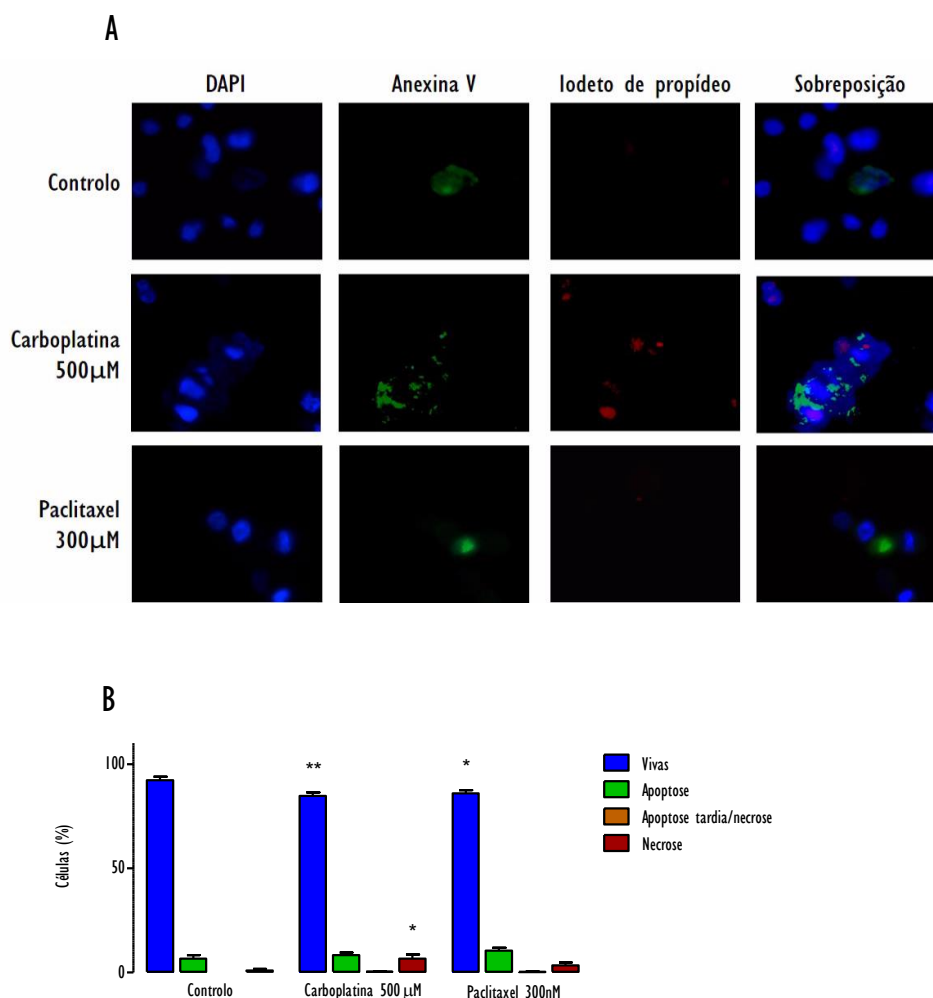


Figura 70: Tipos de morte celular nas células ESI após 24 horas de tratamento com carboplatina na concentração de 500 µM e com paclitaxel na concentração de 300 nM. A figura (A) corresponde a imagens exemplificativas das obtidas no estudo das vias de morte. Na coluna da esquerda está representada a azul a marcação nuclear com DAPI, a segunda coluna mostra a coloração verde que corresponde à anexina V, a terceira coluna mostra a coloração vermelha que corresponde à marcação com iodeto de propídeo e a quarta coluna mostra a sobreposição das 3 imagens anteriores. O gráfico (B) mostra os resultados que estão representados na forma de percentagem de células vivas, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e em necrose. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de três ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$  e com \*\* para  $p < 0,01$ .

Com o tratamento com carboplatina na concentração de 500 µM, a população de células vivas foi inferior à da população controlo, com um valor de  $84,73 \pm 5,59\%$  ( $p=0,006$ ). De forma concomitante, verificou-se que a população de células em apoptose e em apoptose/necrose foi de  $8,26 \pm 5,59\%$  e de  $0,35 \pm 1,02\%$ , respetivamente. A população de células em necrose foi superior à das células do controlo com um valor de  $6,65 \pm 7,96\%$  ( $p=0,014$ ). Com o tratamento com paclitaxel na concentração 300 nM, a população de células vivas foi inferior ao controlo, com um valor de  $86,05 \pm 6,17\%$  ( $p=0,027$ ), inferior ao

controle. A morte por apoptose, apoptose tardia/necrose e necrose foi de  $10,36 \pm 6,13\%$ , de  $0,23 \pm 0,93\%$  e de  $3,38 \pm 5,86\%$ , respectivamente.

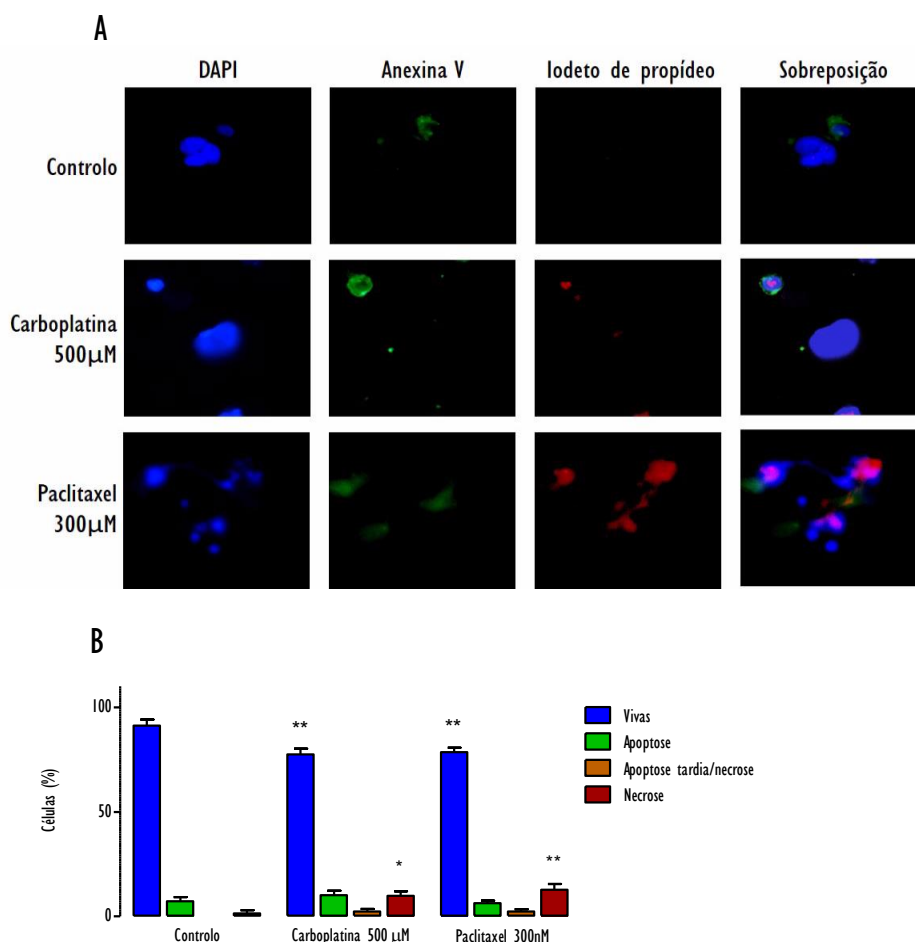


Figura 71: Tipos de morte celular nas células GI após 24 horas de tratamento com carboplatina na concentração de 500 μM e com paclitaxel na concentração de 300 nM. A figura (A) corresponde a imagens exemplificativas das obtidas no estudo das vias de morte. Na coluna da esquerda está representada a azul a marcação nuclear com DAPI, a segunda coluna mostra a coloração verde que corresponde à anexina V, a terceira coluna mostra a coloração vermelha que corresponde à marcação com iodeto de propídeo e a quarta coluna mostra a sobreposição das 3 imagens anteriores. O gráfico (B) mostra os resultados que estão representados na forma de porcentagem de células vivas, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e em necrose. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de três ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$  e com \*\* para  $p < 0,01$ .

Nas células GI não submetida a tratamento, a população de células vivas foi de  $91,22 \pm 8,57\%$ , de células em apoptose foi de  $7,30 \pm 5,79\%$ , de células em apoptose tardia/necrose foi de  $0,00 \pm 0,00\%$  e de células em necrose foi de  $1,48 \pm 4,44\%$ . Com o tratamento com carboplatina na concentração de 500 μM, a

população de células vivas foi inferior à da população controlo, com um valor de  $77,52 \pm 10,85\%$  ( $p=0,003$ ). De forma concomitante, verificou-se que a população de células em apoptose e em apoptose/necrose foi de  $10,26 \pm 7,99\%$  e de  $2,38 \pm 4,62\%$ , respetivamente. A população de células em necrose foi superior à das células do controlo com um valor de  $9,83 \pm 9,35\%$  ( $p=0,045$ ). Com o tratamento com paclitaxel na concentração 300 nM, a viabilidade foi inferior ao controlo, com um valor de  $78,59 \pm 8,29\%$  ( $p=0,007$ ). A morte por apoptose, apoptose tardia/necrose foi de  $6,33 \pm 4,97\%$ , de  $2,32 \pm 4,51\%$ , respetivamente. A população de células em necrose foi superior à das células do controlo, com um valor de  $12,76 \pm 11,37\%$  ( $p=0,009$ ).

Considerando o tratamento com carboplatina, a viabilidade celular foi superior na população ESI do que na linha parental ECC-I ( $p<0,001$ ) e na população GI não se verificaram diferenças. A morte por apoptose foi significativamente inferior na população ESI ( $p=0,001$ ) e na população GI ( $p=0,004$ ). A morte por apoptose tardia/necrose e necrose não revelou diferenças entre as linhas celulares. O tratamento com paclitaxel revelou maior viabilidade na população ESI do que na população ECC-I ( $p<0,001$ ). A morte por apoptose foi inferior na população GI comparando com a linha celular ECC-I ( $p=0,001$ ), no entanto nas esferas ESI não se observaram diferenças. A morte por necrose foi superior na população GI do que nas esferas ESI ( $p=0,035$ ).

A expressão de P53 foi avaliada após o tratamento com carboplatina na concentração de 500  $\mu\text{M}$  e com paclitaxel na concentração de 300 nM após 24 horas de incubação e os resultados estão representados na Figura 72. Considerando a linha celular ECC-I a expressão foi de  $1,14 \pm 0,24$  após o tratamento com carboplatina e de  $0,81 \pm 0,22$  para o tratamento com paclitaxel. Para as esferas ESI a expressão foi de  $1,43 \pm 0,18$  para o tratamento com carboplatina, superior à das células não submetidas ao tratamento ( $p=0,042$ ). A expressão foi de  $1,19 \pm 0,32$  para o tratamento com paclitaxel. No caso das células derivadas aderentes GI, a expressão de P53 foi de  $1,06 \pm 0,28$  para o tratamento com carboplatina e de  $1,30 \pm 0,22$  para o tratamento com paclitaxel.

A expressão de caspase 3 foi avaliada após o tratamento com carboplatina na concentração de 500  $\mu\text{M}$  e com paclitaxel na concentração de 300 nM após 24 horas de incubação, e os resultados estão representados na Figura 73. Considerando a linha celular ECC-I, a expressão de caspase 3 foi de  $0,98 \pm 0,31$  após o tratamento com carboplatina e de  $1,03 \pm 0,50$  após o tratamento com paclitaxel. No caso das esferas ESI verificou-se uma expressão de caspase 3 de  $1,27 \pm 0,30$  para o tratamento com carboplatina e de  $1,24 \pm 0,38$  para o tratamento com paclitaxel. No caso das células derivadas aderentes GI a expressão de caspase 3 foi de  $1,29 \pm 0,27$  para o tratamento com carboplatina e de  $1,36 \pm 0,61$  para o tratamento com paclitaxel.



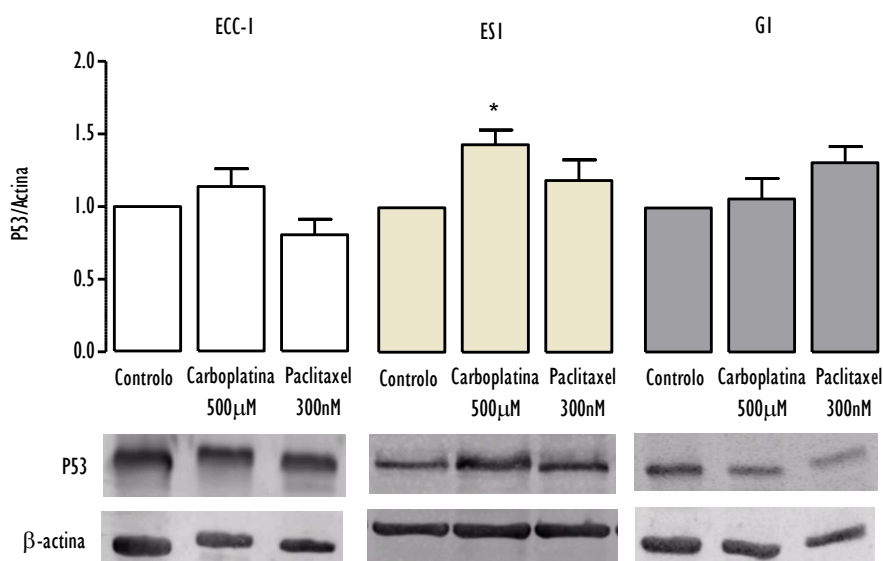


Figura 72: Expressão da proteína P53, nas células ECC-I, ESI e GI 24 horas após tratamento com carboplatina na concentração de 500  $\mu\text{M}$  e com paclitaxel na concentração de 300 nM. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da P53 e da actina e os gráficos representam a alteração relativamente às culturas não submetidas a tratamento (razão P53/actina do controlo igual a 1). Os valores apresentados exprimem a média e o erro-padrão de pelo menos quatro ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$ . As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína P53 e da actina para cada uma das condições experimentais.

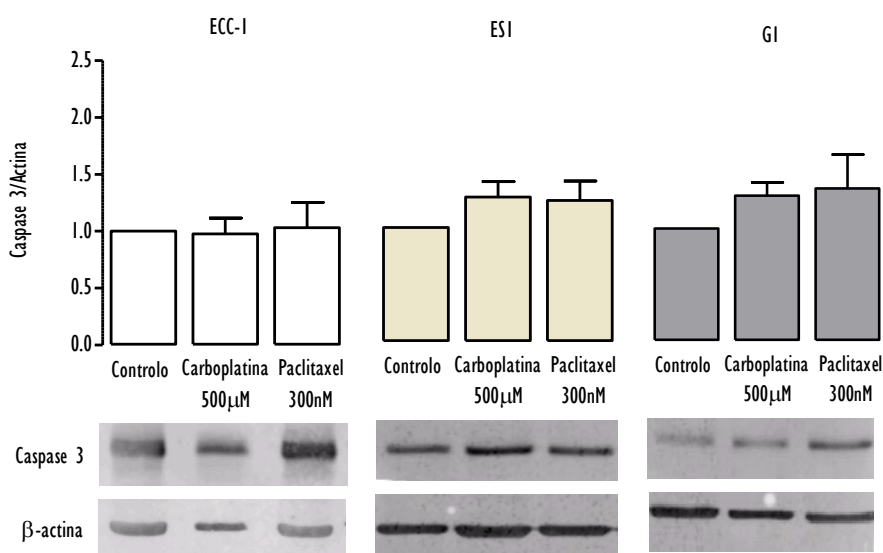


Figura 73: Expressão da proteína caspase 3, nas células ECC-I, ESI e GI 24 horas após tratamento com carboplatina na concentração de 500  $\mu\text{M}$  e com paclitaxel na concentração de 300 nM. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da caspase 3 e da actina e os gráficos representam a alteração relativamente às culturas não submetidas a tratamento (razão caspase 3/actina do controlo igual a 1). Os valores apresentados exprimem a média e o erro-padrão de pelo menos quatro ensaios. Não se observaram diferenças significativas entre as populações. As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína caspase 3 e da actina para cada uma das condições experimentais.

## Danos no DNA

A eletroforese das células em microgel fornece informações acerca do estado do DNA. No que diz respeito à distribuição do momento de cauda dos cometas para as condições controlo e para os tratamentos com carboplatina na concentração de 500  $\mu\text{M}$  e com paclitaxel na concentração de 300  $\mu\text{M}$  verifica-se uma distribuição assimétrica com cauda à direita. A Figura 74 apresenta algumas imagens ilustrativas das condições estudadas. Não se observaram cometas com o tratamento com carboplatina e foi possível observar alguns cometas com o tratamento com paclitaxel, o percentil 90 (P90) das distribuições está descrito na Tabela 10.

Para a linha celular ECC-1, o momento de cauda não apresentou diferenças comparando o tratamento com carboplatina com as culturas celulares controlo. No entanto observou-se um aumento do momento de cauda após o tratamento com paclitaxel ( $p < 0,001$ ). Nas esferas ESI, não se verificaram alterações após o tratamento com paclitaxel e com carboplatina. Nas células derivadas aderentes GI, verificou-se diminuição do momento de cauda após o tratamento com carboplatina ( $p < 0,001$ ) mas, por outro lado após o tratamento com paclitaxel verificou-se um aumento do momento de cauda ( $p < 0,001$ ).

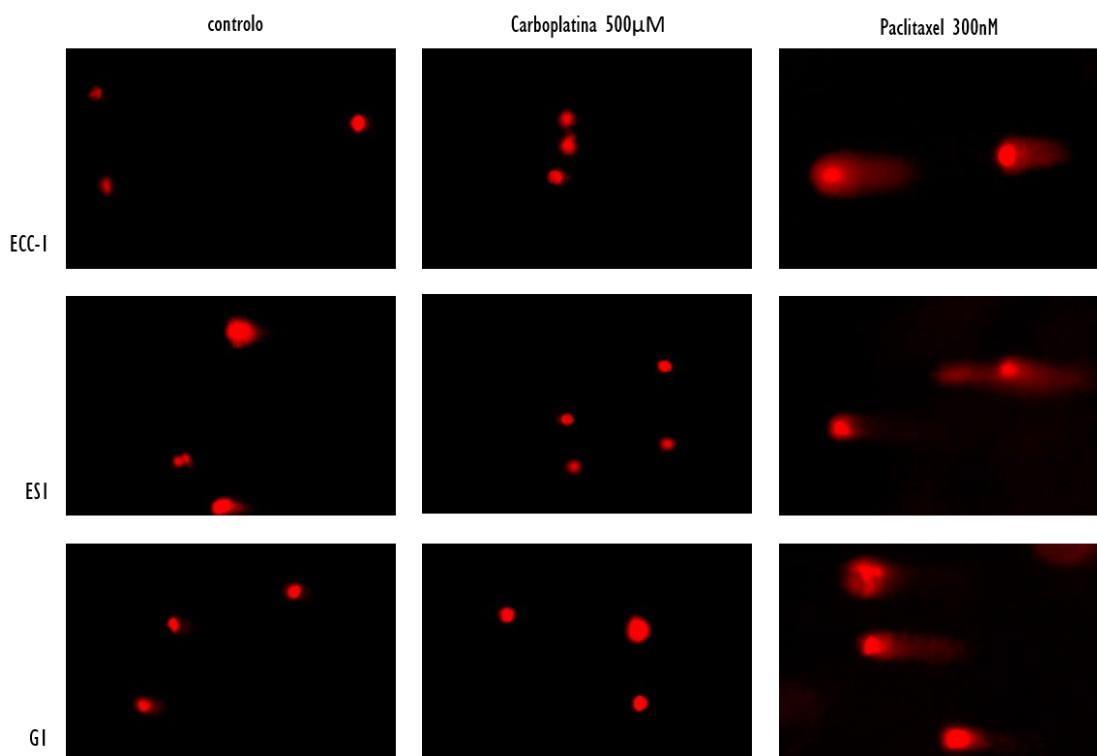


Figura 74: Imagens ilustrativas dos cometas obtidos para as células ECC-1, ESI e GI após o tratamento com carboplatina na concentração de 500  $\mu\text{M}$  e com paclitaxel na concentração de 300 nM durante 24 horas de incubação. As imagens representadas foram obtidas com uma ampliação de 400x.

Tabela 10: P90 do momento da cauda dos cometas obtidos na linha celular ECC-I, nas esferas ESI e nas células derivadas aderentes GI após o tratamento com carboplatina na concentração de 500  $\mu\text{M}$  e com paclitaxel na concentração de 300 nM.

	Controlo	Carboplatina 500 $\mu\text{M}$	Paclitaxel 300 nM
ECC-I	0	0	0,010
ESI	0,003	$3,68 \times 10^{-5}$	0,001
GI	$6,07 \times 10^{-5}$	$2,30 \times 10^{-5}$	8,11

As células das esferas ESI apresentaram momento de cauda superior às células da linha ECC-I e às células derivadas aderentes GI ( $p < 0,001$ ), sendo o momento de cauda das células GI superior ao das ECC-I. Após o tratamento com carboplatina, observou-se que o momento de cauda foi superior nas esferas ESI e nas derivadas aderentes GI do que nas células parentais ECC-I ( $p < 0,001$ ). Após o tratamento com paclitaxel, o momento de cauda das esferas ESI foi inferior ao das células da linha ECC-I ( $p = 0,021$ ), e o momento de cauda das derivadas aderentes GI foi superior ao das células parentais ECC-I e ao das esferas ESI ( $p < 0,001$ ).

## Discussão

A quimioterapia no cancro do endométrio aplica-se sobretudo no tratamento paliativo de doença recorrente ou inoperável ou em doentes submetidos a cirurgia citorrredutora (Burke *et al*, 2014a). Cerca de 25% das doentes apresenta doença extrauterina com envolvimento anexial, da vagina, dos gânglios linfáticos e de outros órgãos pélvicos, o que agrava o prognóstico (Montejo *et al*, 2009). A quimioterapia aumentou a taxa de sobrevivência na doença ganglionar para-aórtica após radioterapia, assim como em doença avançada. Vários regimes têm sido testados para avaliar a melhor taxa de resposta assim como para limitar os efeitos secundários (Burke *et al*, 2014a). A combinação de derivados da platina, paclitaxel e doxorrubicina são os regimes de quimioterapia mais utilizados no cancro do endométrio avançado ou recorrente (Sorosky, 2012). As antraciclina têm sido historicamente utilizadas no tratamento da doença avançada especialmente a combinação de doxorrubicina com cisplatina (Montejo *et al*, 2009) enquanto o paclitaxel, como agente isolado, tem-se mostrado mais ativo na doença avançada e recorrente (Hill & Dizon, 2012). O regime constituído por paclitaxel, doxorrubicina e cisplatina melhorou a sobrevivência global em mulheres com doença avançada em comparação com o regime doxorrubicina e cisplatina, com uma melhoria de 3 meses na sobrevivência livre de doença (Montejo *et al*, 2009). Dado que este regime apresentou toxicidade considerável, a combinação de carboplatina com paclitaxel tem sido amplamente adotada pois demonstrou

taxas de resposta semelhante em comparação com a combinação com as antraciclinas (Montejo *et al*, 2009). Estes regimes apresentaram melhorias médias de sobrevida de 13 a 14 meses. Estes resultados levam a encarar a investigação do tratamento médico do cancro do endométrio numa perspetiva dualista, por um lado esclarecer os mecanismos explicativos da resposta à quimioterapia convencional e por outro lado a investigação de agentes que propiciem melhores resultados.

A ciclofosfamida foi avaliada na linha celular ECC-1 e a concentração máxima testada, de 7,7  $\mu\text{M}$  obteve níveis de atividade metabólica superiores a 90% para os tempos estudados, isto é, após 24, 48 e 72 horas. Assim, pode-se afirmar que a linha celular ECC-1 apresentou uma sensibilidade reduzida a este citostático. A ciclofosfamida é um agente alquilante utilizado em doenças hematológicas malignas e em tumores sólidos. Este fármaco atua no DNA ao ligar um grupo alquil à guanina, no átomo de nitrogénio número 7 do anel imidazol e leva à ligação cruzada intra-cadeia de guanina-adenina. Esta lesão do DNA pode provocar apoptose quando os mecanismos de proteção celular não são capazes de o reparar (El-Serafi *et al*, 2014). A ciclofosfamida apresenta também um efeito imunossupressor capaz de atenuar a resposta imune humoral e a resposta mediada por células (Binotto *et al*, 2003). A metabolização ocorre via citocromo P450 dado que se trata de um pró-fármaco, sendo a forma metabolicamente ativa principal a 4-hidroxiciclofosfamida. Esta forma é parcialmente metabolizada com produção do componente inativo 2-dicloroetil-ciclofosfamida e de cloroacetaldeído, que é neurotóxico (El-Serafi *et al*, 2014). A ciclofosfamida integrou regimes de quimioterapia no cancro do endométrio com a doxorrubicina e a cisplatina, no entanto outros esquemas com menor toxicidade mostraram não ser inferiores, particularmente integrando o paclitaxel, a doxorrubicina e derivados da platina (Pawinski *et al*, 1999; Yahata *et al*, 2004; Hidaka *et al*, 2006; Hogberg, 2008). O efeito da ciclofosfamida foi avaliado por outros autores na linha celular ECC-1, utilizando a forma 4-hidroxi-ciclofosfamida e foi descrito um  $\text{IC}_{50}$  de 0,37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que corresponde a 1,42  $\mu\text{M}$  após 90 minutos de incubação. A linha celular de cancro do endométrio mais sensível à 4-hidroxi-ciclofosfamida foi a AN3 e a menos sensível foi a AE7 (Nguyen *et al*, 1991). A diferença de concentração em relação ao nosso trabalho pode ser justificada pela utilização do pró-fármaco neste estudo. A ciclofosfamida é metabolizada pelo citocromo (CYP, do inglês *cytochrome*) P450 e as células ECC-1 têm atividade CYP450 na isoforma CYP1A1, o que justifica a possível metabolização. Porém, verifica-se uma eficácia distinta da descrita para a forma metabolicamente ativa diretamente na linha celular (Nguyen *et al*, 1991; Ricci *et al*, 1999). Outros trabalhos com linhas celulares de cancro do endométrio, como o de Tanaka e colaboradores, demonstraram que a linha celular HHUA resistente ao 5-fluorouracilo foi também mais resistente à terapêutica com ciclofosfamida em comparação com a população sensível (Tanaka, 2010). Outro trabalho mostrou que na linha celular HEC-1 resistente ao paclitaxel, a resistência à ciclofosfamida foi semelhante à linha celular HEC-1 sensível ou com uma ligeira resistência cruzada. Estes dados sugerem que após quimioterapia com paclitaxel, as células

resistentes a este citostático podem manter a sensibilidade à ciclofosfamida (Tanaka *et al*, 2012). A linha celular HEC-59 foi incubada com metabolito ativo da ciclofosfamida perfosfamida e apresentou um  $IC_{50}$  de  $2,07 \pm 0,17 \mu M$ . A presença da mutação hMSH2 não influenciou a citotoxicidade, demonstrando que este gene associado à reparação do DNA não influenciou a eficácia da ciclofosfamida (Kim & Howell, 1997). A sensibilidade a este citostático é uma característica da linha celular e neste caso as ECC-I apresentaram atividade metabólica considerável com a concentração máxima testada. A pesquisa de vias associadas à reparação de DNA nesta linha celular poderá esclarecer esta pouca sensibilidade à ciclofosfamida. A associação a outros fármacos avista-se como uma possibilidade de ultrapassar os resultados da monoterapia, em analogia aos resultados com os regimes de quimioterapia na prática clínica.

Na linha celular ECC-I a doxorubicina apresentou um  $IC_{50}$  de  $7,3 \mu M$  após 24 horas, de  $287 \text{ nM}$  após 48 horas e de  $47 \text{ nM}$  após 72 horas. A linha celular apresentou uma sensibilidade à doxorubicina que está na dependência da concentração e do tempo de incubação com doxorubicina. A doxorubicina é uma antraciclina que apresenta diversos mecanismos que medeiam a morte celular. A inibição da topoisomerase II é um dos mecanismos propostos que resulta em quebras da dupla cadeia de DNA. Um outro mecanismo de lesão celular é a formação de adutos de DNA, resultado da sua intercalação que origina morte celular independente de topoisomerasas. O stresse oxidativo é outro mecanismo que resulta da oxidação da doxorubicina para um radical semiquinona, cujos radicais formados reagem rapidamente com o oxigénio e originam superóxido e peróxido de hidrogénio que provocam danos no DNA. Para além destes, ocorre sobreprodução de ceramida, que é uma molécula lipídica constituída por esfingosina e ácidos gordos, e que está envolvida em processos de apoptose e de senescência (Yang *et al*, 2014). A doxorubicina foi avaliada em diversos esquemas de quimioterapia no cancro do endométrio, em terapêutica adjuvante e em doença recorrente associada com a cisplatina e o paclitaxel, no entanto este regime apresentou uma toxicidade considerável (Wright *et al*, 2012). Outros autores, que testaram este fármaco na linha celular ECC1, obtiveram um  $IC_{50}$ , após 90 minutos de incubação, de  $0,60 \mu g/ml$ , o que corresponde a  $1,10 \mu M$ . De referir, contudo, que a metodologia foi distinta pois os referidos autores utilizaram um ensaio de deteção de ATP. Neste contexto, a linha celular ECC-I foi a mais sensível à doxorubicina entre as restantes linhas celulares testadas (AE7, AN3, HEC-1A, HEC-1B e SKUT1B) (Nguyen *et al*, 1991). Outros autores avaliaram também este fármaco noutras linhas celulares de carcinoma do endométrio. A linha celular HEC-59 apresentou um  $IC_{50}$  de  $22,4 \pm 3,8 \text{ nM}$  para a doxorubicina às 48 horas (Kim & Howell, 1997). Por sua vez as linhas celulares RL95-2 e AN-3 apresentaram  $IC_{50}$  às 72 horas de  $6,19 \pm 0,17 \mu M$  e de  $6,23 \pm 0,11 \mu M$  (Pandey *et al*, 2010). A linha Ishikawa mostrou um  $IC_{50}$  às 72 horas de  $12 \mu M$  (Wan *et al*, 2007). A doxorubicina induziu apoptose na linha celular HeLa e na linha celular Ishikawa e na linha KLE teve um efeito modesto. A proliferação celular nas linhas KLE, Ishikawa e HeLa utilizando a concentração de  $2 \mu M$

atingiram valores de proliferação de cerca de 75%, de 50% e de 25%, respetivamente (Gagnon *et al*, 2008). Após 48 horas de incubação com doxorrubicina na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , a proliferação da linha celular KLE foi na ordem de 75%. A subregulação da AKT1 e da AKT2 foi associada a reposição da apoptose em células resistentes à quimioterapia no cancro do endométrio. Na linha celular KLE transfectada para depleção de AKT, a proliferação diminuiu 20% em relação ao controlo e ativou fatores pró-apoptóticos, o que sugere o contributo da AKT, particularmente a AKT1 e a AKT2, na quimiorresistência do cancro do endométrio (Girouard *et al*, 2013). Estes estudos sugerem uma sensibilidade à doxorrubicina específica de cada linha celular, dependente do tempo e da concentração do fármaco.

A carboplatina foi testada nas concentrações de 200  $\mu\text{M}$ , de 250  $\mu\text{M}$  e de 500  $\mu\text{M}$  e observaram-se atividades metabólicas superiores a 90% após 24 e 48 horas, pelo que não foi possível determinar o  $\text{IC}_{50}$  para estes tempos. Para as 72 horas, o  $\text{IC}_{50}$  foi de 365  $\mu\text{M}$ . Neste caso, verifica-se um efeito na proliferação celular dependente do tempo e da concentração. As moléculas reativas da platina ligam-se a grupos nucleofílicos doadores de oxigénio, de nitrogénio e de enxofre. Estes grupos estão difusamente presentes na célula em cadeias de aminoácidos e nas bases purínicas do RNA ou do DNA. A ligação ao DNA forma adutos DNA-platina que são reconhecidos como responsáveis pelo mecanismo de ação. Estes adutos interferem com a transcrição e a replicação do DNA, e desencadeiam uma resposta aos danos na cromatina que resulta em apoptose. Sabe-se que apenas 5% a 10% da platina ligada covalentemente à célula está ligada ao DNA. Existem no entanto evidências que outras propriedades para além da ligação ao DNA estão envolvidas na citotoxicidade que ainda estão por esclarecer (Hato *et al*, 2014). Os derivados da platina integram esquemas terapêuticos recomendados para doença avançada no cancro do endométrio, que melhoram a resposta e intervalo livre de doença (Tate Thigpen *et al*, 2004; Colombo *et al*, 2011). Os regimes com carboplatina e com paclitaxel são utilizados frequentemente em cancro ginecológico, com taxas de resposta no cancro endometrial avançado e recorrente de 60% a 70%, sendo relativamente bem tolerados (Hogberg, 2008).

A avaliação realizada noutro estudo com ECC-1 demonstrou um  $\text{IC}_{50}$  de 1,31  $\mu\text{g/mL}$ , correspondente a 3,53  $\mu\text{M}$ , após 90 minutos de incubação. A linha celular com maior sensibilidade à carboplatina foi a SKUTIB e a mais resistente a AE7 (Nguyen *et al*, 1991). A linha celular Ishikawa mostrou sensibilidade à carboplatina de forma dependente da concentração (concentrações de 5 a 100  $\mu\text{g/mL}$ ), avaliada pela contagem de células às 48 horas. Neste estudo os autores verificaram efeito mínimo às 24 horas com a concentração máxima testada e a maioria dos efeitos foram observados às 48 horas (Hoekstra *et al*, 2008). A carboplatina inibiu o crescimento de células RL95 de modo dependente da dose e a inibição de crescimento induzido por concentrações entre 0,2  $\mu\text{g/mL}$  a 200  $\mu\text{g/mL}$  variou entre 78% a 1% (Saunders *et al*, 1993). A cisplatina foi também testada em linhas celulares de cancro do endométrio, com níveis de proliferações de cerca de 25 a 50% para a linha celular HeLa, aproximadamente 50% para a linha celular

Ishikawa e cerca de 75% para a linha celular KLE observadas para a concentração de 20  $\mu\text{M}$  após 48 horas de incubação (Gagnon *et al.*, 2008). Outros autores testaram a carboplatina e a cisplatina nas linhas celulares MES-SA, RL95-2, HEC-1A e HEC-1B. A carboplatina foi mais citotóxica na linha MES-SA, com  $\text{IC}_{50}$  na de 12,1 ng/ml (2,69 nM) após 72 horas de incubação (Smith *et al.*, 2004). Na linha celular A-MEC, o  $\text{IC}_{50}$  às 48 horas foi de 16,5  $\mu\text{g/mol}$  (4,44  $\mu\text{M}$ ) (Kondo *et al.*, 2006). Ainda noutro estudo com a linha celular HEC-1 o  $\text{IC}_{50}$  às 72 horas de incubação foi de 59,1 nM (Matsuzaki *et al.*, 2014). Assim, em diversos estudos como no nosso trabalho, as linhas celulares de cancro do endométrio apresentaram uma suscetibilidade distinta aos derivados da platina.

A linha celular ECC-1 apresentou um  $\text{IC}_{50}$  para o paclitaxel às 24 horas de 87,1 nM, às 48 horas de 5,6 nM e às 72 horas de 884,0 pM, sendo de salientar também uma dependência do tempo e da concentração do fármaco. Os taxanos apresentam uma estrutura química que interage com os microtúbulos, levando à estabilização da tubulina originando uma disrupção na fisiologia dos microtúbulos. Deste modo a proliferação celular é inibida pela alteração do ciclo celular na metáfase e pela formação de uma placa metafásica incompleta. Outro efeito associada à administração de doses reduzidas de forma contínua, consiste na influência na vascularização do tumor e no microambiente associada à administração de doses reduzidas de forma contínua, à custa da citotoxicidade para as células endoteliais (de Weger *et al.*, 2014). O paclitaxel integra esquemas de quimioterapia na doença avançada e recorrente em associação com os derivados da platina e com a doxorrubicina. Como referido, atualmente, a associação com carboplatina é a mais utilizada dada a melhor tolerância (Sorosky, 2012; Wright *et al.*, 2012).

A sensibilidade ao paclitaxel foi testada por outros autores noutras linhas de cancro do endométrio, nomeadamente na HeLa, na Ishikawa e na KLE e a concentração de 0,10  $\mu\text{M}$  resultou numa proliferação de cerca de 25%, entre os 25% e os 50% e de aproximadamente 100%, respetivamente para cada linha celular (Gagnon *et al.*, 2008). A linha celular KLE, noutro estudo, apresentou uma percentagem de proliferação entre os 50% e os 75% depois de 48 horas de incubação com 0,05  $\mu\text{M}$ . Adicionalmente, a deficiência em AKT1 e AKT3 tornou as células mais sensíveis ao paclitaxel em comparação com o controlo, mostrando a importância desta via na resistência ao paclitaxel (Girouard *et al.*, 2013). A linha celular A-MEC apresentou um  $\text{IC}_{50}$  às 48 horas de 9,4 ng/mL (10,54nM) (Kondo *et al.*, 2006).

Os estudos de citotoxicidade *in vitro* constituem uma plataforma de avaliação da sensibilidade aos agentes de quimioterapia. Alguns autores realizaram estudos com amostras de tumores humanos do endométrio de doentes em que as células viáveis foram testadas com diferentes citostáticos isolados ou em associação, nomeadamente a doxorrubicina, com a cisplatina e o paclitaxel ou a carboplatina com o paclitaxel. A sensibilidade ao tratamento, avaliada por um ensaio de apoptose, utilizando um único agente citostático foi a opção com melhores resultados em 25% dos casos e o agente isolado com maior atividade foi o paclitaxel

(Ballard *et al*, 2010), pelo que este trabalho reforçou a possibilidade de aplicação clínica personalizada dos estudos de citotoxicidade. A sensibilidade das linhas celulares de cancro do endométrio aos citostáticos é variável. Assim, sugere-se que cada tumor pode apresentar uma resposta distinta aos citostáticos que vai depender da população celular que o constituiu.

O estudo da sensibilidade das populações celulares que constituem o tumor, nomeadamente a população com propriedades de CSC foi outro objetivo deste estudo experimental. Os ensaios do MTT e do *Alamar Blue*<sup>®</sup> foram utilizados para avaliar a citotoxicidade nas populações aderentes e em suspensão, respetivamente. A linha ECC-I foi avaliada pelas duas metodologias e não foram detetadas diferenças significativas no que respeita à atividade metabólica. O ensaio do MTT avalia a atividade metabólica e é habitualmente utilizado para detetar a perda de viabilidade celular devido ao efeito de um composto. Este ensaio pode subestimar a lesão celular e morte celular uma vez que deteta estádios mais avançados da apoptose quando a atividade metabólica da célula já está diminuída (Stacey, 2011). O ensaio *Alamar Blue*<sup>®</sup> contém um indicador redox que sofre alterações da fluorescência e da colorimetria na dependência da oxidação-redução do metabolismo das células. As células em crescimento provocam redução do *Alamar Blue*<sup>®</sup> e a inibição do crescimento provoca oxidação (Blumenthal & Goldenberg, 2007). Outros autores também compararam estes dois ensaios e, do mesmo modo que no nosso trabalho, reportaram que o IC<sub>50</sub> era comparável em ambos os ensaios na maioria dos citostáticos estudados. Contudo, o ensaio do *Alamar Blue*<sup>®</sup> foi ligeiramente mais sensível uma vez que pode detetar um menor número de células por poço (Hamid *et al*, 2004).

Após a avaliação da atividade metabólica dos citostáticos na linha celular ECC-I foi estudado no seu efeito nas várias gerações de esferas e nas gerações de derivadas aderentes. A ciclofosfamida apresentou uma atividade metabólica superior a 90% em todas as populações. Um dos mecanismos descritos para a resistência à ciclofosfamida é a expressão de MRP1, a qual foi preditiva de pior prognóstico no cancro da mama em doentes tratadas com este citostático (Coley, 2008). A sobre-expressão de ALDH1A1 e ALDH3A1 foi também associada a mecanismos de resistência à ciclofosfamida pela destoxificação do metabolito ativo (Coley, 2008). A resistência à ciclofosfamida foi associada com a sobre-expressão de ALDH1A2 e ALDH2 em linhas celulares de cancro do pulmão e leucemia (Moreb *et al*, 2012). A sensibilidade a este fármaco em esferas de outros tumores sólidos não foi ainda descrita. No nosso estudo experimental, o ensaio clonogénico mostrou uma sobrevivência celular aos 12 dias de cerca de metade da população celular da linha parental ECC-I e das derivadas aderentes G1. No caso da população de esferas ESI, o fator de sobrevivência atingiu o valor mais elevado, com uma razão de 0,65, apesar de não apresentar uma diferença significativa em relação às outras populações. Nesta população, a sobre-expressão de ALDH pode contribuir para a resistência à ciclofosfamida.



Com a doxorubicina na maior concentração testada, 7,3  $\mu\text{M}$ , as populações derivadas aderentes G1 e G2 apresentaram maior atividade metabólica que a linha celular de origem ECC-1. Nas esferas, observou-se maior atividade metabólica do que em ECC-1, o que aponta para maior resistência da população com propriedades de CSC *in vitro*. Nas concentrações de 300 nM e 7,3  $\mu\text{M}$  as esferas apresentaram maior atividade metabólica em todos os tempos estudados. Outros autores descreveram a resistência à doxorubicina em populações com propriedades de CSC do cancro do endométrio. A doxorubicina também reduziu menos a viabilidade de esferóides tridimensionais da linha celulares de cancro do endométrio Ishikawa, RL-95 e KLA em relação à cultura em monocamada. Para a linha celular RL95-2 a apoptose foi reduzida nos agregados em suspensão em comparação com a monocamada. A superóxido dismutase foi avaliada durante o tratamento com doxorubicina e a sua expressão foi não só superior nas células em cultura tridimensional como se manteve durante o tratamento (Chitcholtan *et al*, 2012). As células da população lateral da linha celular de carcinoma do endométrio RK12V foram mais resistente à doxorubicina, apresentando uma inibição de proliferação de 56% (Kato *et al*, 2011).

Outros autores reportaram maior resistência da população de esferas à doxorubicina (Fukamachi *et al*, 2013; Liu *et al*, 2015; Zhang *et al*, 2015). O tratamento com doxorubicina e o inibidor da via PI3K/AKT aumentou a apoptose e reduziu a viabilidade nas células das esferas. Estes autores verificaram que esta via estava sobre-expressa nas células tratadas com doxorubicina o que sugere uma associação com a quimiorresistência a esta antraciclina (Zhang *et al*, 2015). De modo semelhante, esferas de cancro gástrico CD49<sup>high</sup> e do cancro da próstata foram mais resistentes a vários citostáticos incluindo a doxorubicina (Fukamachi *et al*, 2013; Liu *et al*, 2015).

A resistência à doxorubicina da população de CSC pode ser devida à intervenção de diversas vias moleculares. Uma delas é a via AKT, que pode estar associada à resistência à doxorubicina e que foi descrita em linhas celulares de endométrio, e cujas isoformas são ativadas por fatores de crescimento dependentes da PI3K (Gagnon *et al*, 2008). O gene *P TEN* na forma selvagem foi associado ao aumento da sensibilidade à doxorubicina na linha celular Ishikawa e este gene tem influência na ativação da apoptose pela subregulação da via PI3K/AKT/PKB (Wan *et al*, 2007) Foram ainda identificados genes-alvo que são responsáveis por resistência à doxorubicina em linhas celulares do endométrio. Mais de 20 vias canónicas foram associadas com a resistência à doxorubicina, incluindo vias de sinalização do recetor de células B, ativação do recetor da vitamina D/retinoide X, vias de recetores de morte, via de sinalização da IL-6, via de sinalização de proteínas de fase aguda, via de sinalização do CD40 e do recetor acoplado à proteína-G (Indermaur *et al*, 2010). Outros mecanismos de resistência podem também estar envolvidos na resistência à doxorubicina, nomeadamente intervenção das proteínas ABC, como a ABCG2, descrita em CSC de tumores gastrointestinais e da mama (An & Ongkeko, 2009). O tratamento com este citostático modifica as interações

intercelulares, expondo as células centrais das esferas aos nutrientes o que permite a manutenção da sua proliferação (Green *et al*, 2004). Estes dados podem ser correlacionados com os resultados obtidos no nosso estudo através do ensaio clonogénico, relativos à sobrevivência das populações de esferas. Com a menor concentração testada, a população de esferas teve o valor médio do fator de sobrevivência mais elevado, no entanto sem diferenças em relação às populações aderentes.

No nosso estudo o tratamento com carboplatina resultou numa atividade metabólica inferior nas populações derivadas aderentes G1, G2 e G3 em relação à linha celular parental ECC-1 para as 72 horas de incubação com a concentração de 200  $\mu\text{M}$  e às 48 e 72 horas na concentração de 500  $\mu\text{M}$ . As populações de esferas ES1, ES2 e ES3 não apresentaram diferenças em relação à linha parental ECC-1, não se apontando um aumento da atividade metabólica nesta população com propriedades de CSC. No entanto, encontra-se descrita a resistência aos derivados da platina em células com propriedades de CSC no cancro do endométrio. No caso da população lateral da linha celular de carcinoma do endométrio RK12 também não se verificou qualquer inibição com a cisplatina comparando com o controlo que apresentou uma inibição de 61% (Kato *et al*, 2011). Na linha celular Ishikawa na subpopulação CD133<sup>+</sup> o tratamento com cisplatina na concentração de 2  $\mu\text{mol/L}$ , de 4  $\mu\text{mol/L}$ , de 8  $\mu\text{mol/L}$ , e de 16  $\mu\text{mol/L}$  resultou numa viabilidade de 101%, de 78%, de 62% e de 30%, respetivamente que foi também significativamente superior à subpopulação CD133<sup>-</sup>. Na linha celular MFE280, o tratamento com cisplatina na concentração de 6  $\mu\text{mol/L}$  e de 12  $\mu\text{mol/L}$  resultou numa viabilidade de 89% e 56 %, respetivamente, em relação ao controlo e de 99% e 107% em relação à subpopulação CD133<sup>-</sup> (Nakamura *et al*, 2010). A subpopulação CD133<sup>+</sup> apresentou apoptose negligenciável após o tratamento com cisplatina em comparação com a população CD133<sup>-</sup> (Rutella *et al*, 2009). A subpopulação CD133<sup>+</sup> foi superior nas células Ishikawa resistentes à cisplatina em relação à linha de origem. Na população resistente à cisplatina, as células com expressão de recetores de androgénios apresentaram sobre-regulação de proteínas associadas à resistência a fármacos como a MDR-1, a ABCG2 e a ABCB5 (Chen *et al*, 2013). Estes dados sugerem que também as proteínas ABC têm uma função importante na resistência aos derivados da platina.

Vários outros autores estudaram a sensibilidade aos derivados da platina em populações de esferas doutros tipos de tumores. A população de esferas de retinoblastoma apresentou maior resistência à carboplatina comparando com a população diferenciada, traduzindo-se por um IC<sub>50</sub> superior nas esferas (Ma *et al*, 2011). A capacidade de formação de esferas de linhas celulares de mesotelioma submetidas a cisplatina foi diferente em três linhas celulares estudadas. Numa delas esta capacidade foi reduzida após 48 horas e aumentou após 72 horas, noutra ocorreu às 72 horas e na última diminuiu com o tempo de incubação. As subpopulações ALDH<sup>high</sup> e ALDH<sup>low</sup> apresentaram esferas resistentes à cisplatina (Cortes-Dericks *et al*, 2014). O impacto da cisplatina na formação de esferas de cancro do ovário foi diminuto e a

viabilidade celular foi superior na população de esferas em relação à linha celular de origem (Wang *et al*, 2013). A população em suspensão de cancro da próstata também mostrou maior resistência à cisplatina que a população aderente (Fan *et al*, 2012). As esferas derivadas da linha celular de ovário A2780 foram mais resistentes à cisplatina (Wang *et al*, 2013). No entanto no presente estudo com esferas de endométrio não se verificou maior resistência desta população à carboplatina em relação à linha celular parental ECC-1. Por outro lado as populações com diferenciação aderente, G1, G2 e G3, foram mais sensíveis à carboplatina que a população de esferas. O fator de sobrevivência foi reduzido nestas populações e não se observaram diferenças entre as células parentais ECC-1, as esferas ES1 e as derivadas aderentes G1.

Na resistência à carboplatina podem estar implicados diversos mecanismos, que não estarão sobre-regulados na população de esferas em relação à linha celular de origem ECC-1. A sensibilidade e a resistência aos derivados da platina têm, subjacente, diversos mecanismos. A carboplatina e a cisplatina são análogos que diferem em propriedades farmacodinâmicas e nos efeitos secundários (Burger *et al*, 2010). A captação, que no caso da cisplatina, é assegurada pelo transportador de cobre, que ao ser degradado resulta em resistência ao fármaco por diminuição do seu influxo. Outros mecanismos descritos para a diminuição da sensibilidade a estes fármacos são a indução de stress oxidativo, a modulação da sinalização do cálcio, em que a disrupção origina peroxidação lipídica e inibição enzimática, a indução de apoptose, mecanismos envolvendo a proteína cinase C, a via MAPK, AKT, a sinalização do dano de DNA, a ativação da P53, entre outros (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014). Os mecanismos de resistência descritos para a cisplatina foram separados em resistência pré-alvo (do inglês, *pre-target*) no alvo, (do inglês, *on-target*) e pós-alvo (do inglês *post-target*). Em relação aos mecanismos *pre-target*, podemos incluir a diminuição da captação pelo transportador membranar de cobre, o aumento do efluxo por ATP7A/ATP7B e por MRP2 e o aumento da inativação por intervenção da glutathione reduzida, da  $\gamma$ -glutamylcisteína-sintetase, glutathione-S-transferase e de metalotioneínas (Galluzzi *et al*, 2012). Os mecanismos *on-target* correspondem a aumento da eficiência de reparação de nucleótido excisado, a deficiência de genes reparadores de DNA como o MLH1 e o MSH2, o aumento da tolerância às lesões do DNA, aumento da eficiência de recombinação homóloga e de proteínas de ligação à cisplatina (Galluzzi *et al*, 2012). Por último, os mecanismos *post-target* correspondem a mediadores pró-apoptóticos BAX, anti-apoptóticos BCL-2 e outros como a survivina, a calpeína, as caspases, a MAPK1 e a P53 (Galluzzi *et al*, 2012). No caso das CSC da linha celular ECC-1, pode existir uma inibição dos mecanismos de resistência aos derivados da platina.

Os nossos resultados mostraram que o tipo de morte celular induzido pelo tratamento com a carboplatina na concentração de 500  $\mu$ M na linha celular ECC-1 foi a apoptose, no entanto na população de esferas ES1 a apoptose decresceu e a morte por necrose foi superior ao controlo, assim como na população de derivadas aderentes G1. Estes dados são descritos para as 24 horas de incubação, num tempo em que é possível

avaliar a ativação da via de morte numa fase inicial do tratamento. A apoptose é um tipo de morte celular que apresenta duas vias principais, a via extrínseca e a via intrínseca. A via extrínseca é iniciada por recetores da membrana celular como a família de recetores TNF, o recetor para o TRAIL (do inglês, *TNF related apoptosis inducing ligand*) ou para o FAS (do inglês, *tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*). O complexo intracelular oligomérico sinalizador da indução de morte (DISC, do inglês *intracellular death-inducing signaling complex*), formado pelos domínios intracelulares de morte, aciona o recrutamento das pró-caspases 8 e 10, ativadas por clivagem proteolítica. Estas caspases ativadas clivam a pró-caspase 3 e 7 que são executoras da apoptose. A via intrínseca é iniciada por stresse oxidativo celular que resulta em perda de potencial de membrana mitocondrial e consequente libertação de citocromo C da mitocôndria. Este associa-se ao APAF1 causando formação de um complexo apoptossoma ativo que integra a ativação da pró-caspase 9 e pode ativar a caspase 3 e 7 (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014).

A inibição da apoptose é um mecanismo descrito em populações com propriedades de CSC do endométrio. Trabalhos de outros autores já mencionados, a subpopulação CD133<sup>+</sup> apresentou níveis reduzidos de apoptose com o tratamento de cisplatina e na subpopulação CD133<sup>-</sup> foi detetado um aumento de células apoptóticas que aumentou com concentrações superiores de cisplatina (Rutella *et al*, 2009). Noutro estudo com as linhas celulares Ishikawa, KLE e RL95-2 em cultura bidimensional e tridimensional na forma de esferóides, não houve produção de células apoptóticas com o tratamento com a cisplatina em nenhuma das linhas celulares (Chitcholtan *et al*, 2012). Outros autores avaliaram uma linha celular de endométrio KLE que foi transfectada com AKT e onde se avaliou a influência na apoptose induzida pela cisplatina. A morte celular foi superior nas células com deficiência de AKT1, com aumento de 30% enquanto nas células com deficiência em AKT2 se verificou um aumento de 50%. A apoptose foi induzida nas células com deficiência em AKT1 e AKT2 (Girouard *et al*, 2013). A morte por apoptose foi igualmente descrita em populações de esferas de outros tipos de cancro, em especial no cancro do ovário, onde na linha celular A2780, em que a apoptose foi induzida após tratamento com cisplatina, o que não se verificou na população de esferas esta indução não se verificou (Wang *et al*, 2013). Assim, um dos mecanismos subjacentes à resistência aos derivados da platina é a resistência à apoptose que é uma característica descrita para as CSC.

No nosso trabalho experimental, o decréscimo da apoptose na população de esferas em relação à linha celular ECC-1 motivou a compreensão dos mecanismos subjacentes a este fenómeno. A mutação da P53 está descrita como atenuante da morte celular e mediadora de resistência a fármacos. Paralelamente foi associada a expressão do gene de multirresistência MDR-1 pela estimulação do seu promotor. Outro mecanismo reside na modulação de genes que regulam a morte celular como a elevação de genes anti-apoptóticos *BCL-XL 3* e subregulação do gene pró-apoptótico *FAS*. A P53 está ainda implicada na regulação de mi-RNA tendo sido descrita expressão destas moléculas, que conferem resistência à terapêutica, nos cancros do pulmão, da

mama e colorretal (Shetzer *et al*, 2014). No cancro humano a mutação da P53 associa-se a um prejuízo da sua função e a forma selvagem é degradada por um mecanismo mediado pela ATM (Gajjar *et al*, 2012). A mutação da P53 resulta num fenótipo de resistência independente da transcrição e do controlo dos *checkpoints* do ciclo celular. A proteína mutada resulta num fenótipo quimiorresistente e radiorresistente através da ativação da P53, da paragem do ciclo celular e de alterações da reparação do DNA (Cuddihy *et al*, 2008). As mutações da P53 estão já descritas em linhas celulares de cancro do endométrio (Kamata *et al*, 2004). No nosso trabalho experimental a expressão de P53 na linha celular ECC-1 não mostrou diferenças em relação ao controlo, o que sugere que não terá um papel na apoptose detetada como resultado do tratamento com a carboplatina. Para além deste facto a sua eventual mutação prejudicará a sua função reparadora. A apoptose nesta população deverá ser mediada por outras vias. Por outro lado nas esferas ESI, após exposição à carboplatina, observou-se uma sobre-expressão que não se correlacionou com aumento de apoptose.

Outros autores avaliaram a expressão de P53 em células resistentes aos derivados da platina. As células de carcinoma espinhocelular da cabeça e do pescoço com mutação da P53 resultante em retenção no citoplasma e resistentes à cisplatina, sobre-expressaram as proteínas ABCC2 e ABCG2. A atividade metabólica e os níveis de glutathione foram superiores nas células resistentes, com mutação P53, de forma consistente com capacidade de defesa dos efeitos citotóxicos oxidativos (Tonigold *et al*, 2014). Recentemente foi demonstrado que a várias enzimas metabólicas são modificadas transcriptionalmente pela cisplatina e que são alvos do regulador primordial da transcrição da reparação do dano de DNA, a P53 (von Stechow *et al*, 2013). Num modelo *in vitro* com células de cancro do pulmão as células resistentes à cisplatina com expressão de P53 mutada, não sofreram ressensibilização pela sobre-expressão da forma mutada o que corrobora o prejuízo da sua função (Cuddihy *et al*, 2008). Correlacionando estes dados com o nosso estudo experimental, sugere-se que mesmo com a elevação da P53 observada na população de esferas ESI submetida a carboplatina, a sua intervenção será funcionalmente limitada pela provável associação à forma mutada. Na população derivada aderente GI a P53 não sofreu modificação de expressão, provavelmente pela intervenção de outras vias na indução de morte. Nas populações ESI e GI a necrose foi superior ao controlo. A morte celular por necrose foi anteriormente considerada um processo passivo e não controlado mas, mais recentemente, verificou-se que esta via de morte é dependente de vias de sinalização. A indução de apoptose e de catástrofe mitótica, um processo de morte celular que ocorre durante ou após uma mitose alterada, podem ser acompanhadas por necrose. A necrose requer a ativação da PARP, mas não é suficiente para determinar o destino da célula. Nesta via, a deficiência de P53 e BAX não impedem a morte celular em resposta à lesão do DNA (Pruschy, 2009). A catástrofe mitótica independente de caspases pode induzir várias anomalias celulares que culminam em morte por necrose (Portugal *et al*, 2010). Esta via parece

compatível com uma morte independente de P53 e de caspase 3, conforme ocorre nas populações ESI e GI do nosso estudo experimental.

Dos nossos resultados experimentais, a expressão de caspase 3 não apresentou diferenças em relação ao controlo após o tratamento com carboplatina na linha celular ECC-I. No entanto, a apoptose foi superior na linha celular ECC-I e não se verificou associação com a sobre-expressão de pró-caspase 3. De facto estão descritos estudos que mostraram que a cisplatina pode ativar o ciclobutanedicarboxilato que é um substrato da caspase e a clivagem proteolítica mostrou ter importância na apoptose induzida por cisplatina (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014). Sabe-se, porém, que a ativação de caspases é frequente mas não suficiente como indicador de apoptose (Portugal *et al*, 2010). Um estudo com células do ovário tratadas com cisplatina mostrou ativação da caspase 3 (Li *et al*, 2000). Noutro trabalho com uma linha celular de endométrio, a deficiência de AKT1 e AKT2 induziu apoptose após tratamento com cisplatina e verificou-se ativação de pró-caspases incluindo a caspase 3 (Girouard *et al*, 2013). As caspases podem contribuir para a morte celular de duas formas. Numa delas a ativação da caspase constituiu um sinal e não um mecanismo de morte celular. A ativação massiva de caspases é suficiente para a morte celular mas a sua inibição não é suficiente para evitar a morte. A outra forma das caspases ativarem a morte é por ligação de transdução de sinal ou sistema sensor de lesão do DNA. Neste caso a inibição de um iniciador da caspase pode interromper o sinal pró-apoptótico a montante e inibir a morte celular. No entanto, os sinais mediados pelo CD95 ou recetor do TNF são transmitidos por sinais independentes de caspases. Deste modo os inibidores das caspases protegem a célula da morte apenas em circunstâncias limitadas (Kroemer & Martin, 2005). No nosso estudo, a morte por apoptose provocada pela carboplatina nas ECC-I será um processo independente de caspases. Nas populações de esferas ESI e nas derivadas aderentes GI, a apoptose não aumentou em relação ao controlo, tendo estas populações sofrido um processo de necrose. Neste processo não está habitualmente envolvida a ativação de caspases, conforme descrito noutros estudos (Galluzzi *et al*, 2014). Um outro estudo recente demonstrou que a perda de caspase 3 sensibiliza as células de cancro do cólon a agentes genotóxicos pela promoção de RIPI (do inglês *receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase-1*), de pró-caspase 8 e de necrose dependentes de ROS, sem bloquear a apoptose. A pró-caspase 8 promove a necrose após lesão do DNA na célula tumoral. A caspase 3 ou o RIPI são dispensáveis na apoptose induzida por lesão do DNA devido à ativação de outras caspases ou via a jusante independente da P53, mediada pelo NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa B, do inglês *nuclear fator kappa B*)/TNF $\alpha$  (Brown *et al*, 2015). No nosso estudo, a ausência de sobre-expressão de caspase 3 implica provável ativação da apoptose por outra via na linha celular ECC-I quando submetida a carboplatina. Possivelmente esta ausência de expressão pode elucidar a via TNF- $\alpha$  que culmina em necrose nas esferas ESI e nas derivadas aderentes GI, onde a apoptose não aumentou com a carboplatina.

No nosso estudo experimental, o ensaio cometa avaliou os danos no DNA provocados pelos citostáticos na linha celular ECC-1, nas esferas ESI e nas células derivadas aderentes G1. O DNA não fragmentado mantém-se bem organizado no núcleo, correspondendo à cabeça do cometa, enquanto o DNA fragmentado, resultante da lesão celular, se acumula na cauda. Este método permite detetar quebras de cadeia única e de dupla cadeia (Apostolou *et al*, 2014). O efeito da carboplatina nas células ECC-1, nas esferas ESI e nas células derivadas aderentes G1 levou à formação de poucos cometas. As células derivadas aderentes G1 apresentaram o maior número de células com momentos de cauda acima do percentil 90, no entanto destaca-se que alterações correspondentes a esta ordem de grandeza só ocorrem num número reduzido de células. O efeito citotóxico primário dos derivados da platina consiste na formação de adutos de DNA, daí que outros trabalhos tenham também reportado caudas pouco evidentes (Baldassarre *et al*, 2005). O ensaio cometa constitui uma forma de avaliar a genotoxicidade. No entanto, uma das causas de menor migração do DNA são as ligações cruzadas intercadeia (do inglês *interstrand crosslinking*) que previnem a separação das cadeias de DNA, limitando a sua replicação. Este efeito citostático está descrito para os derivados da platina (Wu & Jones, 2012; Krainak *et al*, 2015). A maioria das ligações cruzadas provocadas pela cisplatina induz mecanismos de reparação que incluem a sua excisão. Uma das estratégias para aumentar a sensibilidade das células tumorais ao dano pelos derivados do platina é a indução de quebras de dupla cadeia. Neste contexto, a endoglina, uma glicoproteína membranar quando inibida aumenta a sensibilidade à cisplatina em células de cancro do ovário, como foi demonstrado por um aumento da proeminência da cauda dos cometas (Ziebarth *et al*, 2013). No presente estudo experimental, o ensaio cometa não foi consistente com a fragmentação do DNA nas primeiras 24 horas de incubação com carboplatina nas populações estudadas. No entanto, apesar de não existir migração do DNA podem existir danos à custa das ligações cruzadas intercadeia. Este efeito deverá ser variável de acordo com a concentração do fármaco, o tempo de incubação e o tipo de células, o que terá implicações no complexo de interações intra e intercadeia de DNA e seus mecanismos de reparação.

No nosso estudo as populações de esferas ESI, ES2 e ES3 apresentaram maior resistência ao paclitaxel. Em todas as concentrações e em todos os tempos, estas populações apresentaram atividade metabólica superior à linha de origem ECC-1. Quanto às populações derivadas aderentes, G1, G2 e G3, também se verificou maior resistência, constante nos tempos de incubação mais elevados, como as 48 e as 72 horas. O ensaio clonogénico avaliou a sobrevivência após 12 dias e a população ESI apresentou maior fator de sobrevivência em relação às células parentais ECC-1 e às derivadas aderentes G1, salientando-se que representa uma pequena fração da população. Apesar desta população ser reduzida, esta será a responsável pela manutenção do crescimento de células tumorais resistentes a este citostático. A resistência ao paclitaxel foi reportada por outros autores noutras populações com propriedades de CSC de cancro do endométrio. A

população lateral da linha celular AN3CA submetida a paclitaxel na concentração de 100nM apresentou viabilidade superior a 90%, quando comparada com o controlo (Friel *et al*, 2008). A subpopulação CD133<sup>+</sup> de tumores do endométrio apresentou níveis negligenciáveis de apoptose em comparação com a subpopulação CD133<sup>-</sup>. Foram detetadas células apoptóticas nesta população e a sua percentagem aumentou com o aumento da concentração do fármaco, indicando sensibilidade ao paclitaxel após 48 horas. Estes resultados foram sobreponíveis aos do tratamento com cisplatina (Rutella *et al*, 2009). O tratamento com paclitaxel na concentração de 10 nmol/L, 20 nmol/L e 50 nmol/L nas células Ishikawa CD133<sup>+</sup> mostrou viabilidade de 82%, de 60% e de 37% em relação ao controlo, respetivamente. Comparando as subpopulações CD133<sup>+</sup> e CD133<sup>-</sup>, para a concentração de 10 nmol/L e de 20 nmol/L, a população CD133<sup>+</sup> apresentou maior resistência ao paclitaxel (Nakamura *et al*, 2010). A população lateral das células RK12V apresentou uma inibição de 51% com paclitaxel na concentração de 10 nmol/L em relação ao controlo (Kato *et al*, 2011). Outros autores mostraram também que a população de esferas de cancro do ovário, também apresentou maior resistência ao paclitaxel em comparação com as células cultivadas em condições aderentes (He *et al*, 2014). Do mesmo modo, as células de cancro do pulmão CD133<sup>+</sup> foram mais resistentes ao tratamento com paclitaxel que as CD133<sup>-</sup> (Chen *et al*, 2008). Nos nossos resultados, o fenótipo de CSC na população de esferas ES1, ES2 e ES3 é corroborado pela resistência ao paclitaxel. Associadamente, a população de derivadas aderentes G1, G2 e G3 apresenta níveis de resistência superiores às ECC-I o que sugere a manutenção de alguns dos mecanismos de resistência em condições aderentes. A resistência ao paclitaxel deve-se a múltiplos mecanismos, nomeadamente alterações do nível intracelulares do fármaco, variações da estrutura da tubulina, alterações de transdução de sinal e das vias apoptóticas. A expressão de MDR-1 está descrita para agentes anti-mitóticos como é o caso dos taxanos. A expressão alterada de proteínas associadas aos microtúbulos pode também estar envolvida na resistência a estes fármacos. As mutações da tubulina podem também estar associadas a resistência, pela alteração da ligação do fármaco, tendo sido também descrita a alteração do equilíbrio do dímero tubulina e polímero microtúbulo. A alteração da expressão de  $\beta$ -tubulina também alterou a sensibilidade aos agentes dirigidos aos micro-túbulos (Fojo & Menefee, 2007).

A apoptose é um mecanismo de morte associado ao tratamento com paclitaxel. Nos nossos resultados, a linha celular ECC-I apresentou níveis de apoptose superiores ao controlo após efeito do paclitaxel. Esta via de morte foi reportada por outros autores em células tumorais de endométrio como as AKT2 (Dowdy *et al*, 2006). A apoptose também foi detetada 48 horas após o tratamento com paclitaxel na concentração de 10 nM às na linha celular Ishikawa (Hoekstra *et al*, 2008). A expressão da isoforma AKT na linha celular de endométrio HeLa reduziu a expressão de caspase 3 e de PARP clivada e reduziu a apoptose induzida pelo paclitaxel, o que sugere que esta isoforma pode aumentar a resistência à apoptose induzida por este



fármaco (Gagnon *et al*, 2008). Por outro lado, a deficiência AKT em linha celular de endométrio KLE pode ativar a apoptose conforme indicado pelos seus fatores pró-apoptóticos clivados, nomeadamente a caspase 3, a caspase 6, a caspase 9 e a PARP. O défice das isoformas AKT1 e AKT2 associou-se a maior sensibilidade ao paclitaxel que o controlo ou a deficiência da isoforma AKT3 (Girouard *et al*, 2013).

As células com propriedades de CSC apresentam inibição de apoptose como mecanismo de resistência aos citostáticos. Nos resultados obtidos, na população de esferas ES1 e também nas derivadas aderentes GI, a apoptose não foi uma via de morte preferencial em relação ao controlo. Também se verificou, no nosso estudo, que a expressão de P53 não teve variação em relação ao controlo nas populações celulares ECC-I, ES1 e GI. A mutação da P53 confere à célula resistência à terapêutica e inibição da apoptose, conforme discutido anteriormente (Shetzer *et al*, 2014). A inibição da apoptose nas CSC submetidas ao paclitaxel integra diversos mecanismos para além da alteração P53. As proteínas anti-apoptóticas como a BCL-2 e survivina foram reportados em níveis elevados em subpopulações CD133<sup>+</sup> resistentes a fármacos. Em CSC do cólon e hepáticas as proteínas BCL-2 contribuíram para a resistência ao paclitaxel, para além da ativação preferencial da AKT nas CSC hepáticas. (Shetzer *et al*, 2014). A resistência de células estaminais CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> hepáticas ao paclitaxel foi associada a sobre-expressão de BCL-2 e de caspase 3. A sensibilidade desta população com P53 selvagem foi associada a subregulação BCL-2, a sobre-regulação BAX e a sobre-regulação de caspase 3 (Wu *et al*, 2013c). As vias SNAIL e SLUG, associadas à EMT, também antagonizaram a apoptose mediada por P53 o que foi demonstrado no tratamento com paclitaxel no cancro do ovário, através da repressão de genes pró-apoptóticos (Kurrey *et al*, 2009). Estes resultados salientam o papel de outras vias na inibição da apoptose nas CSC resistentes ao paclitaxel, nomeadamente a via da AKT e o envolvimento da EMT característica do fenótipo de CSC. Na população de esferas do nosso estudo a resistência à apoptose poderá ser um mecanismo que envolve estas vias independentes da P53.

A ausência de sobre-expressão de caspases na linha celular ECC-I, que apresentou apoptose ativada pelo paclitaxel, aponta para uma provável ativação independente de caspases, mecanismo já demonstrado por outros autores (Kroemer & Martin, 2005). O aumento da necrose nas esferas ES1 e nas células derivadas aderentes GI, pode ser justificada pela existência de mecanismos de regulação desta via de morte neste grupo de células. A necrose pode ser induzida de forma independente de caspases, pela ativação de recetores de morte TNF-RI (TNF-receptor-1) pela via dependente RIP (receptor-interacting protein). A FADD (Fas-associated death domain protein) é um ponto de bifurcação entre morte por apoptose e por necrose. Em condições apoptóticas a clivagem RIP mediada por caspase bloqueia a via da necrose. A inibição do eixo FADD-caspase pela utilização de inibidores da caspase ou por mutações ou por deleções FADD com falta do DED (death effector domain) levam à sensibilização dos recetores de morte que induzem a necrose (Wajant *et al*, 2003). O TNF- $\alpha$  foi associado com propriedades de CSC nomeadamente a EMT e capacidade de

formação de esferas (Zhang *et al*, 2014). Nas células com propriedades de CSC do nosso estudo a resistência ao paclitaxel comprova a sua plasticidade e a morte por necrose será ativada no contexto de inibição apoptótica.

Neste estudo experimental, o ensaio cometa demonstrou que as esferas ESI apresentam menor percentagem de células com o momento de cauda acima do P90 em comparação com as células parentais ECC-I e com as células derivadas aderentes GI, o que foi consistente com os resultados que demonstraram maior resistência desta população ao tratamento com paclitaxel. Um dos mecanismos de ação do paclitaxel é a indução de quebras na cadeia de DNA. O paclitaxel induz danos no DNA devido à desproteção dos telómeros durante a paragem da mitose (Gutiérrez-González *et al*, 2013; Annovazzi *et al*, 2015). Noutro estudo com neuroesferas, as lesões de DNA foram reportadas nesta população mas foram superiores nas células aderentes submetidas ao paclitaxel na concentração de 100 nM após 72 horas de incubação (Annovazzi *et al*, 2015). Assim a população de esferas ESI apresentam mecanismos de resistência ao paclitaxel que podem envolver reparação da lesão do DNA.

## RESPOSTA À IRRADIAÇÃO CELULAR

### Resultados

#### Atividade metabólica

O efeito da radioterapia com 0,5 Gy, com 15 Gy e com 30 Gy na atividade metabólica das populações de células derivadas aderentes G1, G2 e G3 foi avaliada em comparação com a linha celular ECC-1 e os resultados estão representados na Figura 75. Após 24 horas de irradiação com 0,5 Gy, a atividade metabólica das G2 foi de  $101,81 \pm 5,15\%$  ( $p=0,001$ ) e das G3 foi de  $102,18 \pm 5,94\%$  ( $p<0,001$ ), superior à atividade metabólica das células da linha parental ECC-1 com um valor de  $91,72 \pm 5,49\%$ . A atividade metabólica das G1 foi de  $95,09 \pm 7,91\%$ . Para a irradiação com 15 Gy a atividade metabólica das células G2 foi de  $104,64 \pm 5,03\%$  ( $p=0,001$ ) e das G3 foi de  $102,24 \pm 6,65\%$  ( $p=0,008$ ), ambas superiores à atividade metabólica das ECC-1 ( $92,87 \pm 5,18\%$ ). A atividade metabólica das células G1 foi de  $90,91 \pm 7,95\%$ . A atividade metabólica das células G2 ( $p<0,001$ ) e das G3 ( $p=0,015$ ) foi superior à das G1. Para a irradiação com 30 Gy a atividade metabólica das células parentais ECC-1 foi de  $90,36 \pm 5,19\%$ , enquanto das células G1 foi de  $83,87 \pm 8,19\%$ , das G2 foi de  $90,82 \pm 8,64\%$  e das G3 foi de  $89,03 \pm 6,08\%$ , nenhuma com diferenças significativas.

Após 48 horas da irradiação com 0,5 Gy, a atividade metabólica das células derivadas aderentes G1 foi de  $92,04 \pm 5,31\%$  ( $p=0,026$ ), inferior à atividade metabólica das células da linha celular ECC-1, com um valor de  $99,19 \pm 4,49\%$ . A atividade metabólica das células G2 foi de  $104,08 \pm 5,97\%$  ( $p < 0,001$ ), superior à das G1. A atividade metabólica das células G3 foi de  $96,06 \pm 6,39\%$ , ( $p=0,006$ ), inferior à das G1. Para a radiação com 15 Gy, a atividade metabólica das células G1 foi de  $99,14 \pm 5,31\%$  ( $p=0,048$ ) e das G2 foi de  $100,50 \pm 4,70\%$  ( $p=0,002$ ), superior à atividade das ECC-1 com um valor de  $93,03 \pm 4,50\%$ . A atividade metabólica das G3 foi de  $97,00 \pm 5,90\%$ , sem diferenças significativas. Para a irradiação com 30 Gy, a atividade metabólica das células G1 foi de  $85,47 \pm 4,94\%$  ( $p=0,019$ ) e das G3 foi de  $84,05 \pm 6,80\%$  ( $p=0,012$ ), inferior à atividade metabólica das ECC-1, com um valor de  $92,03 \pm 2,33\%$ . A atividade das G2, que foi de  $93,81 \pm 7,08\%$  ( $p=0,021$ ) e também das G3 ( $p=0,014$ ) foi inferior à atividade das G1.

Após 72 horas da irradiação com 0,5 Gy, a atividade metabólica das células derivadas aderentes G2 foi de  $101,06 \pm 4,97\%$  ( $p=0,001$ ) e a das G3 foi de  $103,11 \pm 5,78\%$  ( $p=0,001$ ), superior à atividade metabólica das células da linha ECC-1, com um valor de  $93,41 \pm 3,03\%$ . Para a irradiação com 15 Gy, a atividade metabólica das células G1 foi de  $91,92 \pm 8,58\%$  ( $p<0,001$ ), das G2 foi de  $92,51 \pm 5,79\%$  ( $p<0,001$ ) e das G3 foi de  $88,11 \pm 8,22\%$  ( $p<0,001$ ), superior à atividade metabólica das ECC-1, com um

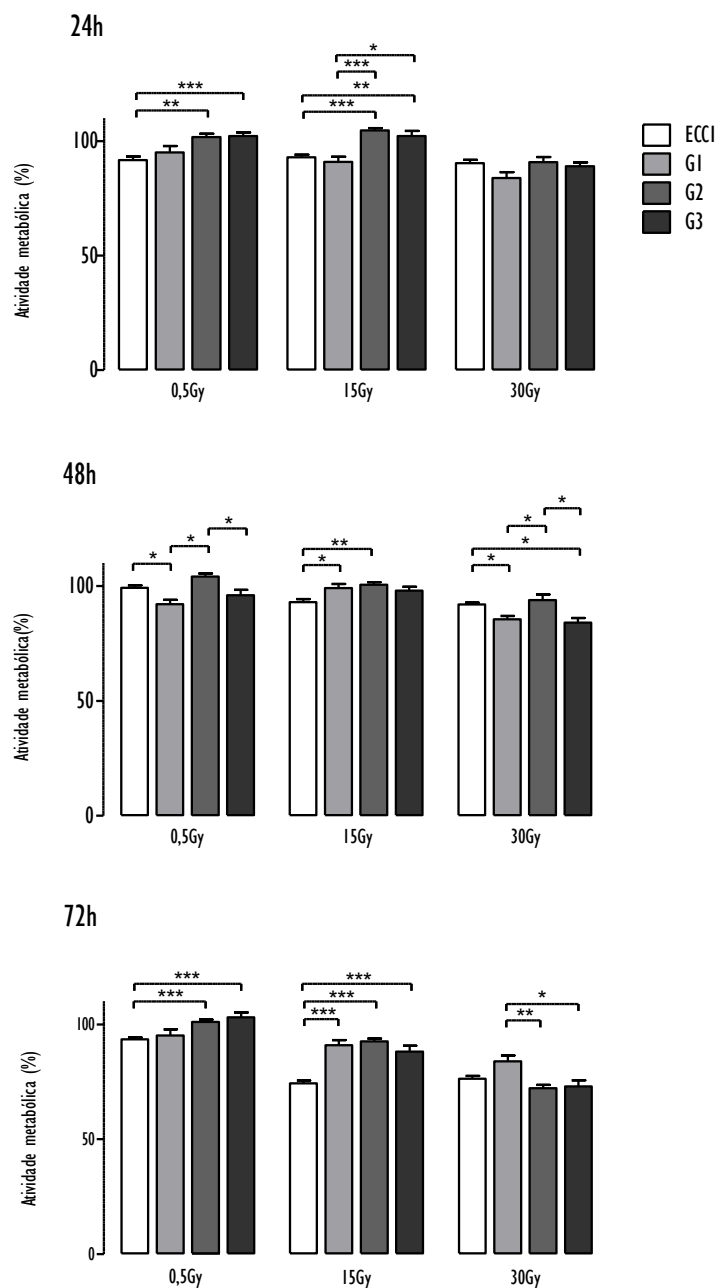


Figura 75: Atividade metabólica da linha celular ECC-I e das derivadas aderentes G1, G2 e G3 submetidas à irradiação com as doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy após 24 horas (gráfico superior), 48 horas (gráfico do meio) e 72 horas (gráfico inferior). Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos onze três ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$ , com \*\*  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

valor de  $76,36 \pm 5,52\%$ . Para a irradiação com 30 Gy, a atividade metabólica das células G1 foi de  $84,81 \pm 4,62\%$ , superior à atividade metabólica das G2, com um valor de  $72,20 \pm 5,78\%$  ( $p=0,005$ ) e das G3, com um valor de  $73,04 \pm 7,86\%$  ( $p=0,045$ ). A atividade metabólica das células parentais ECC-I foi de

76,29 ± 4,08%.

O efeito da radioterapia com doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy das esferas ES1, ES2 e ES3 foi avaliada em comparação com a linha celular ECC-1 e os resultados estão representados na Figura 76.

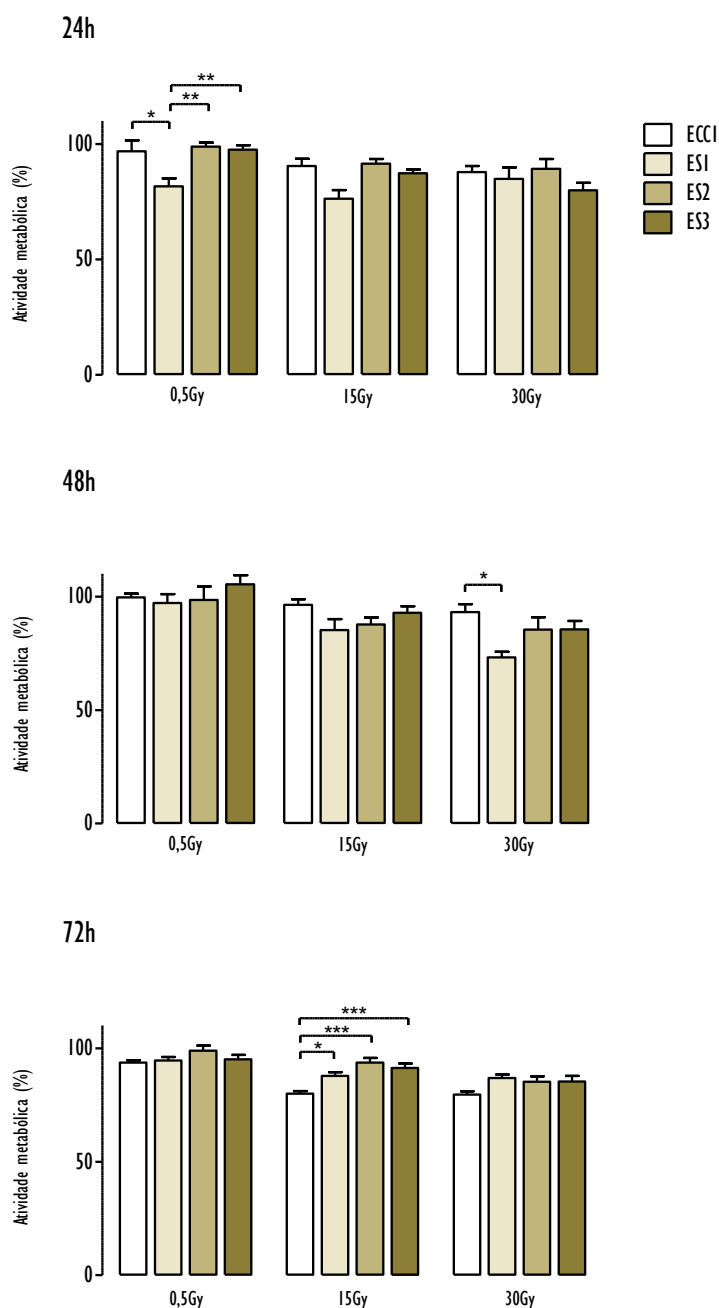


Figura 76: Atividade metabólica da linha celular ECC-1 e das esferas ES1, ES2 e ES3 submetidas à irradiação com as doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy após 24 horas (gráfico superior), 48 horas (gráfico do meio) e 72 horas (gráfico inferior). Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos oito ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$ , com \*\*  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

Após 48 horas da irradiação com 0,5 Gy, a atividade metabólica das células parentais ECC-I foi de  $99,13 \pm 5,30\%$ , das esferas ES1 foi de  $101,12 \pm 5,24\%$ , das esferas ES2 foi de  $98,49 \pm 13,28\%$  e das esferas ES3 foi de  $105,39 \pm 11,48\%$ . Para a irradiação com 15 Gy, a atividade metabólica da linha celular ECC-I foi de  $96,43 \pm 8,97\%$ , das esferas ES1 foi de  $85,25 \pm 12,63\%$ , das esferas ES2 foi de  $87,71 \pm 11,19\%$  e das esferas ES3 foi de  $92,87 \pm 9,23\%$ . Para a irradiação com 30 Gy, a atividade metabólica das esferas ES1 foi de  $73,17 \pm 7,13\%$  ( $p=0,004$ ), inferior à atividade metabólica da linha celular ECC-I, com um valor de  $93,15 \pm 12,28\%$ . A atividade metabólica das esferas ES2 foi de  $85,48 \pm 12,09\%$  e das esferas ES3 foi de  $85,61 \pm 9,55\%$ .

Após 72 horas da irradiação com 0,5 Gy, a atividade metabólica das células ECC-I foi de  $93,59 \pm 3,89\%$ , das esferas ES1 foi de  $94,67 \pm 5,56\%$ , das esferas ES2 foi de  $98,96 \pm 6,60\%$  e das esferas ES3 foi de  $95,11 \pm 7,57\%$ . Para a irradiação com 15 Gy, a atividade metabólica das esferas ES1 foi de  $87,88 \pm 5,56\%$  ( $p=0,025$ ), das esferas ES2 foi de  $93,77 \pm 6,71\%$  ( $p<0,001$ ) e das ES3 foi de  $91,33 \pm 6,74\%$  ( $p<0,001$ ), superior à atividade metabólica da linha celular das células ECC-I, com um valor de  $79,96 \pm 3,97\%$ . Para a irradiação com 30 Gy, a atividade metabólica das células ECC-I foi de  $79,61 \pm 4,24\%$ , das esferas ES1 foi de  $86,85 \pm 4,77\%$ , das esferas ES2 foi de  $85,26 \pm 6,28\%$  e das esferas ES3 foi de  $85,41 \pm 7,40\%$ .

O efeito da irradiação na atividade metabólica da linha celular ECC-I foi avaliado com recurso ao ensaio MTT e ao *Alamar Blue*<sup>®</sup>, e verificou-se a ausência de diferenças significativas entre os resultados obtidos por estas metodologias, conforme descrito na Figura 77.

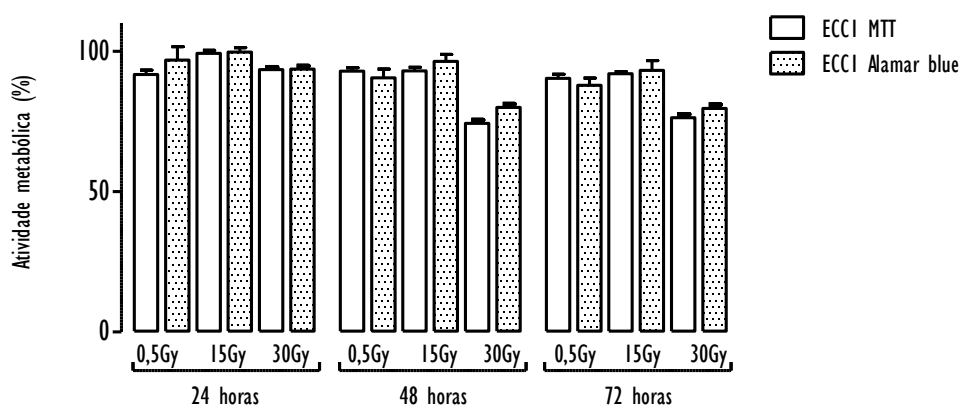


Figura 77: Atividade metabólica da linha celular ECC-I, comparando o ensaio do MTT e o ensaio do *Alamar Blue*<sup>®</sup> após irradiação com 0,5 Gy, 15 Gy e 30 Gy às 24, 48 e 72 horas. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos oito ensaios. Não se observaram diferenças significativas entre os dois ensaios.

## Sobrevivência celular

A sobrevivência das células parentais ECC-1, das populações de esferas ES1, ES2 e ES3 e das populações derivadas aderentes G1, G2 e G3 submetidas à radiação com doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy, está representada na Figura 78.

O fator de sobrevivência após a irradiação com a dose de 0,5 Gy foi de  $0,802 \pm 0,099$  ( $p < 0,001$ ) para as esferas ES1, de  $0,745 \pm 0,083$  ( $p = 0,002$ ) para as esferas ES2, de  $0,822 \pm 1,55$  ( $p < 0,001$ ) para as esferas ES3, de  $0,854 \pm 0,14$  ( $p < 0,001$ ) para as derivadas aderentes G1 e de  $0,726 \pm 0,086$  ( $p = 0,006$ ) para as derivadas aderentes G3, superior ao fator de sobrevivência das células parentais ECC-1, com um valor de  $0,585 \pm 0,049$ . Na população de células derivadas aderentes G2 o fator de sobrevivência foi de  $0,661 \pm 0,018$ . Após a radiação com a dose de 15 Gy, o fator de sobrevivência foi de  $0,125 \pm 0,035$  ( $p = 0,006$ ) para as derivadas aderentes G3, superior ao das células ECC-1, com um valor de  $0,02 \pm 0,01$ . O fator de sobrevivência foi de  $0,019 \pm 0,017$  para as esferas ES1, de  $0,037 \pm 0,044$  para as ES2, de  $0,006 \pm 0,004$  para as ES3, de  $0,051 \pm 0,031$  para as derivadas aderentes G1 e de  $0,017 \pm 0,013$  para as G2. Após a radiação com a dose de 30 Gy, o fator de sobrevivência foi de  $0,088 \pm 0,057$  ( $p < 0,001$ ) para as derivadas aderentes G3 e de  $0,035 \pm 0,016$  ( $p = 0,012$ ) para as G1, superior ao das células parentais ECC1, com um valor de  $0,003 \pm 0,002$ . O fator de sobrevivência foi de  $0,013 \pm 0,011$  para as esferas ES1, de  $0,019 \pm 0,017$  para as ES2, de  $0,003 \pm 0,002$  para as ES3 e de  $0,031 \pm 0,041$  para as derivadas aderentes G2.

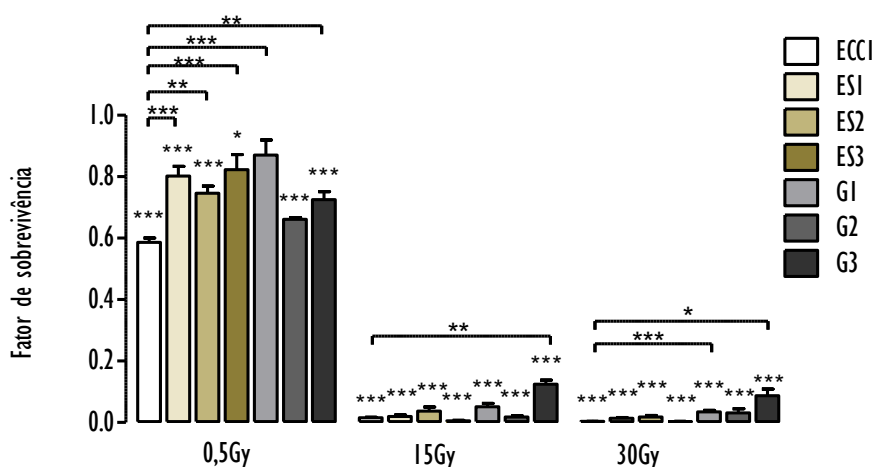


Figura 78: Sobrevivência da linha celular ECC-1, das esferas ES1, ES2 e ES3 e das derivadas aderentes G1, G2 e G3 após irradiação com as doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$ , com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

A irradiação com as doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy resultou numa sobrevivência inferior ao controlo ( $p < 0,05$ ) em todas as populações com exceção de derivadas aderentes G1 que não apresentou diferenças em relação ao controlo após a irradiação com 0,5 Gy. Para a linha celular ECC-1, a irradiação com 0,5 Gy apresentou uma sobrevivência superior à de 15 Gy ( $p = 0,024$ ) e à de 30 Gy ( $p < 0,001$ ). As esferas ES1 apresentaram uma sobrevivência superior após a irradiação com 0,5 Gy em relação à irradiação com 15 Gy ( $p = 0,002$ ) e com 30 Gy ( $p < 0,001$ ). As esferas ES2 também apresentaram uma sobrevivência superior após a irradiação com 0,5 Gy em relação à irradiação com 15 Gy ( $p < 0,001$ ) e com 30 Gy ( $p < 0,001$ ). Em relação às esferas ES3, o fator de sobrevivência também foi superior após irradiação com 0,5 Gy, em comparação com a irradiação com 15 Gy ( $p = 0,006$ ) e com 30 Gy ( $p < 0,001$ ). Para as derivadas aderentes G1, G2 e G3 a sobrevivência foi superior após a irradiação com 0,5 Gy em relação à irradiação com 15 Gy ( $p < 0,001$  para todas as populações) e com 30 Gy ( $p < 0,001$  para todas as populações). A comparação do fator de sobrevivência após a irradiação com 15 Gy e com 30 Gy não revelou diferenças considerando todas as populações estudadas.

## Morte celular

A avaliação das vias de morte nas populações ECC-1, ES1 e G1 submetidas à radioterapia com as doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy, 24 horas após o tratamento está representada na Figura 79, Figura 80 e Figura 81, respetivamente.

Na linha celular ECC-1 não submetida a tratamento, a população de células vivas foi de  $89,06 \pm 5,24\%$ , a população de células em apoptose foi de  $6,69 \pm 4,89\%$ , a população de células em apoptose tardia/necrose foi de  $0,74 \pm 1,51\%$  e a população de células em necrose foi de  $3,51 \pm 4,10\%$ . Após a irradiação com a dose de 0,5 Gy, a população de células vivas foi de  $82,55 \pm 9,48\%$ , a população de células em apoptose foi de  $7,26 \pm 7,46\%$ , em apoptose tardia/necrose foi de  $0,76 \pm 2,22\%$  e em necrose de  $8,60 \pm 8,54\%$ . Após a irradiação com a dose de 15 Gy, a população de células vivas foi inferior ao controlo, com valor de  $76,73 \pm 7,18\%$  ( $p < 0,001$ ). A população de células em apoptose e apoptose tardia/necrose foi de  $10,71 \pm 7,82\%$  e de  $0,76 \pm 2,22\%$ , respetivamente. A população de células em necrose foi inferior à do controlo, com valor de  $12,43 \pm 7,59\%$  ( $p = 0,012$ ). Após a irradiação com a dose de 30 Gy, a população de células vivas foi inferior ao controlo, com valor de  $73,03 \pm 14,63\%$  ( $p < 0,001$ ). A população de células em apoptose foi superior à do controlo, com valor de  $14,03 \pm 11,16\%$  ( $p = 0,014$ ), a população de células em apoptose tardia/necrose foi de  $2,45 \pm 3,80\%$  e a população de células em necrose foi superior à do controlo, com valor de  $10,48 \pm 10,90\%$  ( $p < 0,001$ ).



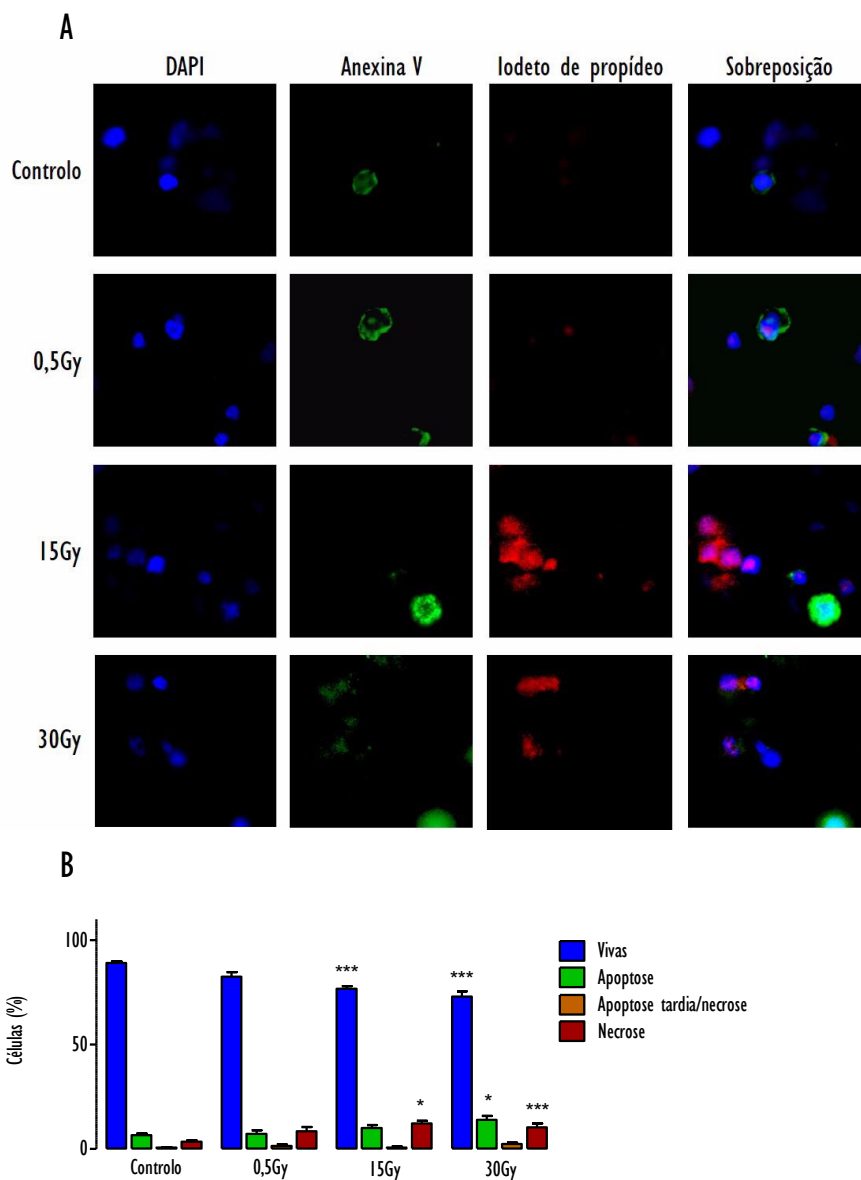


Figura 79: Tipos de morte celular nas células ECC-1 após 24 horas de irradiação com 0,5, 15 e 30 Gy. A figura corresponde a imagens exemplificativas das utilizadas no estudo das vias de morte. Na coluna da esquerda está representada a azul a marcação nuclear, a segunda coluna mostra a coloração verde que corresponde à anexina V, a terceira coluna mostra a coloração vermelha que corresponde à marcação com iodeto de propídeo e a quarta coluna mostra a sobreposição das 3 imagens anteriores. O gráfico (B) mostra os resultados estão representados na forma de percentagem de células vivas, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e em necrose. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de três ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

Nas esferas ESI não submetida a tratamento, a população de células vivas foi de  $84,42 \pm 5,69\%$ , a população de células em apoptose foi de  $10,40 \pm 6,39\%$ , a população de células em apoptose tardia/necrose foi de  $1,78 \pm 3,51\%$  e a população de células em necrose foi de  $3,16 \pm 4,13\%$ . Após a irradiação com a dose de 0,5 Gy, a população de células vivas foi inferior à do controlo, com valor de  $75,38 \pm 12,09\%$  ( $p=0,018$ ). A população de células em apoptose foi de  $14,58 \pm 11,32\%$ , em apoptose tardia/necrose foi de  $3,63 \pm 4,74\%$  e em necrose foi de  $5,82 \pm 6,05\%$ . Após a irradiação com a dose de 15 Gy, a população de células vivas foi inferior à das esferas ESI não irradiadas, com um valor de  $68,11 \pm 10,08\%$  ( $p<0,001$ ). A população de células em apoptose e a população de células em apoptose tardia/necrose corresponderam a  $14,53 \pm 10,34\%$  e a  $4,85 \pm 5,45\%$ , respetivamente. A população de células em necrose foi superior à das esferas ESI controlo e à das células irradiadas com 0,5 Gy ( $p=0,039$ ), que apresentaram um valor de  $11,77 \pm 5,09\%$ . Após a irradiação com dose de 30 Gy, a população de células vivas foi inferior à do controlo, com valor de  $70,50 \pm 15,51\%$  ( $p<0,001$ ). A população de células em apoptose, com o valor de  $4,63 \pm 5,62\%$ , foi inferior à do controlo ( $p=0,029$ ), à das células irradiadas com a dose de 0,5 Gy ( $p=0,004$ ) e à das células irradiadas com a dose de 15 Gy ( $p=0,002$ ). A população de células em apoptose tardia/necrose foi superior à do controlo, com valor de  $8,06 \pm 11,63\%$  ( $p=0,008$ ). A população de células em necrose com valor de  $16,81 \pm 5,00\%$  foi superior ao controlo ( $p<0,001$ ) e à das células irradiadas com a dose de 0,5 Gy ( $p<0,001$ ).

Nas células derivadas aderentes GI não submetida a tratamento, a população de células vivas foi de  $89,39 \pm 4,95\%$ , a de células em apoptose foi de  $5,28 \pm 4,11\%$ , a de células em apoptose tardia/necrose foi de  $0,00 \pm 0,00\%$  e de células em necrose foi de  $5,34 \pm 5,85\%$ . Após irradiação com a dose de 0,5 Gy, a população de células em apoptose foi superior à do controlo, com valor de  $15,76 \pm 6,43\%$  ( $p=0,002$ ). A população de células em apoptose tardia/necrose e em necrose foi de  $0,35 \pm 0,76\%$  e de  $7,20 \pm 6,33\%$ , respetivamente. Após a irradiação com a dose de 15 Gy, a população de células vivas foi inferior à do controlo, com valor de  $74,08 \pm 9,15\%$  ( $p<0,001$ ) e a população de células em apoptose foi superior à do controlo, com valor de  $15,45 \pm 12,60\%$  ( $p=0,029$ ). A população de células em apoptose tardia/necrose e em necrose foi de  $0,79 \pm 2,51\%$  e de  $10,47 \pm 10,69\%$ , respetivamente. Após a irradiação com a dose de 30 Gy, a população de células vivas foi inferior ao controlo, com valor de  $73,04 \pm 8,82\%$  ( $p<0,001$ ). A população de células em apoptose foi superior ao controlo, com valor de  $17,89 \pm 12,23\%$  ( $p<0,001$ ). A população de células em apoptose tardia/necrose e em necrose foi de  $5,30 \pm 7,28\%$  e de  $7,41 \pm 9,57\%$ , respetivamente.

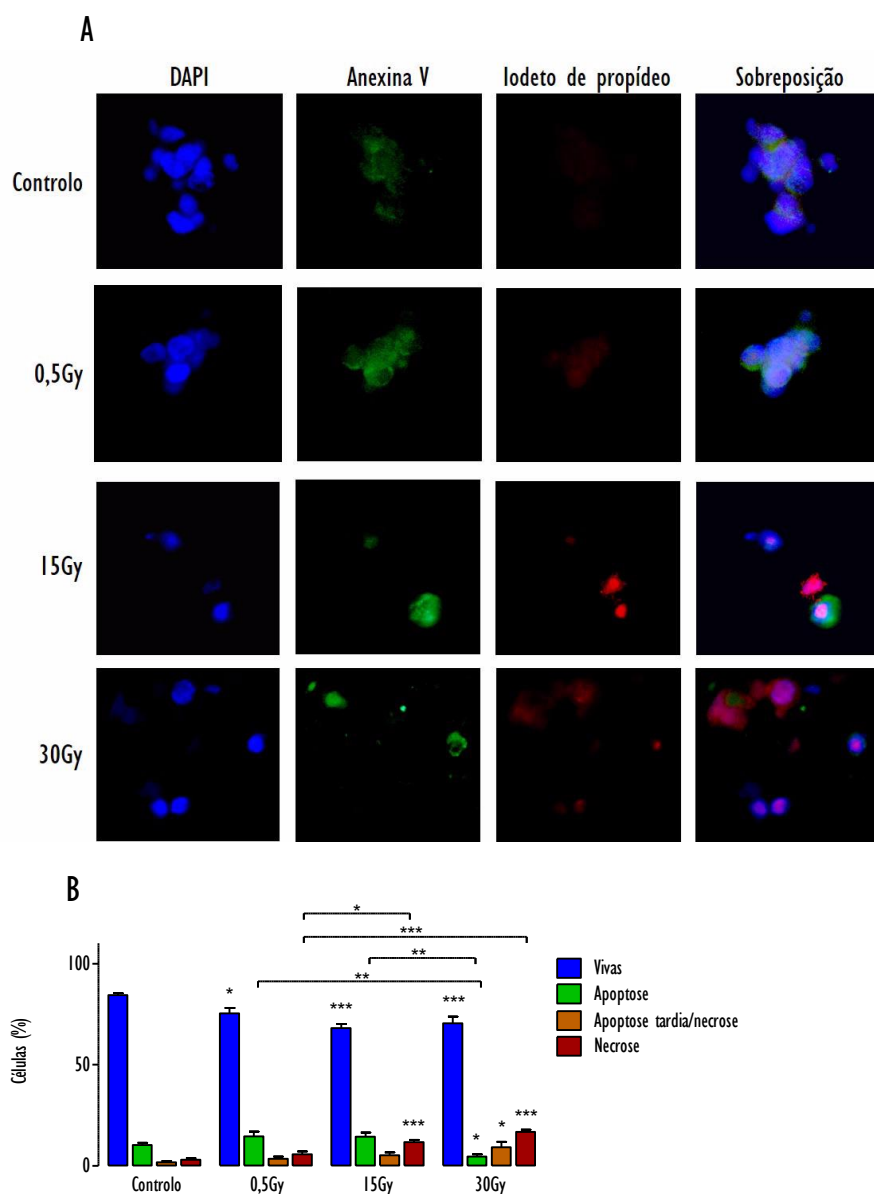


Figura 80: Tipos de morte celular nas células ESI após 24 horas de irradiação com 0,5, 15 e 30 Gy. A figura corresponde a imagens exemplificativas das utilizadas no estudo das vias de morte. Na coluna da esquerda está representada a azul a marcação nuclear, a segunda coluna mostra a coloração verde que corresponde à anexina V, a terceira coluna mostra a coloração vermelha que corresponde à marcação com iodeto de propídeo e a quarta coluna mostra a sobreposição das 3 imagens anteriores. O gráfico (B) mostra os resultados estão representados na forma de percentagem de células vivas, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e em necrose. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de três ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$ , com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

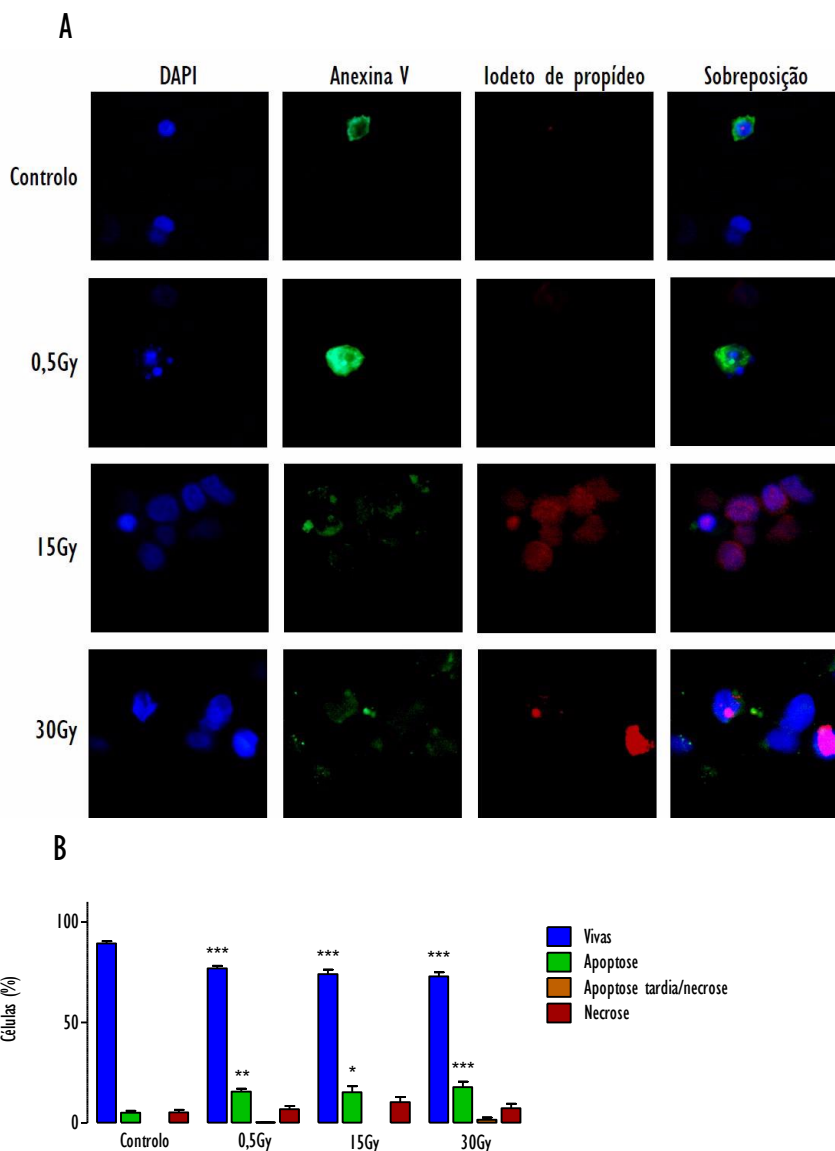


Figura 81: Tipos de morte celular nas células G1 após 24 horas de irradiação com 0,5, 15 e 30 Gy. A figura corresponde a imagens exemplificativas das utilizadas no estudo das vias de morte. Na coluna da esquerda está representada a azul a marcação nuclear, a segunda coluna mostra a coloração verde que corresponde à anexina V, a terceira coluna mostra a coloração vermelha que corresponde à marcação com iodeto de propídeo e a quarta coluna mostra a sobreposição das 3 imagens anteriores. O gráfico (B) mostra os resultados estão representados na forma de percentagem de células vivas, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e em necrose. Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de três ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$ , com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ .

A comparação entre as populações de células irradiadas com a dose de 0,5 Gy, revelou viabilidade semelhante. A apoptose foi superior nas esferas ESI em relação à linha celular ECC-1 ( $p=0,008$ ), não sendo observadas diferenças significativas em relação à apoptose tardia/necrose e à necrose. Relativamente aos 15 Gy, a viabilidade foi inferior nas esferas ESI em relação à linha celular ECC-1 ( $p=0,001$ ). A apoptose e

a necrose não apresentaram diferenças. A apoptose tardia/necrose foi superior nas esferas ESI em relação à linha celular ECC-I ( $p=0,001$ ) e às derivadas aderentes GI ( $p<0,001$ ). Com a irradiação com a dose de 30 Gy, a viabilidade não foi diferente entre as populações ECC-I, ESI e GI. A apoptose foi superior nas derivadas aderentes GI em comparação à linha celular ECC-I ( $p=0,007$ ) e com as esferas ESI ( $p=0,001$ ). A apoptose tardia/necrose foi superior nas esferas ESI em relação à linha celular ECC-I ( $p=0,015$ ) e às derivadas aderentes GI ( $p<0,001$ ). A necrose também foi significativamente superior nas esferas ESI comparando com as células parentais ECC-I ( $p=0,007$ ) e com as derivadas aderentes GI ( $p<0,001$ ).

A expressão de P53 foi avaliada nas células parentais ECC-I, nas esferas ESI e nas derivadas aderentes GI, 24 horas após terem sido submetidas à radioterapia com doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy, conforme descrito na Figura 82. Considerando a linha celular ECC-I a expressão de P53 foi superior após a irradiação com dose de 30 Gy em relação às células não submetidas ao tratamento, com valor de  $1,80\pm 0,26$  ( $p<0,001$ ). A expressão de P53 após a irradiação com doses de 0,5 Gy e de 15 Gy foi de  $1,23\pm 0,25$  e de  $1,19\pm 0,34$ , respectivamente. Para a população de esferas ESI, a expressão de P53 foi superior após a irradiação com dose de 15 Gy em relação às células não submetidas ao tratamento, com valor de  $1,31\pm 0,21$  ( $p=0,046$ ).

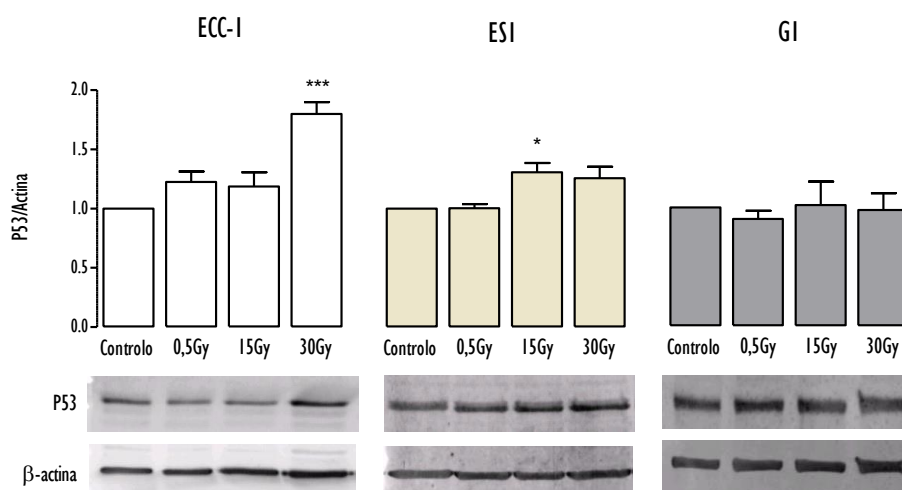


Figura 82: Expressão da proteína P53, nas células parentais ECC-I, nas esferas ESI e nas células derivadas aderentes GI, 24 horas após a irradiação com doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da P53 e da actina e os gráficos representam a alteração relativamente às culturas não submetidas a tratamento (razão P53/actina do controlo igual a 1). Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ . As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína P53 e da actina para cada uma das condições experimentais.

A expressão de P53 após a irradiação com dose de 0,5 Gy e de 30 Gy foi de  $1,00 \pm 0,08$  e de  $1,26 \pm 0,19$ , respetivamente. A expressão de P53 na população de derivadas aderentes GI após a irradiação com dose de 0,5 Gy foi de  $0,90 \pm 0,17$ , com dose de 15 Gy foi de  $0,98 \pm 0,40$ , e com dose de 30 Gy foi de  $1,02 \pm 0,56$ .

A expressão de caspase 3 foi avaliada nas células parentais ECC-1, nas esferas ESI e nas células derivadas aderentes GI, 24 horas após terem sido submetidas ao tratamento com radioterapia com doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy, conforme descrito na Figura 83. Considerando a linha celular ECC-1 a expressão de caspase 3 foi superior após a irradiação com dose de 15 Gy em relação às células não submetidas ao tratamento, com valor de  $1,30 \pm 0,10$  ( $p=0,018$ ). A expressão com dose de 0,5 Gy e de 30 Gy foi de  $1,20 \pm 0,31$  e de  $2,17 \pm 0,98$ , respetivamente. Para as esferas ESI, a expressão de caspase 3 foi superior após a irradiação com dose de 15 Gy em relação às células não submetidas ao tratamento, com valor de  $1,67 \pm 0,25$  ( $p=0,024$ ). A expressão com doses de 0,5 Gy e 30 Gy foi de  $1,41 \pm 0,64$  e de  $1,66 \pm 0,97$ , respetivamente. A expressão de caspase 3 na população de células derivadas aderentes GI após irradiação com dose de 0,5 Gy foi de  $1,01 \pm 0,30$ , com 15 Gy foi de  $1,00 \pm 0,30$  e 30 Gy foi de  $1,00 \pm 0,50$ .

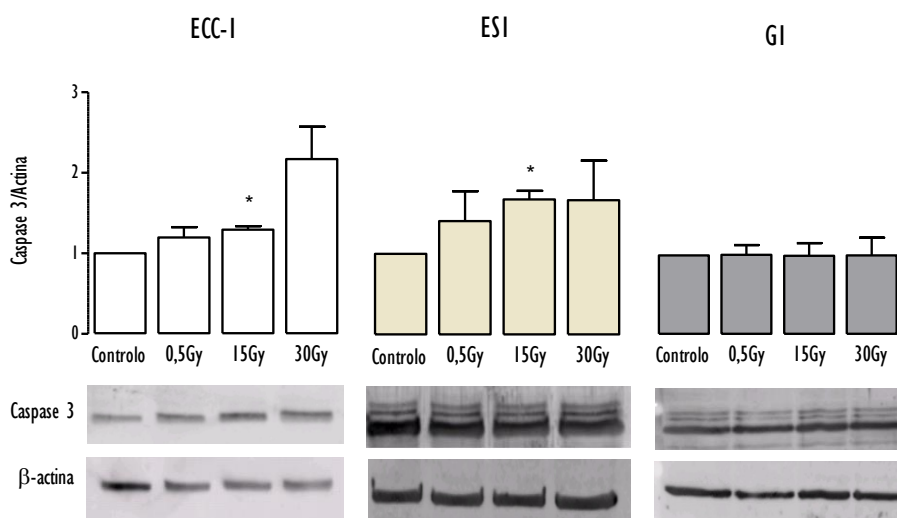


Figura 83: Expressão da proteína caspase 3, nas células ECC-1, nas esferas ESI e nas células derivadas aderentes GI, 24 horas após a irradiação com doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da caspase 3 e da actina e os gráficos representam a alteração relativamente às culturas não submetidas a tratamento (razão caspase 3/actina do controlo igual a 1). Os valores apresentados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos três ensaios. A significância estatística está representada com \* para  $p < 0,05$ . As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína caspase 3 e da actina para cada uma das condições experimentais.

## Danos no DNA

No que diz respeito à distribuição de momento de cauda para as condições controlo e para a irradiação com doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy verifica-se uma distribuição assimétrica com cauda à direita. A Figura 84 apresenta algumas imagens ilustrativas das condições estudadas. Desta análise destaca-se que não se observaram cometas no controlo e com o tratamento com dose de 0,5 Gy, e observam-se alguns cometas com o tratamento com doses de 15 e de 30 Gy. O percentil 90 das distribuições obtidas para o momento de cauda está representado na Tabela 11.

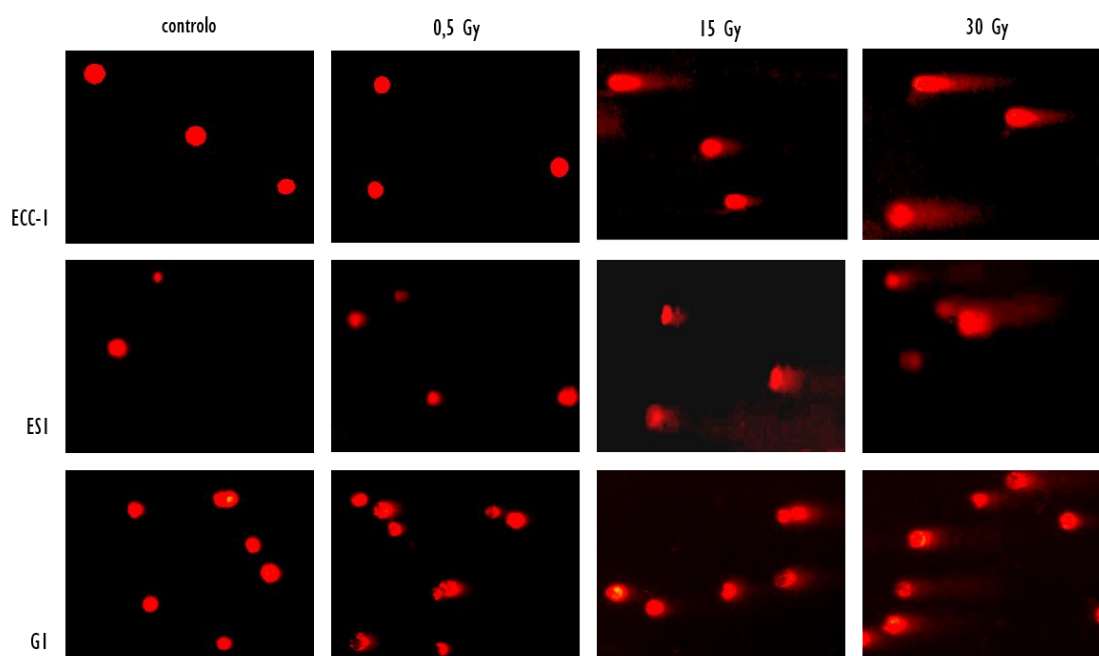


Figura 84: Imagens ilustrativas dos cometas obtidos para as células parentais ECC-I, as esferas ESI e as derivadas aderentes GI, 24 horas após o tratamento com radioterapia com a dose de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy após 24 horas. As imagens representadas foram obtidas com uma ampliação de 400x.

Tabela 11: P90 do momento da cauda dos cometas obtidos na linha celular ECC-I, nas esferas ESI e nas células derivadas aderentes GI após o tratamento com doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy

	Controlo	0,5 Gy	15 Gy	30 Gy
ECC-I	0	0	1,73	4,88
ESI	0,003	0,058	0,064	0,097
GI	$6,07 \times 10^{-5}$	$7,06 \times 10^{-5}$	$6,76 \times 10^{-5}$	$5,44 \times 10^{-5}$

Para a linha celular ECC-I, no ensaio cometa, o momento de cauda não apresentou diferenças com dose de 0,5 Gy em relação às culturas celulares controlo. Com a irradiação com doses de 15 Gy ( $p < 0,001$ ) e de 30 Gy ( $p < 0,001$ ) o momento de cauda foi superior às culturas celulares controlo. Para as esferas ESI, o momento de cauda foi superior com a irradiação com doses de 0,5 Gy ( $p < 0,001$ ), de 15 Gy ( $p < 0,001$ ) e de 30 Gy ( $p < 0,001$ ) em relação às culturas celulares controlo. Para as células derivadas aderentes GI, não se verificaram diferenças nos momentos de cauda entre as várias doses de irradiação.

As esferas ESI apresentaram maior momento de cauda que a linha celular ECC-I e que as células derivadas aderentes GI ( $p < 0,001$ ), as quais também apresentaram maior momento de cauda em relação à linha parental ECC-I ( $p < 0,001$ ). Com o tratamento de 0,5 Gy, observou-se maior momento de cauda para as esferas ESI em relação à linha celular ECC-I ( $p < 0,001$ ) e à população de derivadas aderentes GI ( $p < 0,001$ ). Com o tratamento de 15 Gy, o momento de cauda foi superior na linha celular ECC-I em relação às esferas ESI ( $p = 0,008$ ) e às derivadas aderentes GI ( $p < 0,001$ ), nas quais se observou menor momento de cauda que na linha parental ECC-I ( $p < 0,001$ ). Com o tratamento de 30 Gy, o momento de cauda das células parentais ECC-I foi superior ao das derivadas aderentes GI ( $p < 0,001$ ) e nas esferas ESI o momento de cauda foi menor que na população ECC-I ( $p < 0,001$ ).

## Discussão

A radioterapia é uma terapêutica adjuvante no cancro do endométrio que permite o controlo locorregional da doença, mas que não se traduz num benefício em termos de sobrevivência (Morneau *et al*, 2013). A radioterapia externa melhorou o intervalo livre de doença, em doentes de alto risco de recorrência, no entanto os resultados podem não ser vantajosos em doentes de baixo risco e algumas de risco intermédio, contribuindo até para um prejuízo da qualidade de vida (Kong *et al*, 2012b; Morneau *et al*, 2013). Também a braquiterapia não mostrou benefícios em doentes de baixo risco, no entanto, em doentes de risco intermédio a braquiterapia não foi inferior à radioterapia externa para a recorrência vaginal (Morneau *et al*, 2013) De realçar que a qualidade de vida foi menos afetada com a braquiterapia do que com a radioterapia externa (Colombo *et al*, 2011). A radioterapia pode também ser uma opção na recidiva vaginal após cirurgia (Wright *et al*, 2012).

No nosso trabalho experimental, a linha celular ECC-I foi submetida a irradiação com doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e de 30 Gy, e a sua atividade metabólica manteve-se em níveis superiores a 80% às 24 horas após a irradiação, superiores a 90% às 48 horas após a irradiação e os níveis mais baixos corresponderam



às 72 horas com valores da ordem dos 76% após a irradiação com 15 Gy e com 30 Gy. O fator de sobrevivência após 12 dias da irradiação com 0,5 Gy resultou numa sobrevivência de 0,585 e que diminuiu para 0,02 com 15 Gy e para 0,003 com 30 Gy. Estes dados sugerem que o efeito da radiação na linha ECC-1 está dependente da dose de irradiação. O efeito da radiação foi avaliado noutras linhas celulares de endométrio. A linha celular Ishikawa mostrou um fator de sobrevivência próximo de 1 com irradiações até 0,6 cGy (Marampon *et al*, 2014). Outros autores compararam as linhas celulares Ishikawa, KLE, HHUA, RL95-2 e verificaram que a linha mais sensível foi a KLE e a mais resistente foi a Ishikawa, conforme demonstrado pelas curvas de sobrevivência clonogénica determinadas com a utilização de doses de radiação até 10 Gy (Park *et al*, 2011). Estes estudos demonstram uma sensibilidade distinta entre diferentes linhas celulares o que pode sugerir uma resposta variável de acordo com o tumor.

A atividade metabólica foi comparada entre a linha celular ECC-1 e as células derivadas aderentes e as populações de esferas. O efeito da radiação nas populações derivadas aderentes foi maior que o da linha ECC-1 para algumas doses e para alguns tempos, no entanto destaca-se que esta alteração corresponde a diferenças que serão biologicamente pouco significativas. A atividade metabólica atingiu maiores diferenças em relação à linha celular ECC-1, nas derivadas aderentes G1, G2 e G3, 72 horas após a dose de 15 Gy mas apenas apresentaram um aumento de cerca de 10 a 15%. Considerando as populações de esferas os resultados não apresentaram diferenças biologicamente relevantes, no entanto também com 15 Gy e 72 horas após a irradiação se verificou uma elevação da atividade metabólica nas esferas ES1, ES2 e ES3 em relação à linha celular ECC-1. A avaliação do fator de sobrevivência nestas populações destaca um aumento da sobrevivência de todas as populações de esferas e das populações derivadas aderentes G1 e G3 com doses de 0,5 Gy. Para a dose de 15 Gy o fator de sobrevivência para a população de derivadas aderentes G3 foi superior à das células de origem ECC-1 e com a dose de 30 Gy, as derivadas aderentes G1 e G3 apresentaram níveis significativamente superiores à linha celular parental ECC-1.

Outros autores avaliaram o efeito da radiação em populações de esferas. No carcinoma do pulmão as células que sobreviveram à irradiação com 5 Gy apresentaram capacidade de formar esferas que expressaram níveis maiores de marcadores de CSC como o CD44, o CD24, a  $\beta$ -catenina e marcadores EMT (SNAIL, vimentina e N-caderina) que a população de esferas não irradiada (Gomez-Casal *et al*, 2013). As esferas com origem em carcinoma da cabeça e do pescoço, 48 horas após irradiação com 2 Gy, demonstraram maior resistência que as células em cultura em monocamada (Leong *et al*, 2014). A população de esferas de linhas celulares de carcinoma do colo uterino e a população em monocamada foram submetidas a um ensaio de radiorresistência e a população de esferas foi mais resistente a doses de irradiação até 10 Gy (López *et al*, 2012). As esferas de linhas celulares de carcinoma do esófago foram mais radiorresistentes que a população de origem quando irradiadas com doses de 8 Gy (Wang, 2014). O aumento da resistência à radiação foi

demonstrado de forma semelhante em esferas de glioblastoma e de carcinoma de células renais (Zhong *et al*, 2010; Yuan *et al*, 2014). As doses de irradiação descritas nestes trabalhos foram inferiores à irradiação utilizada no nosso estudo, em que a sobrevivência com as doses de 15 e 30 Gy foi reduzida. Assim, destaca-se uma população com propriedades de CSC *in vitro* que resiste à irradiação e este dado é transversal em diversos tipos de câncros.

Uma explicação plausível para a radiorresistência de tumores é, justamente, a presença de uma subpopulação de CSC que é intrinsecamente mais resistente a diversas terapêuticas. As terapêuticas podem, por outro lado, causar a expansão e a aquisição de mais mutações genéticas e alterações epigenéticas nas CSC, o que se traduz por uma resistência adquirida ao tratamento (Rycaj & Tang, 2014). Um dos mecanismos da radiorresistência das CSC está relacionado com o aumento da capacidade de reparação de DNA, com o seu potencial de autorrenovação e com mecanismos de defesa de ROS nos quais se inclui o aumento da capacidade de eliminar radicais livres formados em resposta à radiação. De entre os processos envolvidos na radiorresistência, também estão descritas diferenças no processo de quebra da dupla cadeia do DNA e na sua reparação (Rycaj & Tang, 2014). Na recorrência da doença após terapêutica, o clone com as alterações vantajosas para proteção contra a terapêutica pode ser selecionado o que torna possível o reaparecimento do tumor. Assim, a radiação elimina a população radiosensível enquanto a população resistente de CSC permanece viva e contribuiu para radiorresistência adaptativa pela repopulação seletiva de CSC sobreviventes (Rycaj & Tang, 2014). Por outro lado a radiação ionizante também pode reprogramar células diferenciadas e induzir CSC, conforme já descrito para o cancro da mama (Rycaj & Tang, 2014). Apesar de todos estes avanços, os mecanismos moleculares da resistência à radiação são ainda pouco compreendidos. Relativamente ao aumento da reparação de DNA foram descritos mecanismos em diversos tipos de cancro, nomeadamente no carcinoma da nasofaringe, nos glioblastomas, no cancro da mama e no do pulmão. Alguns deles incluem a regulação dependente do MYC, do *checkpoint-1* e do *checkpoint-2* do ciclo celular. A ativação da via de sinalização ATR (do inglês, *ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) e o *checkpoint-1*, a via de sinalização ATM e o *checkpoint-2*, o recrutamento da resposta ao dano de DNA dependente do BMII, a sobre-regulação de genes reparadores de DNA constituem mecanismos de proteção contra o stresse oxidativo por eliminação de ROS (Cojoc *et al*, 2014; Maugeri-Saccà *et al*, 2014). A eliminação de ROS é um mecanismo fisiopatológico que se verifica tanto em células normais como em células tumorais, que envolve moléculas como o glutatião, as peroxidases, as catalases, a superóxido dismutase, a tioredoxina, entre outras (Cojoc *et al*, 2014). Um dos mecanismos adicionais para resistência da população de CSC é um sistema de eliminação mais eficaz de ROS que associa uma menor produção de ROS quando se compara com a restante população tumoral (Cojoc *et al*, 2014).

À semelhança dos nossos resultados com as esferas de endométrio, as células com propriedades de CSC

*in vitro* de outros autores apresentaram maior resistência à radiação. No entanto, destaca-se que esta capacidade se manteve em populações derivadas aderentes, inclusivamente contribuindo para níveis de resistência superiores ao das esferas com o aumento da dose de irradiação, o que pode apontar para mecanismos de resistência em células progenitoras e para os quais as células diferenciadas poderão contribuir.

Noutro estudo as subpopulações de CSC caracterizadas por aumento da expressão de CD44, de CD133 e de ALDH foram associadas a radiorresistência de diversos tipos de cancro (Skvortsov *et al*, 2014). No cancro da mama a subpopulação de CSC CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup> foi mais radiorresistente que a subpopulação sem propriedades de CSC, o que foi atribuído à ativação da via de sinalização ATM/*checkpoint-2*. A eliminação de ROS também foi associada com este fenótipo de cancro da mama, pelo envolvimento de genes associados à eliminação de ROS como a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e a catalase, que se encontram enriquecidos na população com características de CSC. Foi descrita a interação entre o CD44 e o transportador do glutamato-cisteína e no controlo dos níveis intracelulares da glutathione, a qual tem como função a eliminação de ROS no cancro gastrointestinal. A expressão de CD44 foi ainda correlacionada com a radiorresistência de tumores da cabeça e do pescoço (Cojoc *et al*, 2014) enquanto a sua expressão associada à  $\beta$ -catenina nuclear se apresentou sobreexpressada em células de cancro do pulmão que sobreviveram à radioterapia. Deste modo, a EMT está também associada com a radiorresistência (Gomez-Casal *et al*, 2013).

No presente estudo experimental, o CD44 teve uma expressão superior na população de esferas em relação a linha de origem ECC-1, com elevação significativa para as esferas ES1, o que sugere intervenção dos mecanismos moleculares descritos na resistência das esferas de carcinoma do endométrio à radioterapia. De facto, já foi demonstrado por outros autores que a inibição da cinase PI3K levou à depleção de células radiorresistentes com fenótipo CD133<sup>+</sup> no cancro do cólon, o que sugere que esta via pode regular a resposta aos danos no DNA (Cojoc *et al*, 2014) A subpopulação CD133<sup>+</sup> foi também associada a resistência à radioterapia em glioblastomas pela ativação da resposta do *checkpoint-2* aos danos no DNA (Rycaj & Tang, 2014). Nos nossos resultados verificámos igualmente um aumento deste marcador na população de esferas, com significado estatístico na população de esferas ES3, o que poderá sugerir interações com estas vias de sinalização na resistência desta população.

A ALDH não é apenas um marcador de CSC mas também lhe é atribuído uma função no aumento do metabolismo. A ALDH é responsável pela destoxificação dos lípidos derivados das reações de peroxidação dos aldeídos em resposta ao stresse oxidativo, levando a um aumento da proteção das células contra danos como os efeitos da radiação. As ROS são a causa mais importante de peroxidação dos lípidos e são produzidos pela cadeia transportadora de eletrões da mitocôndria durante a fosforilação oxidativa (Trautmann *et al*, 2014). Em relação a esta problemática foi demonstrado que as esferas de carcinoma da cabeça e do

pescoço que têm maior fração celular da subpopulação ALDH<sup>+</sup> apresentaram maior resistência à radiação (Leong *et al*, 2014). Na população de esferas de endométrio do nosso estudo a sobre-expressão de ALDH sugere a ativação do mecanismo de oxidação do ácido retinoico de modo a repor o NAD à forma reduzida NADH, o que permite eliminação dos metabolitos tóxicos gerados (Trautmann *et al*, 2014). Este processo poderá explicar o aumento da eliminação de ROS nas populações mais resistentes à radioterapia. Estes mecanismos foram descritos em populações de esferas, admitindo-se uma possível intervenção destas vias na população de derivadas aderentes que inclusivamente apresentaram maior resistência com a irradiação de 15 Gy, para a população G3 e de 30 Gy para as populações G1 e G3. A diferenciação desta população poderá contribuir para a reposição de outras vias que atuam sinergicamente com a resistência à terapêutica.

A resistência à radiação pode ocorrer com níveis baixos de oxigénio, uma vez que a expressão de genes associados a hipoxia pode reduzir a capacidade de reparação do DNA. No entanto este efeito depende do tempo a que as células foram expostas a baixos níveis de oxigénio. Estudos recentes sugerem que as condições de hipoxia podem manter ou mesmo induzir o aparecimento de CSC pelas condições de hipoxia. Alguns dos efeitos da hipoxia são atribuídos à expressão de vários genes dependentes do HIF e que regulam fatores de transcrição associados com as vias de sinalização das CSC como o OCT-4, o NANOG, o SOX2, o KLF4, entre outros (Trautmann *et al*, 2014). A análise proteómica foi aplicada na identificação de proteínas associadas a resistência à radiação. Os estudos sugerem que as proteínas de choque tóxico (HSP, do inglês *heat shock proteins*), a NME1 (do inglês, *nucleoside diphosphate kinase-1*), a RAC-1 (do inglês, *Ras-related C3 botulinum toxin substrate-1*) e a APEX1 (do inglês, *multifunctional DNA-repair Enzyme-1*) foram as proteínas que apresentaram relação com os marcadores de CSC como o CD44, o CD133 e a ALDH e as proteínas envolvidas na radiorresistência (Skvortsov *et al*, 2014).

As vias de morte celular foram avaliadas nas populações submetidas a irradiação, à semelhança do que se efetuou para a avaliação do efeito da quimioterapia. Na linha celular ECC-1 a morte por apoptose foi superior ao controlo após a irradiação com a dose de 30 Gy. No entanto a necrose excedeu os controlos com todas as doses de radiação. Nas esferas ES1 a necrose também foi superior ao controlo após a irradiação com 15 Gy e com 30 Gy. Com a dose de 30 Gy, a apoptose nas esferas ES1 foi inferior ao controlo. Esta população apresentou níveis de necrose superiores aos da linha celular ECC-1 e da população de derivadas aderentes G1 com a dose de 30 Gy. A população G1 apresentou uma via de morte predominante por apoptose com todas as doses de irradiação.

Vários autores descreveram que após a indução, pela irradiação, de danos irreparáveis no DNA, atuam diversos mecanismos celulares como a apoptose, a senescência, a autofagia e a necrose em diversos tipos de células (Nicolay *et al*, 2015). A lesão do DNA resulta numa paragem do ciclo celular, numa tentativa de reparar o DNA, a qual é seguida da decisão da entrada da célula ou em apoptose ou num novo ciclo

celular. A paragem do ciclo celular ocorre nos *checkpoints* das fases G1 e G2, previamente mencionados como *checkpoint-1* e *checkpoint-2* (Dingwall *et al*, 2015). A inibição da apoptose foi descrita em populações com propriedades de CSC de outros tipos de cancros resistentes à radioterapia. No cancro do pulmão, a apoptose nas células da população maioritária foi superior à da população lateral após a irradiação com 8 Gy (Xia *et al*, 2013) enquanto na subpopulação CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> de uma linha celular de cancro da mama submetida a radiação, a apoptose foi menor (Li *et al*, 2012). Recentemente foram realizados estudos em células estaminais embrionárias em comparação com células estaminais embrionárias com características de progressão neoplásica. Esta última população apresentou redução da capacidade da radiação induzir apoptose e apresentou paragem do ciclo celular, em comparação com a população de células estaminais embrionárias (Dingwall *et al*, 2015).

Na tentativa de caracterizar a expressão de vias promotoras de apoptose, no nosso trabalho experimental foi avaliada a expressão da P53 e da caspase 3. A P53 teve uma expressão aumentada na linha celular ECC-1 após a irradiação com 30 Gy, que se correlacionou com a maior apoptose nesta população em relação ao controlo. Na população de esferas ESI, a expressão foi superior em relação ao controlo após a irradiação com 15 Gy, não se verificando diferenças em relação às outras doses de radiação. Neste caso a necrose foi a via que apresentou elevação significativa em relação ao controlo. Na população de derivadas aderentes G1, onde a apoptose foi a via de morte preferencial, a expressão de P53 não apresentou diferenças no que respeita à dose de radiação. A expressão de P53 pode refletir apenas a acumulação da forma mutada, conforme já descrito na secção da terapêutica com citostáticos. Este diferente comportamento da forma mutada da P53 em relação à forma selvagem foi também já relatada por outros autores, os quais mostraram que a irradiação induz apoptose dependente da P53 na forma selvagem, mas não na forma mutada (Hinata *et al*, 2003). Os resultados no nosso estudo apontam para uma ativação da apoptose por outras vias que não a P53, particularmente na população de derivadas aderentes G1.

A P53 é uma proteína muito estudada em diversos tipos de cancro no contexto da terapia com radiação. Em células de cancro da mama da linha celular MCF-7 mostrou ter um aumento da sua expressão dependente da dose de radiação. Também nas mamosferas, apesar do nível de P53 em células irradiadas ser superior ao das células em monocamada, não se verificou um aumento claro em resposta à irradiação com 1 Gy ou com 10 Gy. A sobrevivência destas células iniciadoras tumorais à exposição a radiação foi primariamente dependente de uma subregulação das vias de senescência (Karimi-Busheri *et al*, 2010). Assim, na população com propriedades de CSC a irradiação poderá não desencadear uma sobre-expressão de P53, em resposta à lesão celular. Outras vias foram associadas à inibição da apoptose. A este respeito, em células estaminais de gliomas o tratamento com irradiação aumentou a expressão da via MELK (do inglês, *maternal embryonic leucine zipper kinase*) a qual diminuiu a apoptose induzida pela radiação. A expressão de MELK

excluiu-se com a P53 e a P53 regula negativamente a expressão MELK nas células estaminais de gliomas (Gu *et al*, 2013). A ativação da P53 ativa, por sua vez, múltiplos genes transcripcionais envolvidos na apoptose como o gene da *BAX*, o do *PUMA* (do inglês, *P53 upregulated modulator of apoptosis*), o do *NOXA* (do latim, significa dano, também conhecido como gene *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*) e o do *APAF1*. Independentemente da sua atividade transcripcional, a P53 pode promover apoptose por interação direta com proteínas mitocondriais. Em células estaminais embrionárias submetidas a radiação, a apoptose ocorreu sem ativação transcripcional da P53, o que sugere intervenção pela via mitocondrial (Liu *et al*, 2014a). Portanto, a falha da transcrição do NOXA e do PUMA levou ao aumento da acumulação P53, o que aponta para um papel não transcripcional da P53 na apoptose (Dingwall *et al*, 2015).

A apoptose tardia poderá ser uma via ativada nas populações estudadas no trabalho que conduziu a esta tese, dado que o ensaio clonogénico revelou fatores de sobrevivência reduzidos a longo prazo. Por outro lado os efeitos verificados 24 horas após a irradiação poderão ainda não refletir a ativação das vias de morte estudadas. Também poderá ocorrer mitose catastrófica nestas células, na ausência de P53 selvagem. A morte por necrose poderá ser ativada após a catástrofe mitótica e esta pode constituir a via preferencial na população de esferas, a qual apresentará uma P53 mutada.

A caspase 3 apresentou uma expressão superior após a irradiação com 15 Gy na linha celular ECC-1 e nas esferas ESI. No entanto, estes dados não se correlacionam com a ativação da apoptose nestas doses de irradiação. Ainda se destaca que, sendo a apoptose a via de morte preferencial nas células derivadas aderentes GI, a expressão de caspase 3 não apresentou diferenças em relação ao controlo. Mais uma vez os dados sugerem que a via de morte não está dependente de caspases nestas populações, conforme discutido relativamente aos estudos do efeito dos citostáticos. Alguns trabalhos realizados por outros autores avaliaram a expressão de caspase 3 após a irradiação de CSC. O aumento da ativação da caspase 3 e da caspase 9 foi associado com a população maioritária e não com a população lateral no cancro do pulmão (Xia *et al*, 2013). Em células estaminais mesenquimatosas de meduloblastoma, a caspase 3 teve uma expressão semelhante ao controlo após a irradiação com 8 Gy, no entanto, nas células estaminais mesenquimatosas que expressam o ligando do TRAIL, observou-se indução da apoptose mediada por caspase 3 (Nesterenko *et al*, 2012). Quando a catástrofe mitótica é ativada, a célula pode morrer em apoptose, mediada por caspases ou, em alternativa, pode sofrer uma morte independente de caspases que culmina em necrose (Pruschy, 2009). Esta poderá ser a via de morte da população de esferas ESI deste trabalho que apresentaram ativação da necrose, particularmente após a irradiação com 15 Gy e com 30 Gy. No entanto, nas células derivadas aderentes GI a apoptose foi ativada com a radiação e a expressão de caspases não apresentou diferenças entre as doses irradiadas usadas. Assim, algumas proteínas libertadas, como resultado da permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP, do inglês *mitochondrial outer membrane*

*permeabilization*), como o AIF (do inglês *apoptosis-inducing factor*), a HtrA2/Omi (do inglês, *human protein serine protease*) e a endonuclease G, podem promover mecanismos de morte independentes de caspases. A morte independente de caspases pode também resultar em estímulos que causam permeabilização da membrana lisossomal, com a consequente libertação de proteases catépsinas (Kroemer & Martin, 2005).

O estudo de danos no DNA, através do ensaio cometa, realizado no nosso estudo experimental, revelou que o P90 para os momentos de cauda foi superior na linha celular ECC-I após o tratamento com 15 Gy e 30 Gy em relação ao controlo e às restantes populações estudadas. A população de derivadas aderentes GI apresentou o menor valor de P90 dos momentos de cauda considerando todas as irradiações. A população de esferas ESI apresentou valores superiores à da população de origem ECC-I para as doses de 0,5 Gy, sendo inferior para 15 Gy e 30 Gy. Estes dados refletem menores danos no DNA na população de esferas ESI e na população de derivadas aderentes GI, em relação à linha parental para as doses mais elevadas (15 Gy e 30 Gy). A exposição à radiação ionizante pode originar várias lesões no DNA, das quais a mais grave é a quebra de dupla cadeia, a qual origina mutações, instabilidade genómica e apoptose. Como resposta ao dano de DNA iniciam-se mecanismos de reparação. Os primeiros passos da reparação de DNA incluem a ativação da ATM, da ATR e a ativação de alvos a jusante como as histonas, particularmente a H2AX e a 53BP1 (Chitikova *et al*, 2014). Foi descrita a indução de senescência pela irradiação em células resistentes à apoptose, a qual era determinada pela persistência de lesões de DNA não reparadas e que levam à manutenção da ativação das vias de reparação de lesões de DNA (Chitikova *et al*, 2014). Quanto à diminuição do número de células com quebras na cadeia de DNA que verificámos neste estudo, 24 horas após a irradiação, na população de esferas ESI e na população de derivadas aderentes GI, em relação à população parental ECC-I, pode refletir uma forma distinta de processamento e de reparação das quebras de dupla cadeia de DNA (Rycaj & Tang, 2014). De facto, foi já mostrado em células MCF-7 irradiadas com 4 Gy, que a reparação de quebras de cadeia única de DNA foi mais precoce após irradiação nas células com fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> do que nas células em monocamada após a irradiação com 4 Gy. A expressão de um painel de proteínas associadas com reparação de quebras de cadeia única demonstrou que a APE1 (do inglês *apurinic/aprimidinic endonuclease 1*) foi expressa em níveis mais elevados em culturas não irradiadas e nas mamíferas irradiadas (Karimi-Busheri *et al*, 2010). Estes dados sugerem que na população de esferas ESI e na população de derivadas aderentes GI pode existir um atraso nos mecanismos de lesão de DNA e a sua reparação pode envolver proteínas sobre-expressas nesta população.





## **CAPÍTULO VII — MODELO ORTOTÓPICO**



A existência de um modelo animal experimental capaz de aferir determinadas características de uma patologia humana é uma importante ferramenta à evolução da prática clínica em medicina. O modelo animal ortotópico de cancro do endométrio pretendeu avaliar o comportamento das células tumorais quando inoculadas no local anatómico em que ocorre o tumor primário. Este modelo permite uma aproximação ao cancro humano, incluindo a histologia do tumor, a vascularização, as interações com microambiente e as vias de disseminação. Os modelos ortotópicos podem originar metástases, ao contrário do que sucede com a injeção subcutânea de células tumorais e fornecem dados relevantes da interação tumor-hospedeiro (Khanna & Hunter, 2005)

No cancro do endométrio a doença avançada é heterogénea, pode apresentar um comportamento pouco previsível e resposta variável ao tratamento. Os locais de metastização podem incluir os gânglios linfáticos pélvicos e os para-aórticos, as metástases intra-abdominais, as metástases pulmonares e outro tipo de localizações inoperáveis (Burke *et al*, 2014a). A disseminação do cancro do endométrio ocorre primariamente por via linfática, por via transperitoneal para os anexos e para a pélvis e por via hematogénica para locais à distância (Doll *et al*, 2009). A resposta às terapêuticas sistémicas e locais na doença avançada é muitas vezes insuficiente, salientando a importância de alargar o conhecimento deste processo.

## Material e Métodos

O estudo experimental decorreu no Serviço de Biofísica do Instituto de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra respeitando todas as disposições legais em vigor no que se refere à experimentação animal. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (Of. Ref<sup>a</sup> IBB 48/09, ANEXO II).

### Modelo ortotópico de cancro do endométrio

O modelo ortotópico de cancro do endométrio desenvolvido assenta na injeção direta de células tumorais na cavidade endometrial através de um procedimento cirúrgico (Doll *et al*, 2009). Pretendeu-se que este

modelo refletisse a capacidade tumorigênica e de invasão da linha celular ECC-1 em comparação com as populações de esferas ESI e de derivadas aderentes GI assim como o potencial de metastização dos respetivos tumores primários.

Neste modelo ortotópico foram utilizados ratos fêmeas com 8 a 10 semanas de idade da estirpe *Rowett Nude* (RNU). Os animais foram mantidos durante todo o período de experiência sob condições de temperatura e de humidade constantes, ciclos de luz e de escuro de 12 horas em alternância, assim como de esterilidade e de assepsia. A todos os animais foi fornecida água e comida *ad libitum*. Do ponto de vista anatómico, conforme descrito na Figura 85, o útero do rato é um órgão duplo, designado útero bicórneo que se junta distalmente num único corpo. O útero encontra-se suspenso à parede posterior do abdómen pelo mesométrio que corresponde a ligamentos largos que contém os vasos sanguíneos e linfáticos e os nervos. O segmento cranial do útero é dividido em duas cavidades separadas por um septo mediano. O segmento caudal ou colo consiste numa cavidade única que se liga à vagina. As trompas apresentam três segmentos, a ampola, o infundíbulo e o segmento intramural. A parte distal é constituída por fimbrias e abre diretamente no ovário. No rato os ciclos denominam-se estros, duram 4-6 dias e ocorrem de forma contínua dividindo-se em proestros, estros, metestros 1, metestros 2 e diestros. A mucosa endometrial apresenta um epitélio colunar que se estende por estruturas glandulares tubulares que se ramificam no miométrio. O miométrio tem uma camada de músculo liso circular interna e uma longitudinal externa (Piper M. Treuting, 2012) Os vasos do mesométrio são perfundidos por sangue proveniente da extremidade ovárica e uterina tratando-se, do ponto de vista hemodinâmico, de um fluxo bidirecional. Os vasos secundários, análogos às artérias arcuatas em seres humanos podem formar ansas com a artéria principal e as artérias radiais terciárias que ligam as ansas arqueadas com a parede uterina (Osol & Moore, 2014).

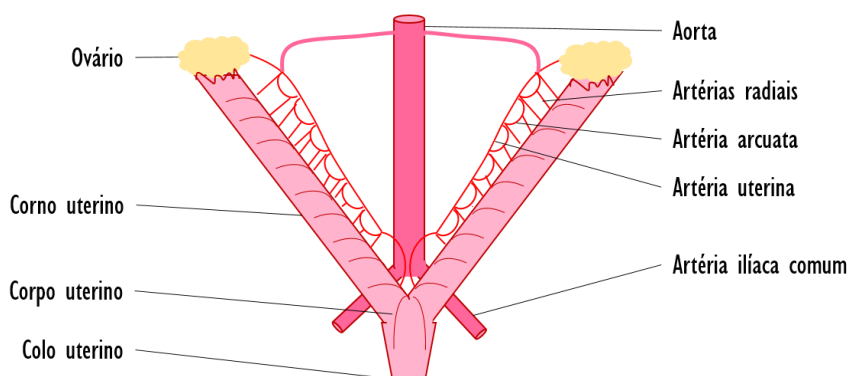


Figura 85: Representação esquemática da anatomia do trato genital feminino no rato.

No modelo ortotópico foram preparadas suspensões celulares com  $2 \times 10^7$  células da linha celular ECC-1 e

das populações ESI e GI. Antes de qualquer procedimento os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e clorpromazina, administrada por via intramuscular no membro posterior na concentração de 60 mg/kg de quetamina e 15 mg/kg de clorpromazina.

O procedimento iniciou-se com a colocação dos animais na mesa operatória em decúbito dorsal. A região abdominal foi desinfetada e realizou-se uma laparotomia por incisão mediana nos quadrantes inferiores, com cerca de 3 cm. Foi exposta a cavidade pélvica e identificou-se o útero. Seguidamente realizou-se laqueação do segmento inferior, a nível supracervical com fios de seda 3/0 de modo a não permitir a saída da suspensão celular pela vaginal, como representado na Figura 86.

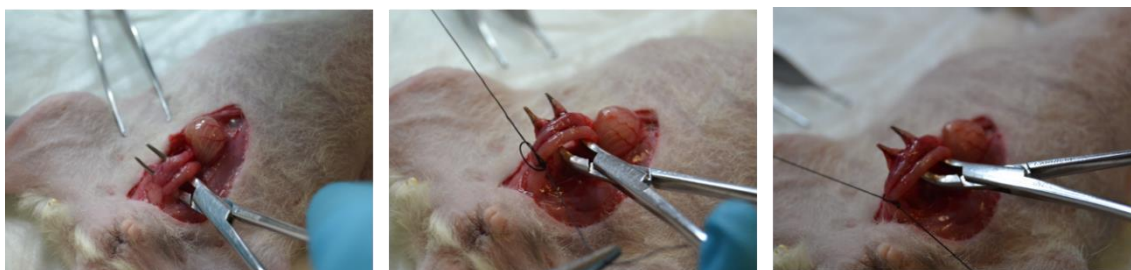


Figura 86: Laqueação do segmento inferior uterino a nível supra-cervical.

Foi realizada a administração, com uma agulha de 25 G, de cerca de 100  $\mu$ L de suspensão celular na cavidade endometrial de cada um dos cornos uterinos, conforme descrito na Figura 87, de modo a distribuir o volume para que não ocorresse derramamento pela extremidade distal da trompa devido ao excesso de volume. Para evitar a saída para a cavidade abdominal da suspensão celular, a região da injeção foi pressionada durante alguns segundos.



Figura 87: Inoculação da suspensão celular em cada um dos hemiúteros seguida de pressão gentilmente exercida no local de injeção de forma a evitar a saída do conteúdo para a cavidade abdominal.

Os órgãos foram reintroduzidos na cavidade abdominal e a pele foi encerrada com material de sutura

apropriado. Os animais ficaram em vigilância nas primeiras horas após a intervenção. Todos os animais foram monitorizados de dois em dois dias no que diz respeito ao seu peso e alteração de hábitos comportamentais durante 16 semanas.

### Estudos de medicina nuclear

A medicina nuclear constitui um método de imagem e de terapêutica que utiliza a radiação ionizante emitida por átomos instáveis. O princípio da sua utilização baseia-se na capacidade de um radiofármaco permitir a obtenção de informação acerca da biodistribuição *in vivo*. A maioria dos radiofármacos consistem na combinação de um radionuclídeo com um princípio ativo. O radiofármaco utilizado neste trabalho experimental foi o  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi (MIBI, do inglês *six (sesta=6) methoxyisobutylisonitrile ligands*). Este radiotraçador é um catião monovalente e lipofílico cuja captação se realiza por difusão passiva, assim como, pela diferença de potencial através da membrana mitocondrial. Tendo por base os mecanismos de captação está indicada a sua utilização para o estudo funcional do miocárdio para além da deteção de regiões de intensa atividade metabólica e proliferativa, nomeadamente na área oncológica (Carvalho *et al*, 2015a).

Os estudos imagiológicos foram realizados três a cinco dias antes da occisão dos animais. Para a aquisição das imagens os animais foram anestesiados de acordo com o descrito anteriormente e o radiofármaco foi administrado por via endovenosa na veia da cauda. Seguidamente, as imagens foram adquiridas na câmara-gama (GE 400 AC, Milwaukee), colimada com colimador paralelo de alta resolução e de baixa energia, para um computador de aquisição GenieAcq, que a controla. As diferentes aquisições foram realizadas com os animais em decúbito ventral, iniciando-se, imediatamente após a administração do radiofármaco, por uma sequência dinâmica de 20 imagens com duração individual de 30 segundos para matriz de 128x128 elementos de resolução, seguida de imagens estáticas de 60 segundos cada para matriz de 256x256 elementos de resolução aos 30, 60 e 90 minutos após a administração do radiofármaco.

### Necropsia

Todos os animais foram occisados por sobredose anestésica 16 semanas após a inoculação das diferentes populações de células ou após demonstrarem alterações do hábito externo, das funções orgânicas básicas, sinais de desconforto, alterações da postura e da atividade motora e perda de peso superior a 20%. Após occisão foram excisados o útero e os ovários, o baço, o fígado e os pulmões, assim como outros órgãos ou lesões identificadas que pudessem traduzir lesões secundárias suspeitas. As lesões secundárias foram consideradas para as localizações distintas do local de injeção, macroscopicamente visíveis e posteriormente confirmadas histologicamente.

## Histologia e imunohistoquímica

Para a realização da análise histológica após excisão, as amostras foram fixadas em formalina tamponada na concentração de 10%, desidratadas com concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e embutidas em parafina e cortadas em secções de 4  $\mu\text{m}$  de espessura. A avaliação histológica foi realizada com recurso a coloração com H&E, caracterizando a existência ou não de neoplasia maligna, grau de diferenciação (baseado na proporção de elementos glandulares/sólidos), bem como considerações acerca da morfologia (pleomorfismo nuclear, nucléolos, atividade mitótica) e necrose.

No que diz respeito aos estudos de imunohistoquímica estes foram efetuados em catorze blocos referentes a três grupos inoculados com as três populações de células, a linha celular ECC-1, as esferas ESI e as derivadas aderentes G1, englobando 9 tumores primários e 5 metástases. Obtiveram-se secções de 5  $\mu\text{m}$  de espessura que foram submetidas a desparafinização. Posteriormente foram expostas a peróxido de hidrogénio com o objetivo de bloquear a atividade da peroxidase endógena tendo sido a recuperação antigénica conseguida com recurso a um condicionador celular Ultra CCI (Ventana Medical Systems, AZ). Os sinais foram detetados com recurso a 3,3'-diaminobenzidina (Dako), tendo-se utilizado os seguintes anticorpos: E-caderina (NHC-38, Dako North America, CA), P53 (DO-7, Dako) e Ki67 (MIB-1, Dako). A avaliação da marcação de cada lâmina foi efectuada utilizando uma escala para cada marcação. Para a E-caderina, zero corresponde a ausência de marcação membranar ou marcação membranar quebrada e um a marcação membranar forte e contínua. Para o Ki67, cuja avaliação foi efectuada tendo em conta a marcação nuclear, zero corresponde a ausência de marcação, um corresponde a marcação nuclear entre 1% e 25% das células tumorais, dois corresponde a marcação entre 26% e 50% das células tumorais, três corresponde a marcação entre 51% e 75% das células tumorais e quatro corresponde a marcação entre 76% e 100% das células tumorais. A avaliação do Ki67 foi efectuada tendo em conta a marcação nuclear, independentemente da intensidade de marcação. Para a P53 zero corresponde a ausência de marcação, um corresponde a marcação nuclear entre 1% e 25% das células tumorais, dois corresponde a marcação nuclear entre 25% e 50% das células tumorais, três corresponde a marcação nuclear entre 51% e 75 das células tumorais e quatro corresponde a marcação nuclear entre 76% e 100% das células tumorais. Todas as lâminas foram observadas em microscópio ótico Nikon Eclipse 50i, sendo as imagens obtidas por intermédio de uma câmara fotográfica Nikon-Digital Sight DS-Fi1.

## Western blot

Para a preparação dos extratos de proteína total os fragmentos dos tumor e das metástases foram submetidos a fragmentação e a homogeneização mecânica em *potter* com RIPA suplementada com um

cocktail de inibidores de proteases (cOmplete Mini, Roche) e 1 mM de DTT. Os procedimentos de sonicação e de centrifugação foram realizados conforme descrito no capítulo V.

O protocolo de western blot foi executado conforme descrito no capítulo V, utilizando a marcação para a ALDH e para a  $\beta$ -catenina, já referenciadas no mesmo capítulo. Os resultados da avaliação da expressão no tumor são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da proteína de interesse normalizada à intensidade de fluorescência obtida para a mesma proteína na linha celular ECC-1. Os resultados para a avaliação da expressão na metástase foram processados sob a forma de razão metástase/tumor.

## Resultados

A evolução do processo tumorigênico e metastático no cancro do endométrio estão ainda por caracterizar, nomeadamente no que se refere aos eventos moleculares que estão na base do desenvolvimento, da progressão, da invasão e da geração de metástases (Cabrera *et al*, 2012). Após a caracterização celular descrita no capítulo V, pretendeu-se avaliar o comportamento de cada população, ECC-1, ESI e GI, após inoculação intrauterina.

A necropsia revelou formação de tumor em 8 dos 25 (32%) animais injetados com ECC-1, em 6 dos 14 (43%) animais injetados com a população de esferas ESI e em 7 dos 13 (54%) animais injetados com a população de derivadas aderentes GI conforme descrito na Tabela 12. Considerando os animais em que a inoculação de células tumorais desenvolveu tumor, a presença de lesões secundárias foi superior no grupo de esferas ESI (67%), seguida da população de derivadas aderentes GI (48%) e o grupo com menor frequência foi o grupo da linha celular ECC-1 (38%). Outros órgãos como o baço, o fígado e o pulmão foram sistematicamente avaliados e enviados para estudo histológico, sem deteção de doença secundária. As alterações da postura e da atividade motora foram detetadas em dois animais, um do grupo ECC-1 e outro do grupo GI. Assim, estes animais foram occisados e apresentaram tumores uterinos.

Tabela 12: Presença de tumor e de metástases nos animais injetados com ECC-1, ESI e GI após 16 semanas.

	Animais inoculados	Tumor uterino	Metástase
<b>ECC-1</b>	25	8 (32%)	3/8 (38%)
<b>ESI</b>	14	6 (43%)	4/6 (67%)
<b>GI</b>	13	7 (54%)	3/7 (48%)



No que diz respeito à avaliação imagiológica por medicina nuclear, após administração do radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI identificou-se em alguns casos a presença de tumor pélvico nos ratos do grupo injetado com as células ECC-1. Na Figura 88 apresenta-se uma imagem da sequência dinâmica adquirida correspondente aos primeiros 30 segundos após administração do radiofármaco, onde é possível identificar a presença de tumor.

A inoculação da linha celular ECC-1 revelou a presença de tumor em 8 animais, dos quais se representa um caso na Figura 88. Observa-se logo após a laparotomia, a presença de uma formação tumoral com sede uterina, medindo cerca de 1,5 cm por 2 cm, lobulada, endurecida, que após secção evidenciou conteúdo esbranquiçado, com zona central amolecida. A análise histológica da peça que se exemplifica revelou formação tumoral constituída por áreas sólidas, apresentando células poligonais, com citoplasma eosinófilo e núcleo pleomórfico, hipercromáticos e de cromatina e nucléolo proeminente. Destacou-se ainda a presença de intensa atividade mitótica, com formas atípicas.

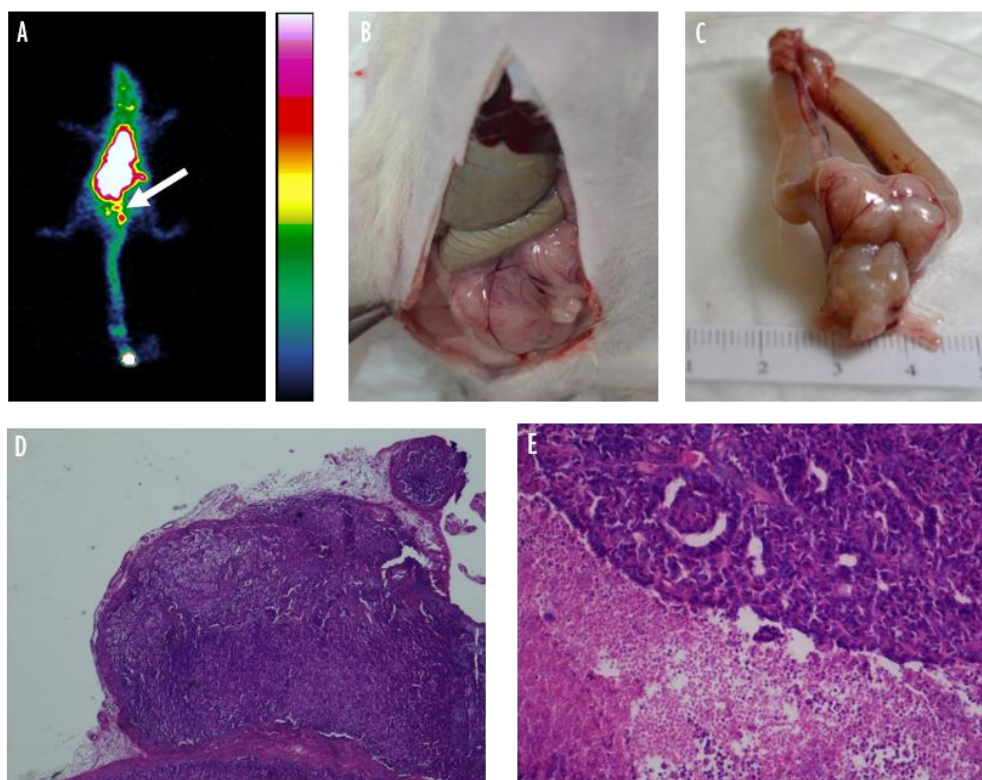


Figura 88: A) Imagem representativa da captação de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI pelo tumor pélvico observado num dos ratos inoculados com ECC-1. B) Imagem representativa do tumor pélvico após a occisão. C) Imagem *ex vivo* do útero contendo formação tumoral. D) Imagem histológica com a coloração de hematoxilina e eosina (H&E) e ampliação de 40x, onde se observa formação tumoral de crescimento expansivo, densamente celular. E) Imagem histológica com a coloração de H&E e ampliação de 200x, onde se observa uma neoplasia maioritariamente sólida, com raras imagens glandulares, aumento da relação núcleo/citoplasma e núcleos hipercromáticos e com necrose.

A injeção intrauterina das esferas ESI originou o aparecimento de tumor em 6 animais, exemplificando-se também um caso na Figura 89. A imagem de captação do  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$  não revelou a presença do tumor que depois foi demonstrado na necropsia. Após a laparotomia foi visível um tumor pélvico com sede uterina que envolvia todo órgão, englobava as trompas, medindo 3 cm por 3,5 cm. A estrutura apresentava consistência dura, multilobulada e com conteúdo cerebriforme. A histologia revelou neoplasia maligna semelhante entre todos os tumores do grupo, constituída morfológicamente por maciços e pequenos ninhos de células de citoplasma hipereosinófilo, com núcleos irregulares, hiper cromáticos e com pleomorfismo moderado a grave. Identificaram-se áreas de comedonecrose.

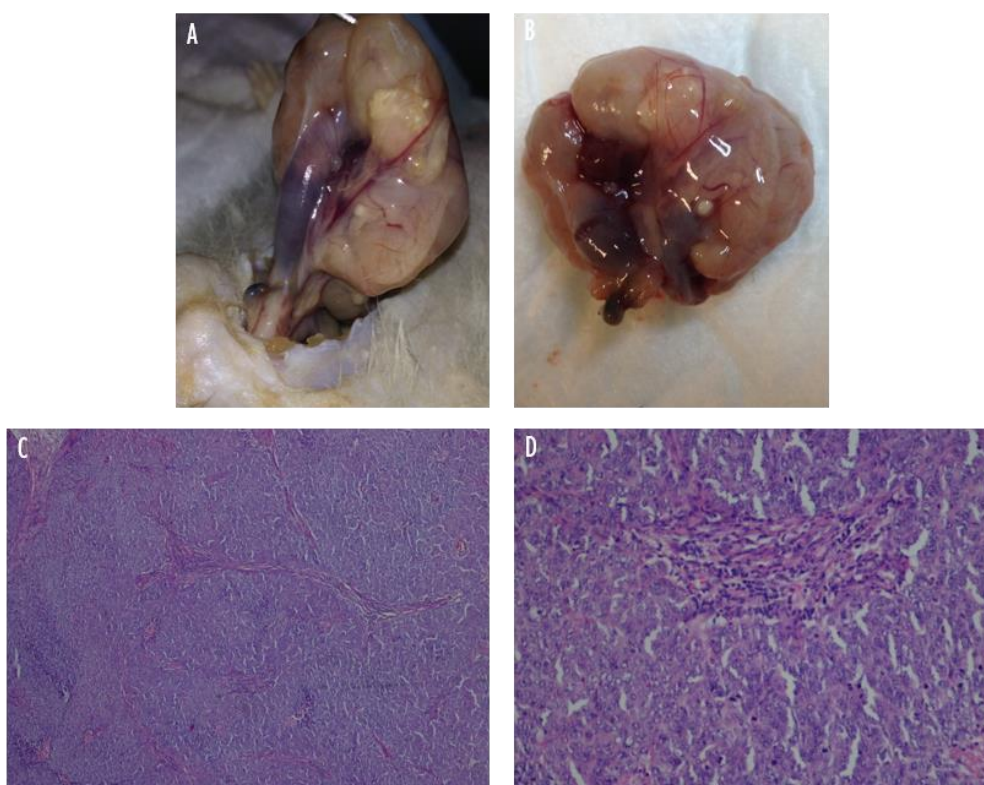


Figura 89: Imagens macroscópicas e histológicas de tumor uterino de um rato inoculado com esferas ESI. A) Imagem representativa do tumor pélvico após a occisão. B) Imagem *ex vivo* do útero contendo formação tumoral que envolve todo o órgão e as trompas. C) Imagem histológica com a coloração de hematoxilina e eosina (H&E) e ampliação de 40x, onde se observa formação tumoral sólida, densamente celular, formando ninhos, separados por finos septos fibrosos. D) Imagem histológica com a coloração de H&E e ampliação de 200x, onde se observam células poligonais, de citoplasma hipereosinófilo e núcleos pleomórficos, com atividade mitótica; nos septos observa-se discreto infiltrado inflamatório.

A injeção intrauterina com as células derivadas aderentes GI originou tumor em 7 casos, dos quais se exemplifica um deles na Figura 90. A imagem de captação do  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$  não revelou a presença de tumor

em nenhum dos animais que depois foi demonstrado no estudo necrópsico. A laparotomia revelou a presença de focos tumorais no útero, distribuídos pelo corpo e pela parte proximal de ambos os hemiúteros. Na extremidade distal do útero observaram-se os ovários, de aspeto congestivo e edemaciado. O estudo histológico revelou neoplasia maligna semelhante entre todos os tumores do grupo, com descrição de formação tumoral expansiva constituída morfologicamente na sua maioria por áreas sólidas, com escassas áreas glandulares, compostas por células de citoplasma hipereosinófilo, com pleomorfismo marcado e núcleos com cromatina aberta e nucléolo evidente. Observaram-se áreas de necrose de tipo comedo e reação desmoplásica e mitoses.

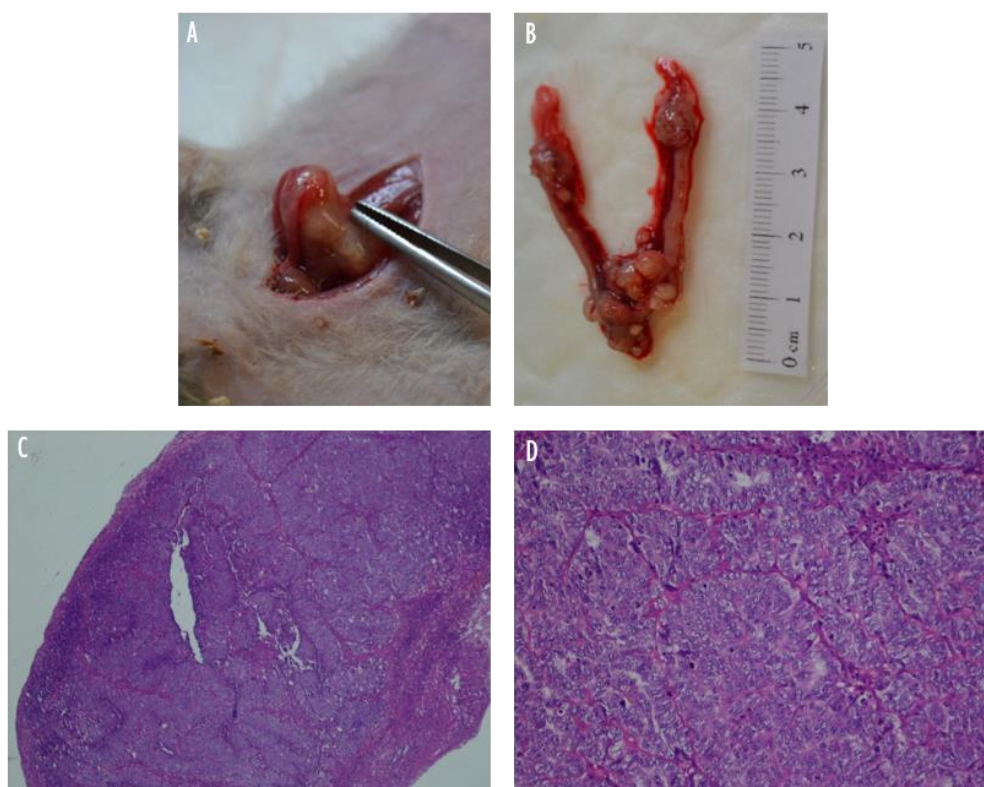


Figura 90: Imagens macroscópicas e histológicas de tumor uterino de um rato inoculado com esferas ESI. A) Imagem representativa do tumor pélvico após a occisão. B) Imagem *ex vivo* do útero com vários focos tumorais milimétricos dispersos sobretudo no corpo e parte proximal dos hemiúteros. C) Imagem histológica com a coloração de hematoxilina e eosina (H&E) e ampliação de 40x, onde se observa formação tumoral sólida, formando ninhos celulares, separados por finos septos fibrosos D) Imagem histológica com a coloração de H&E e ampliação de 200x, onde se observam células poligonais, de limites relativamente bem distintos, com aumento da relação núcleo/citoplasma e núcleos de contorno irregulares, de cromatina aberta e nucléolo evidente.

Alguns animais apresentaram lesões secundárias confirmadas histologicamente, conforme descrito na

Tabela 13. Na Figura 91 observam-se algumas imagens macroscópicas representativas dos focos metastáticos de animais injetados com células da linha celular ECC-I (A, B e C), com as esferas ESI (D, E, F) e com as células derivadas aderentes GI (G, H, I). No grupo de animais injetados com as células da linha ECC-I, um dos animais apresentou uma metástase da parede abdominal, representado na Figura 91-A, e outro animal um implante pélvico, representado na Figura 91-C. Um outro animal apresentou uma metástase da parede abdominal, representado na Figura 91-B e apresentou disseminação para o ovário, a qual foi confirmada histologicamente. No grupo de animais injetados com as esferas ESI, dois dos animais apresentaram uma metástase da parede abdominal, representado na Figura 91-F e um implante no diafragma. Outro animal apresentou uma metástase mesentérica, representado na Figura 91-D, e outra no diafragma. Outro animal apresentou focos metastáticos adjacentes ao cego, representado na Figura 91-E. Relativamente à metastização no grupo de animais injetados com as células derivadas aderentes GI observou-se num animal uma metástase da parede abdominal, representado na Figura 91-G, e uma metástase ovárica representada na Figura 91-H. Num outro animal observou-se uma metástase da parede abdominal e uma metástase mesentérica. Outro animal apresentou implantes pélvicos, representado na Figura 91-I. A incidência de lesões secundárias foi superior no grupo injetado com as esferas ESI assim como foi neste grupo que se observaram as localizações mais distantes do tumor primitivo.

Tabela 13: Localização das lesões secundárias nos animais injetados com ECC-I, ESI e GI.

Localização das lesões secundária	ECC-I	ESI	GI
Parede abdominal	2	2	1
Implantes pélvicos	1		1
Metastização ovárica	1		2
Metástase mesentérica		1	1
Metástases adjacentes ao cego		1	
Diafragma		2	

O estudo histológico confirmou a existência de doença metastática nos locais supracitados, tendo-se observado neoplasia maligna de características morfológicas semelhante às encontradas nos tumores primários. A Figura 92 mostra as imagens histológicas representativas das metástases dos animais injetados com células da linha celular ECC-I (A e B), com as esferas ESI (C e D) e com as células derivadas aderentes GI (E e F). Relativamente ao animal injetado com células da linha ECC-I descreve-se a presença de uma neoplasia expansiva, maioritariamente sólida, necrosada, com células de citoplasma eosinófilo, por vezes indistinto, com núcleos pleomórficos e nucléolo evidente, que correspondeu a metástase da parede

abdominal, como se observa na Figura 92-A e na Figura 92-B. Do grupo injetado com as esferas ESI observa-se neoplasia maligna maioritariamente sólida, com raras áreas glandulares, bem vascularizada, de células de citoplasma eosinófilo e núcleos de cromatina aberta e nucléolo evidente, que correspondeu a metástase mesentérica, como se observa na Figura 92-C e na Figura 92-D. Em relação aos animais injetados com as células derivadas aderentes GI, visualizou-se neoplasia maligna maioritariamente sólida e amplamente necrosada constituída por maciços celulares, separados por septos fibrosos, de células com pleomorfismo nuclear marcado e núcleos hiper cromáticos, com cromatina aberta e nucléolo evidente, que correspondeu a uma metástase mesentérica, como se observa na Figura 92-E e na Figura 92-F.

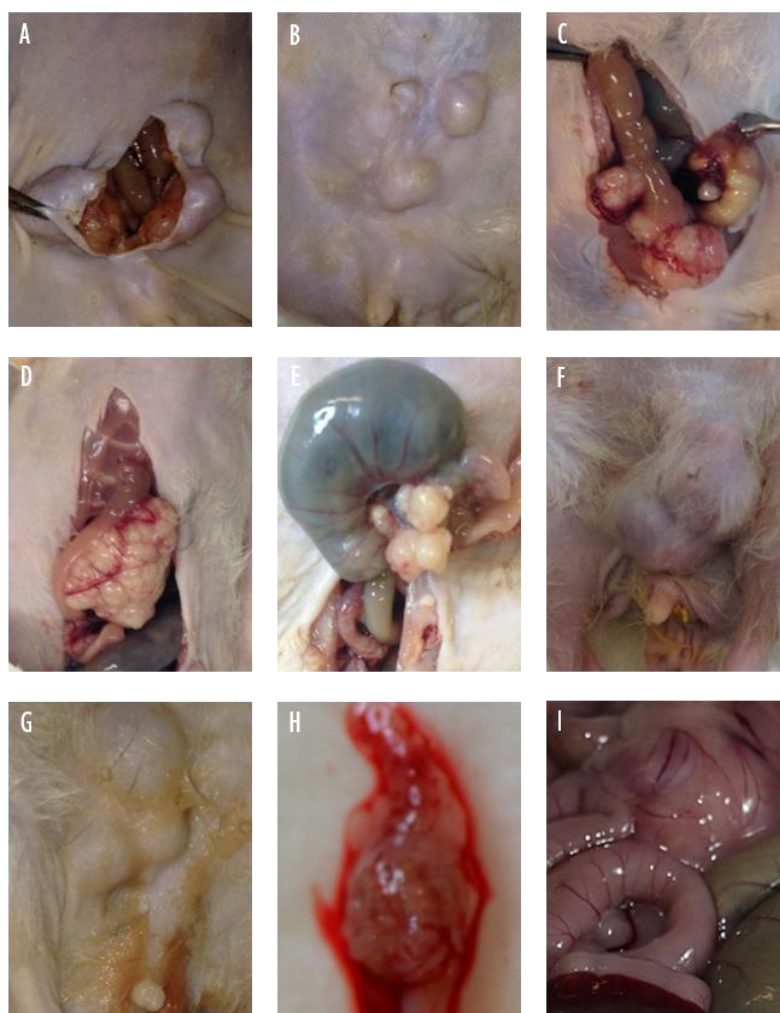


Figura 91: Imagens macroscópicas ilustrativas de focos metastáticos de animais injetados com ECC-I (A, B e C), ESI (D, E, F) e GI (G, H, I). A) metástases da parede abdominal. B) metástases da parede abdominal. C) implantes pélvicos. D) metástase mesentérica. E) metástase adjacente ao cego. F) metástase da parede abdominal. G) metastização da parede abdominal, H) metástase ovárica. I) implante pélvico.

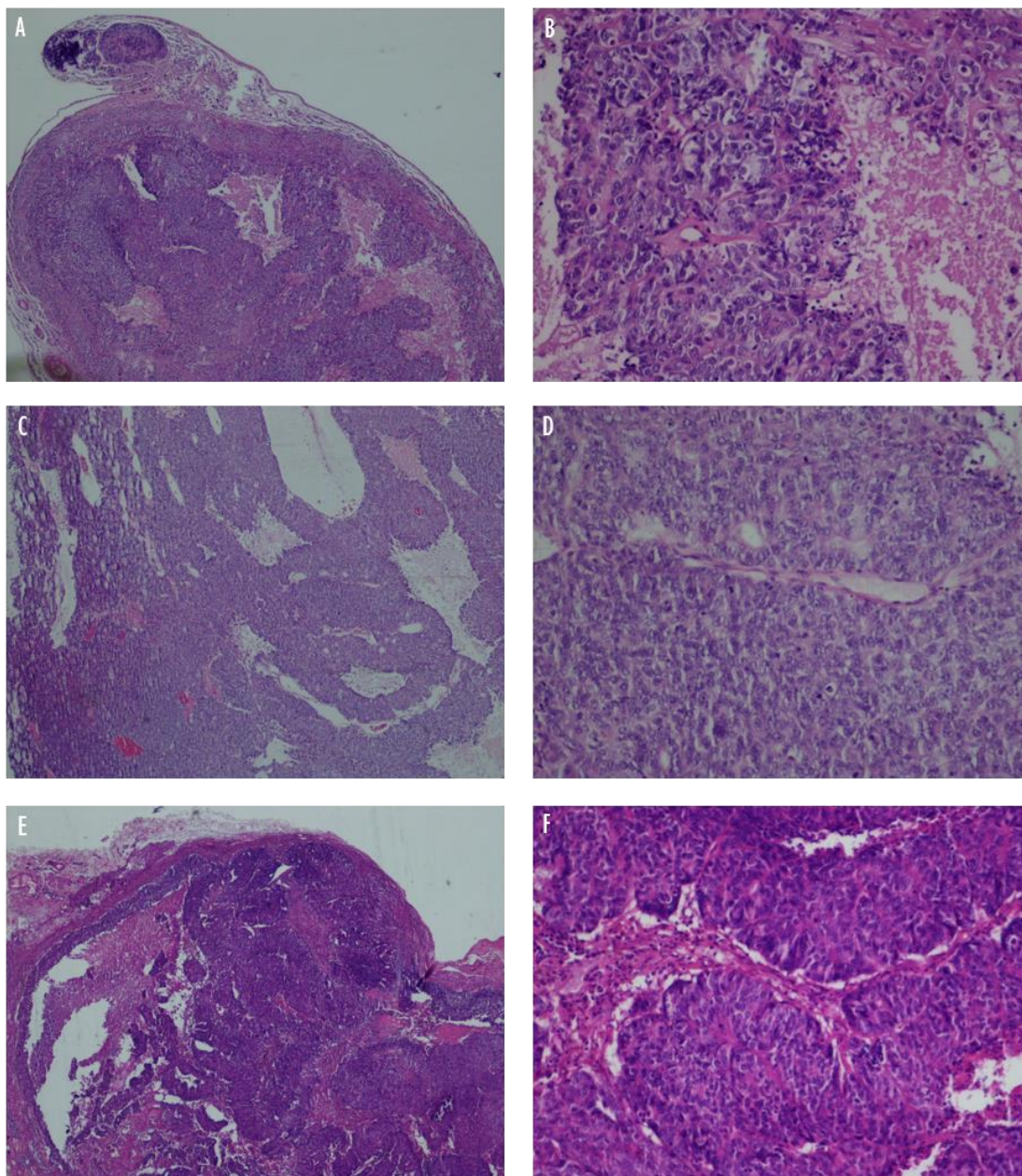


Figura 92: Imagens histológicas representativas das metástases dos animais injetados com células da linha ECC-1 (A e B), com esferas ESI (C e D) e com células derivadas aderentes G1 (E e F), com a coloração de hematoxilina e eosina (H&E). A) Imagem histológica com ampliação de 40x, onde se observa formação tumoral expansiva, sólida e necrosada, correspondendo a metástase da parede abdominal B) Imagem histológica com ampliação de 200x, onde se observam células de citoplasma eosinófilo com nucléolo evidente, com necrose a apoptose, correspondendo a metástase da parede abdominal C) Imagem histológica com ampliação de 40x, de formação tumoral maioritariamente sólida, bem vascularizada, com raras áreas pseudoglandulares, correspondendo a metástase mesentérica. D) Imagem histológica com ampliação de 200x, onde se observa células de citoplasma bem definido e eosinófilo e núcleo de cromatina aberta e nucléolo evidente, correspondendo a metástase mesentérica. E) Imagem histológica com ampliação de 40x, onde se observa tumor sólido extensamente necrosado e de crescimento expansivo, correspondendo a metástase mesentérica. F) Imagem histológica com ampliação de 200x, onde se observam áreas sólidas, separadas por septos fibrosos, com células de pleomorfismo nuclear marcado, ora hiper Cromáticas, ora com nucléolo evidente, correspondendo a metástase mesentérica.

Os estudos de imunohistoquímica, representados na Figura 93 e na Figura 94 avaliaram a marcação do Ki67, da P53 e da E-caderina nos tumores e nas metástases dos grupos deste estudo experimental. Conforme descrito na Tabela 14, a marcação para o Ki67 foi classificada como 4 nas amostras de tumores da linha celular ECC1 e das esferas ESI, assim como nas respectivas metástase. Em relação aos tumores e às metástases com origem nas células derivadas aderentes GI, observou-se marcação classificada como 4 nos tumores, no entanto nas metástases esta intensidade diminuiu para 2, o que representa um decréscimo do índice proliferativo. A marcação para a P53 também foi classificada como 4 e sem diferenças entre os grupos estudados. Relativamente à E-caderina, observou-se ausência de marcação nos tumores da linha celular ECC-1 e das esferas ESI, quer para as amostras de tumor quer para as de metástases. No entanto, para os tumores com origem nas células derivadas aderente GI, observou-se expressão de E-caderina na amostra do tumor, classificada como 1, tendo a metástase apresentado perda desta marcação.

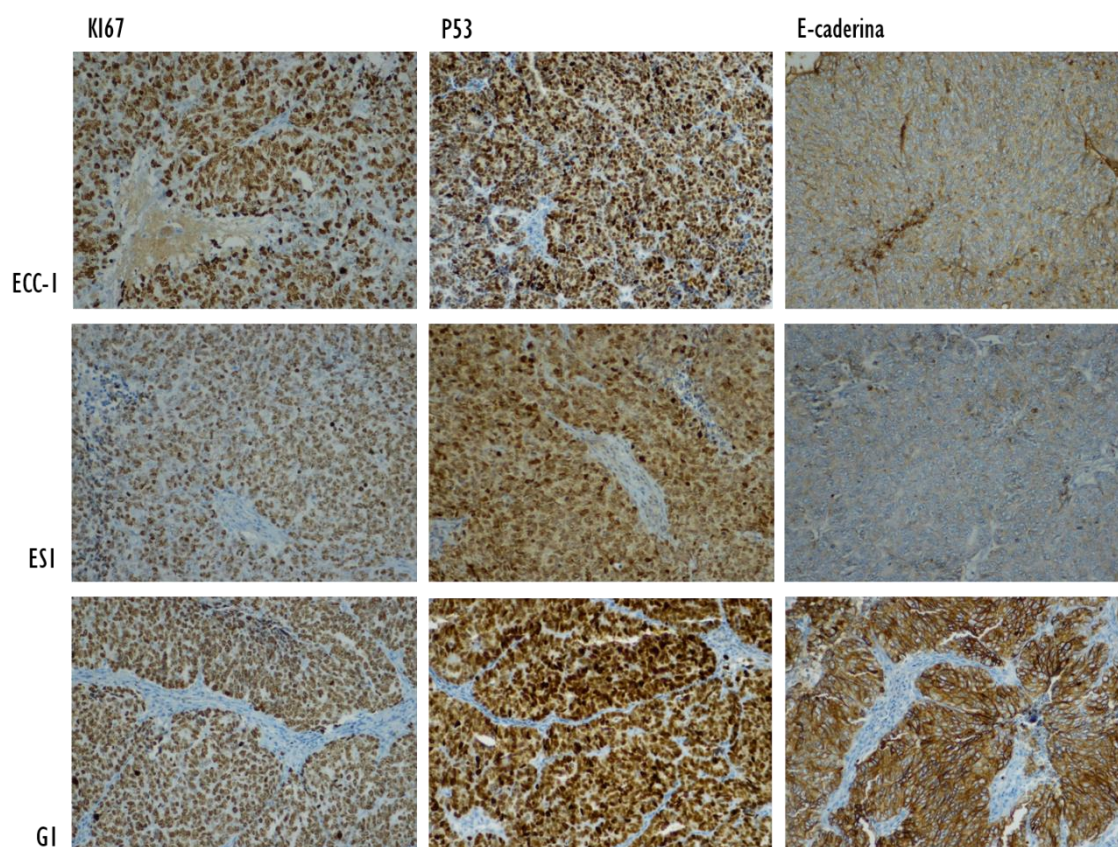


Figura 93: Imagens histológicas representativas da marcação imunohistoquímica de Ki67, de P53 e de E-caderina no tumor uterino de cada grupo injetado com ECC-1, ESI e GI. A intensidade de marcação correspondeu a 4 para o Ki67 e a P53 em todos os casos. A marcação de E-caderina correspondeu a 0 para ECC-1 e ESI e a 1 para GI. Todas as imagens foram adquiridas numa ampliação total de 200x.

Tabela 14: Marcação imunohistoquímica da expressão de Ki67, de P53 e de E-caderina nos tumores e nas metástases dos grupos injetados com ECC-I, ESI e GI.

	ECC-I		ESI		GI	
	Tumor	Metástase	Tumor	Metástase	Tumor	Metástase
Ki67	4	4	4	4	4	2
P53	4	4	4	4	4	4
E-caderina	0	0	0	0	1	0

A Figura 93 representa imagens da imunohistoquímica com a marcação do tumor para o Ki67, a P53 e a E-caderina. A marcação do Ki67 e da P53 observou-se em mais de 76% das células tumorais com origem nas populações ECC-I, ESI e GI. A E-caderina não foi expressa nos tumores originados nas populações ECC-I e ESI, mas apresentou marcação no tumor com origem nas células derivadas aderentes GI.

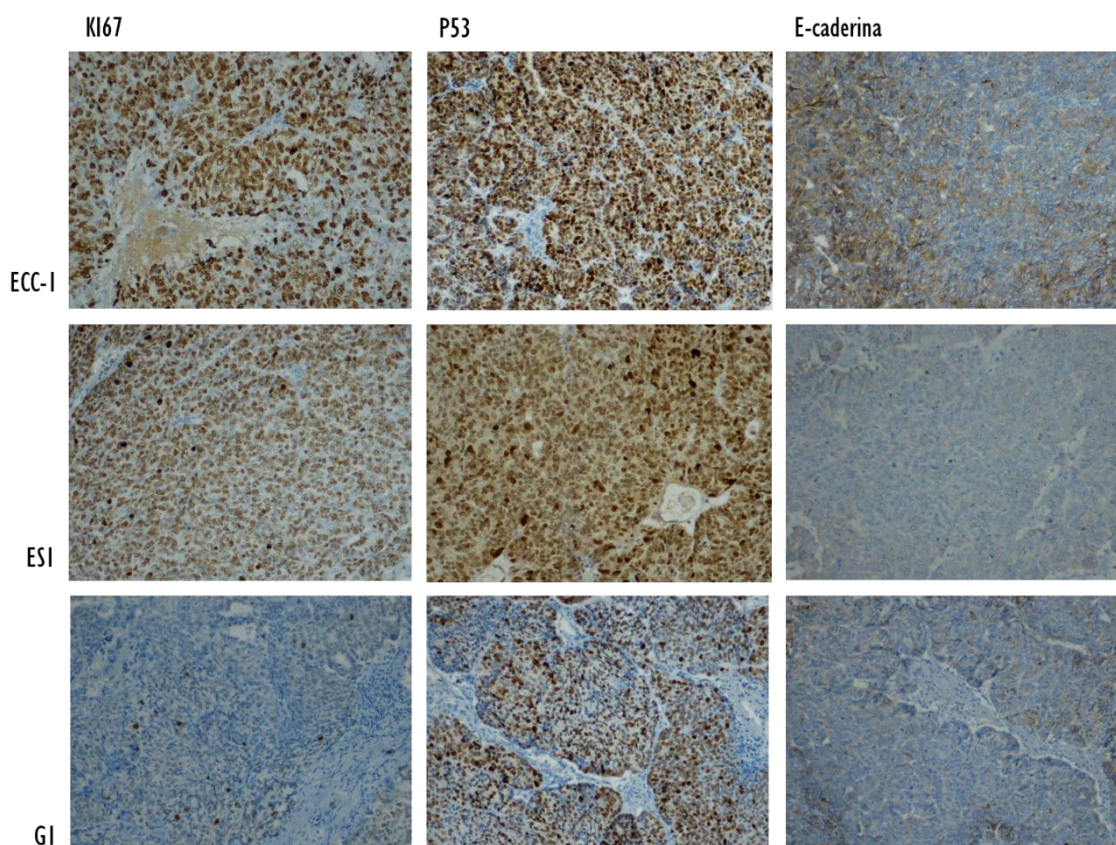


Figura 94: Imagens histológicas representativas da marcação imunohistoquímica de Ki67, de P53 e de E-caderina na metástase de cada grupo injetado com ECC-I, ESI e GI. A intensidade de marcação para Ki67 correspondeu a 4 em ECC-I e ESI e 2 em GI. A intensidade de marcação para P53 correspondeu a 4 em todos os casos. A marcação de E-caderina correspondeu a 0 para ECC-I e ESI e 1 para GI. Todas as imagens foram adquiridas numa ampliação total de 200x.



A Figura 94 representa a marcação da metástase para o Ki67, a P53 e a E-caderina. A marcação Ki67 nas células ECC-I e nas esferas ESI foi superior a 76% das células tumorais, enquanto nas células derivadas aderentes GI a marcação foi em 26% a 50% das células tumorais. A marcação de P53 observou-se em mais de 76% das células tumorais da metástase de todos os grupos. A E-caderina apresentou ausência de marcação em todas as metástases de todos os grupos.

A ALDH é um marcador de CSC cuja expressão nas esferas ESI foi superior às células da linha ECC-I e às células derivadas aderentes GI, conforme descrito no capítulo V. Com o intuito de avaliar a expressão deste marcador *in vivo* foram analisados os extratos de tumores com origem em cada uma das populações de células. A expressão de ALDH foi semelhante entre os tumores resultantes da inoculação da linha celular ECC-I ( $1,04 \pm 0,15$ ), das esferas ESI ( $1,13 \pm 0,09$ ) e das células derivadas aderentes GI ( $1,37 \pm 0,07$ ), como se observa na Figura 95.

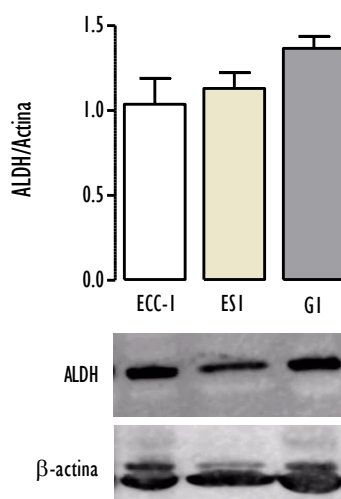


Figura 95: Expressão da ALDH no tumor com origem nas populações ECC-I, em ESI e em GI. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da ALDH e da actina normalizados à expressão dos tumores da linha celular ECC-I. Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos cinco amostras, não se verificando diferenças entre as populações estudadas. As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína ALDH e da actina para cada uma das condições experimentais.

A expressão de ALDH assim como a de  $\beta$ -catenina foram correlacionadas entre a metástase e o tumor para cada animal que apresentou metastização. Relativamente aos tumores obtidos a partir da linha celular ECC-I, representados na Figura 96, nos casos de metastização para a parede abdominal, observou-se apenas uma ligeira elevação de ALDH na metástase em relação ao tumor, com relação metástase/tumor de 1,27 e de 1,05. No implante pélvico, a expressão de ALDH foi superior na metástase em relação do tumor.

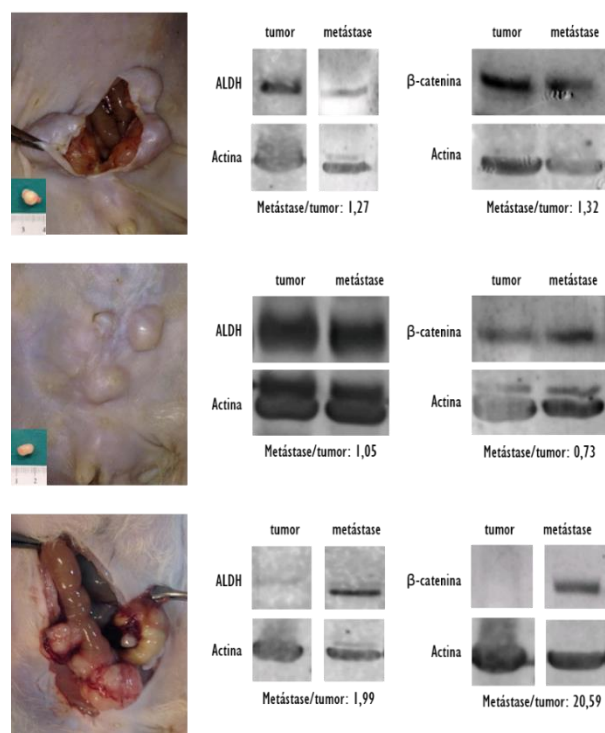


Figura 96: Imagens macroscópicas dos tumores, *immunoblots* e valores da relação metástase/tumor para a marcação da ALDH e da  $\beta$ -catenina no grupo injetado com células da linha ECC-1. Na primeira e na segunda linha estão descritos os resultados para as metástases da parede abdominal. Na terceira linha está representado o caso de implantes pélvicos. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da ALDH ou da  $\beta$ -catenina e normalizados à expressão no tumor do mesmo animal. As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão das proteínas ALDH,  $\beta$ -catenina e actina para cada experiência.

No implante pélvico, a expressão de ALDH foi superior na metástase em relação ao tumor, com relação metástase/tumor de 1,99. Em relação à  $\beta$ -catenina, a expressão aumentou na metástase num dos casos de invasão da parede abdominal, com relação metástase/tumor de 1,32 e noutro caso diminuiu na metástase, com relação metástase/tumor de 0,73. Relativamente ao implante pélvico, observou-se uma elevação acentuada de  $\beta$ -catenina em relação ao tumor, com uma relação metástase/tumor de 20,59.

Considerando os tumores obtidos a partir das esferas ES1, como representado na Figura 97, foram avaliadas duas amostras de metástase abdominal do mesmo animal e verificou-se uma elevação ligeira da expressão de ALDH nas metástases, com relações metástase/tumor de 1,22 e de 1,15. No animal com metástase mesentérica a expressão foi semelhante, com relação metástase/tumor de 1,07. A expressão de  $\beta$ -catenina foi semelhante entre o tumor e a metástase, com relações metástase/tumor de 0,92 e 1,07 para as amostras de metástase abdominal. A metástase mesentérica apresentou uma elevação acentuada da expressão  $\beta$ -catenina em comparação com o tumor, com uma relação metástase/tumor de 30,72.

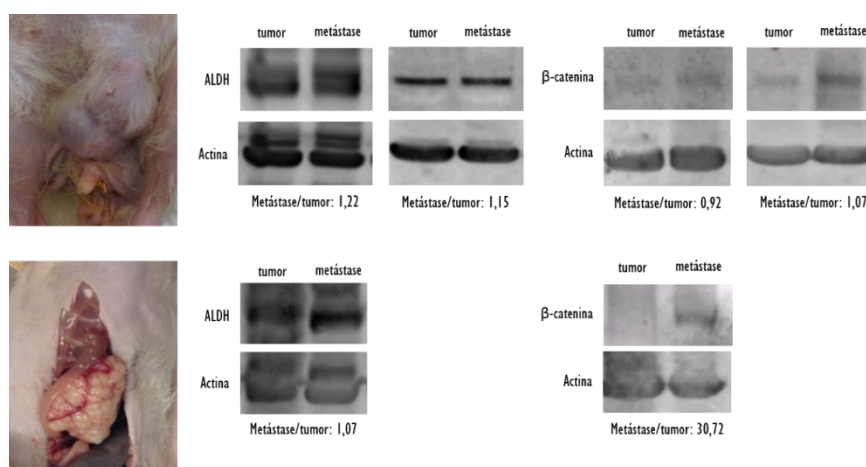


Figura 97: Imagens macroscópicas dos tumores, *immunoblots* e valores da relação metástase/tumor para a marcação da ALDH e da  $\beta$ -catenina no grupo injetado com esferas ESI. Na primeira linha estão descritos os resultados para duas amostras de metástase abdominal do mesmo animal. Na segunda linha está representado o resultado para a metástase mesentérica. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da ALDH ou da  $\beta$ -catenina e normalizados à expressão no tumor do mesmo animal. As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão das proteínas ALDH,  $\beta$ -catenina e da actina para cada experiência.

Para o grupo dos tumores das células derivadas aderentes GI apenas foi possível analisar um animal com metástase e com tumor, que se encontra representado na Figura 98.

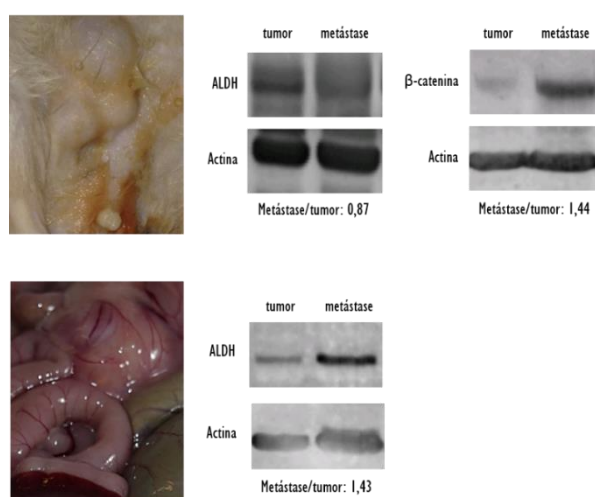


Figura 98: Imagens macroscópicas dos tumores, *immunoblots* e valores da relação metástase/tumor para a marcação da ALDH e da  $\beta$ -catenina no grupo injetado com células derivadas aderentes GI. Na primeira linha estão descritos os resultados para a amostra de metástase abdominal. Na segunda linha, para o mesmo animal, está representado o resultado para a metástase mesentérica. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da ALDH ou da  $\beta$ -catenina e normalizados à expressão no tumor do mesmo animal. As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão das proteínas ALDH,  $\beta$ -catenina e da actina para cada experiência.

Neste caso a análise foi realizada para uma metástase da parede abdominal e uma metástase mesentérica. A expressão de ALDH foi ligeiramente inferior na metástase da parede abdominal em relação ao tumor, com uma relação metástase/tumor de 0,87. Considerando a metástase mesentérica, a expressão na metástase foi superior ao tumor, com relação metástase/tumor de 1,43. Para a  $\beta$ -catenina, a expressão também aumentou na metástase comparando com o tumor, com uma relação metástase/tumor de 1,44 na metástase da parede abdominal.

## Discussão

A utilização de linhas celulares de cancro estáveis e imortalizadas permite avaliar de forma reprodutível diversos tipos de tumores. A maior desvantagem é que as linhas celulares não representam integralmente as propriedades biológicas e genéticas dos tumores primários. A utilização de células de tumores primários que cresceram *in vivo*, constituindo os modelos animais de cancro, ou a utilização de amostras de tecidos de doentes são outras alternativas para o estudo *in vivo* de tumores. Estes podem ser obtidos após inoculação de suspensões celulares ou de fragmentos de tumores ressecados, um processo conhecido por xenotransplante de tumor derivado de doente. A heterotransplantação de material humano, proveniente de linhas celulares ou de tumores primários, é realizada em animais imunodeprimidos como os ratinhos atímicos *nude*, que têm deficiência de células T, o que se traduz por falha da imunidade celular ou com os ratinhos SCID que têm défice de células B e de células T. Adicionalmente, os ratinhos SCID e os NOD apresentam deficiência de atividade de células dendríticas, de macrófagos e de células *natural killer* (Skidan & Steiniger, 2014).

Os modelos de experimentação animal mais utilizados em oncologia são modelos de xenotransplantação subcutânea que, apesar de poderem prever o comportamento *in vivo*, apresentam bastantes limitações. Provavelmente a mais importante é o microambiente distinto da sua localização original. Os modelos heterotópicos, particularmente os subcutâneos, devido ao reduzido fluxo sanguíneo, à medida que o tumor se vai desenvolvendo, ocorre a constituição de necrose central, ausência de infiltração tumoral, encapsulamento e a ausência de comportamento metastático (Doll *et al*, 2009; Cabrera *et al*, 2012). Com o intuito de aproximar os modelos animais à prática clínica, têm sido desenvolvidos modelos ortotópicos. Estes modelos integram elementos do microambiente necessários ao crescimento tumoral, nomeadamente o suprimento sanguíneo e a drenagem linfática (Skidan & Steiniger, 2014). As localizações descritas são diversas, na dependência do tipo de células tumorais, sendo as mais frequentes as do cólon, do pulmão, do pâncreas, da bexiga, do estômago e da mama, entre outros. Estes modelos permitem a avaliação do processo metastático, apesar de terem a desvantagem da dificuldade de monitorização, o que limita a avaliação da evolução da

doença (Cabrera *et al*, 2012). Recentemente tem sido referido que a suspensão de células não possui todo o potencial metastático do tumor original. Por isso surgiram modelos com implantes de tecido que mantêm a arquitetura tridimensional, a interação intercelular e a angiogênese do tumor, que serão aspetos importantes para o comportamento metastático (Doll *et al*, 2009).

No cancro do endométrio foram descritos modelos experimentais para o estudo dos aspetos moleculares e da carcinogénese. Um destes modelos é o modelo espontâneo de adenocarcinoma do endométrio em ratos, descrito em estirpes que apresentam elevada incidência de adenocarcinoma do endométrio mantida na sua vida natural, nomeadamente as estirpes Han:Wistar, Donryu, DA/Han e BDII/Han. Foram também descritos modelos em ratinhos que desenvolveram tumores pela administração de hormonas externas como o estradiol. Outra forma descrita foi a indução por carcinogénios químicos como N-metil-N-nitrosureia em ratinhos ICR (do inglês, *Institute for Cancer Research*). Os modelos transgênicos também estão descritos, sendo um dos exemplos o modelo com ratinhos heterozigotos para  $PTEN^{+/-}$ . Um outro modelo é o modelo de inoculação, em que o inoculado pode ser derivado diretamente de tumores ou podem ser células de cultura, constituindo modelos singênicos ou de xenotransplantação. Neste caso utiliza-se material humano em ratos ou em ratinhos atímicos ou SCID (Vollmer, 2003)

No modelo ortotópico desenvolvido no trabalho experimental que conduziu a esta tese foram injetadas no útero de ratos RNU células da linha celular de adenocarcinoma do endométrio humano ECC-1, assim como a população de esferas ES1 e as células derivadas aderentes GI no útero, tendo pois sido constituídos três grupos experimentais. A inoculação de células tumorais foi realizada por uma intervenção cirúrgica em que se laqueou o segmento inferior do útero de modo a impedir o refluxo da suspensão celular para a vagina e, deste modo, limitar a quantidade de células inoculadas. Não se procedeu à sutura do local de injeção de modo a não limitar qualquer via de disseminação, nomeadamente a transtubária. Outros autores descreveram modelos ortotópicos para o cancro do endométrio. Entre estes, refere-se o modelo de injeção no corno uterino que foi descrito em 2007, em ratinhos atímicos. Com este modelo, para além de ter sido avaliada a cinética de crescimento tumoral com diferentes concentrações de células provenientes de linhas celulares de cancro do endométrio permitiu apreciar o processo de disseminação deste cancro (Kamat *et al*, 2007a). Cabrera e colaboradores desenvolveram um outro modelo no qual utilizaram células tumorais HEC-1A transfectadas com luciferase que foram injetadas no útero ou por via transmiometrial ou por via vaginal. Neste modelo os autores consideraram a expulsão de uma pequena quantidade de líquido pela vagina como sinal de correta localização da injeção (Cabrera *et al*, 2012). O modelo de injeção transmiometrial descrito foi mais eficaz que o transvaginal para a obtenção de metastização e foi utilizado por outros autores (Pedrola *et al*, 2015). A linha celular VK2 também foi utilizada para o modelo ortotópico de injeção miometrial a 1 cm do colo uterino e os autores procederam à sutura do local da injeção. Este modelo permitiu avaliar a metastização de gânglios retroperitoneais e a influência do VEGF-C (Huang *et al*, 2013). Estão descritos modelos de metastização para-aórtica através de implantação ortotópica de suspensão celular

no corno uterino. Este modelo foi descrito para o cancro do endométrio e do ovário em ratinhos *Balb/c nu/nu* que após 8 semanas após a inoculação mostraram potencial de metastização diferente de acordo com a população inoculada (Oikawa *et al*, 2013). Noutro estudo com a linha celular HEC-1A transfectada com RUNX-1, foram obtidos xenotransplantes subcutâneos que posteriormente foram implantados na parede posterior do útero. Neste modelo, o tumor foi integrado na componente miometrial e foi utilizado para estudo da angiogénese, da invasão miometrial e da capacidade de metastização (Doll *et al*, 2009). Noutro modelo com células derivadas de culturas primárias, foram obtidos tumores por xenotransplantação subcutânea e posteriormente um fragmento do tumor foi inoculado ortotopicamente no corno uterino (Schrauwen *et al*, 2015). Este modelo foi ainda reportado por outros autores com o intuito de avaliar o potencial metastático, a arquitetura tumoral tridimensional, o contacto intercelular e a angiogénese (Pillozzi *et al*, 2013). Neste contexto, Cabrera e colaboradores demonstraram que o padrão histológico endometriode se manteve e pode representar uma forma de estudo da doença localizada e avançada (Cabrera *et al*, 2012).

O tratamento para o cancro do endométrio avançado e recorrente é limitado. Por isso é essencial compreender os mecanismos de iniciação, de desenvolvimento e de progressão do cancro do endométrio, numa fase pré-neoplásica ou inicial da doença oncológica (Schrauwen *et al*, 2015). Nesta perspetiva surge a caracterização das CSC, para o qual se deu um contributo no capítulo IV. O modelo ortotópico pretendeu detalhar o comportamento *in vivo* das células com propriedades de CSC. Estão descritos modelos animais com utilização de CSC que incluem a administração heterotópica, subcutânea, intraperitoneal ou intramuscular e a administração ortotópica em hospedeiro singénico ou xenogénico. Os modelos animais com CSC, para além de serem maioritariamente heterotópicos, têm sido descritos sobretudo com o objetivo de avaliar o potencial tumorigénico da população que expressa certos marcadores específicos. Apesar do predomínio de modelos heterotópicos, a transplantação ortotópica foi já reportada para avaliar propriedades de CSC em diversos tumores. Nos modelos ortotópicos descritos para CSC de carcinoma espinhocelular da cabeça e do pescoço, esta população teve capacidade tumorigénicas em todos os animais do estudo (Lim *et al*, 2014). Noutro estudo com este modelo os autores reportaram uma maior capacidade de metastização nas células com propriedades de CSC (Masood *et al*, 2013). No cancro colorretal foi utilizado um modelo de injeção intrarretal e as células CD133<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup> apresentaram maior capacidade de formação de tumor e de metastização que as células da população sem esta expressão (Margolin *et al*, 2015). Também foram descritos modelos ortotópicos no cancro da mama que permitiram avaliar o comportamento diferencial de CSC assim como a correlação com a resposta à terapêutica (Samineni *et al*, 2011; Yin *et al*, 2014). A população lateral de uma linha celular de cancro do pulmão também apresentou maior capacidade tumorigénicas quando injetada no pulmão do que a população maioritária (Singh *et al*, 2012).

No nosso trabalho experimental verificou-se haver formação de tumor e que esta foi mais frequente no grupo de animais injetado com a população de derivadas aderente GI (54%) enquanto a metastização foi

superior no grupo injetado com as esferas ESI (67%). Assim, em comparação com a linha celular parental, a população de derivadas aderentes mostrou maior capacidade tumorigénicas enquanto a população de esferas mostrou maior capacidade metastática. Outros trabalhos que utilizaram a populações de esferas constataram tumorigenicidade superior em modelos ortotópicos. Neste contexto, esferas de cancro da tiroide ALDH<sup>high</sup> originaram tumores em modelo ortotópico mais invasivos e que comprimiram a traqueia e o esófago (Todaro *et al*, 2010). Outro estudo, igualmente em modelo ortotópico, mostrou que a população CD133<sup>+</sup> de rabdoesferas teve capacidade de formar tumor após administração de uma concentração celular inferior à concentração utilizada com a linha parental aderente (Walter *et al*, 2011). Também as esferas de neuroblastoma foram mais tumorigénicas em ambiente adrenal do que a população total da linha celular NBI (Coulon *et al*, 2011). Alguns autores sugeriram que a iniciação e a manutenção do tumor no local primário assim como a disseminação da doença à distância dependem da interação das CSC com um nicho em particular (Skidan & Steiniger, 2014). Os nossos resultados sugerem que no modelo ortotópico de cancro do endométrio estas interações se mantêm na população de derivadas aderentes, a qual possuirá células mais diferenciadas. Poderão igualmente existir sinergias entre as diversas populações celulares presentes no tumor, as quais, não só foram capazes de manter o seu crescimento como contribuirão para a manutenção das CSC e das suas propriedades.

A propagação das células tumorais agressivas presentes na lesão primária são o evento fundamental para o processo de metastização. De acordo com trabalhos já publicados, no cancro do endométrio os fatores de risco que aumentam esta probabilidade incluem a infiltração miometrial, o envolvimento ganglionar e a invasão do espaço linfvascular, entre outros (Alonso-Alconada *et al*, 2014). Os locais de recorrência mais comuns do cancro do endométrio incluem os gânglios pélvicos e os para-aórticos, a vagina, os ovários, as trompas, o peritoneu e os pulmões. Os locais mais atípicos incluem os órgãos intra-abdominais, sendo o fígado o mais frequente, o osso, o cérebro, a parede abdominal e o músculo. A carcinomatose peritoneal, traduz uma recorrência frequente, estando descritas 28% de recorrências no peritoneu, sob a forma de nódulos peritoneais ou de implantes na serosa, os quais habitualmente não causam compressão intestinal (Kurra *et al*, 2013). Os resultados do nosso estudo experimental mostraram que a metastização teve particular incidência na parede abdominal, o que provavelmente se justifica pela necessidade de laparotomia prévia que, por sua vez, favoreceu a implantação de células tumorais que poderão ter extravasado da injeção intrauterina. A metastização ovárica e peritoneal foram outras localizações observadas no nosso estudo não se tendo verificado em vísceras intra-abdominais nem nos pulmões. Relativamente à população de esferas ESI, observou-se a presença de metastização no diafragma enquanto o envolvimento peritoneal se verificou mais à distância, como no mesentério. Estes dados apontam para a importância do fenótipo das esferas no processo de invasão e de metastização. Esta população de esferas foi já caracterizada quanto a marcadores associados a CSC como o CD133, o CD44 e a ALDH. Os dados publicados têm apontado a associação das CSC com o processo de invasão e de metastização enquanto a expressão no tumor dos

marcadores referidos foi associada com a metastização ganglionar no cancro gástrico. No cancro colorretal, o fenótipo CD133<sup>+</sup> não foi exclusivo para a presença de invasão e de metastização. Alguns autores propõem que a migração das CSC induzida pela EMT pode determinar a sua disseminação e originar colónias metastáticas (Li & Li, 2014). De facto, após a tumorigénese primária, a EMT permite que uma massa do tumor primário se destaque, invada a matriz extracelular, penetre na circulação, se dissemine e extravase com colonização e formação de micrometástases que, posteriormente, crescem e originam os tumores secundários (Liao *et al*, 2014). Deste modo, a EMT é considerada um evento essencial nos passos iniciais da metastização. Diversos fatores transcripcionais foram associados à EMT e já descritos, como o SNAIL, o SLUG, o ZEB1 e o BMI1. Outros fatores são mediadores como o HGF, o EGF, o TGF- $\beta$  e as vias de sinalização associadas como a do WNT/ $\beta$ -catenina, a NOTCH e a HEDGEHOG. Alguns marcadores associados com as CSC predisõem à metastização. No cancro colorretal o CD44v6 foi associado a migração e a metastização, enquanto no cancro da mama as células CD44<sup>+</sup>, com origem tanto nos tumores primários como nas metástases pulmonares, apresentaram capacidade metastática em xenotransplante e no cancro do pâncreas a população CD133<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup> foi essencial para a metastização do tumor (Liao *et al*, 2014). No cancro do endométrio a população lateral apresentou maiores níveis de fibronectina e de expressão de *SPARC*, um gene associado a EMT responsável pelo aumento da atividade de migração. Em tumores com origem na população lateral a expressão de *SPARC* foi superior nas células estromal-*like* e em tumores endometrioides pouco diferenciados (Yusuf *et al*, 2014). No nosso estudo experimental, na população de esferas ESI, a expressão de ALDH e de CD44, associado com a ativação da via WNT/ $\beta$ -catenina, correlacionou-se, no modelo ortotópico, não só com o maior potencial de metastização como também com a metastização para locais mais distantes do tumor primitivo.

Uma das desvantagens dos modelos ortotópicos em relação aos heterotópicos é a maior dificuldade de monitorização. Neste sentido estão descritos métodos de imagem que permitem avaliar a tumorigénese e o seguimento do crescimento tumoral. Uma das modalidades imagiológicas já utilizadas para avaliação do modelo ortotópico do endométrio é a bioluminescência. Nesta metodologia a linha celular HEC-1A foi transfectada com luciferase o que permitiu monitorizar o crescimento do tumor primário e a metastização (Cabrera *et al*, 2012). Noutro estudo a bioluminescência realizada aos 2 e aos 14 dias não só o seguimento como detetou a presença de tumor no corno uterino, localização que foi confirmada pelo estudo histológico (Kamat *et al*, 2007a). No nosso estudo experimental o desenvolvimento do tumor foi avaliado por imagem molecular com recurso a estudos de medicina nuclear, utilizando células ECC-1 marcadas com <sup>99m</sup>Tc-MIBI. O <sup>99m</sup>Tc-MIBI é um traçador lipofílico e catiónico que foi originalmente introduzido na medicina nuclear para avaliar a perfusão miocárdica. Uma vez que as vias de eliminação do radiofármaco são as vias gastrointestinal e urinária, a visualização de uma massa uterina pode ser difícil. Esta pode ter sido a razão de os tumores com origem nas células ECC-1 apenas terem sido identificados nos primeiros tempos após a administração, antes de se verificar acumulação nos locais associados à excreção. Este radiofármaco é



captado por difusão passiva para o citoplasma, acumula-se na mitocôndria e o transporte celular é afetado pela apoptose, pela proliferação celular e pela angiogênese, sendo por estas razões, também utilizado como marcador do metabolismo no tumor. Adicionalmente, devido ao  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI ser um substrato de vários transportadores ABC como a glicoproteína P, o MRP1, o MRP2 e o BCRP, a sua retenção no tecido é muito influenciada pela expressão destas proteínas membranares (Dizdarevic & Peters, 2011). A expressão deste tipo de proteínas de extrusão, conforme descrito anteriormente, também está associada a resistência à terapêutica com citostáticos nas CSC. Na população de esferas ESI, observou-se maior resistência ao paclitaxel e à doxorrubicina, que são fármacos que utilizam este tipo de transportadores. Assim, o  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI pode ter sido extrusado das células da população de esferas ESI e da população de derivadas aderentes GI, as quais apresentaram maior resistência aos citostáticos que a linha celular parental ECC-1.

Nos tumores dos animais injetados com células da linha ECC-1, com esferas ESI e com células derivadas aderentes GI, o índice de proliferação associado à expressão de Ki67 foi elevado. Quanto à expressão deste marcador nas metástases, estas mantiveram o mesmo perfil do tumor, com exceção da metástase com origem no tumor da população GI no qual a percentagem de marcação foi menor. O Ki67 é o termo para uma proteína que foi originalmente identificada como antígeno nuclear pelo anticorpo monoclonal de rato designado Ki67. A função do Ki67 é desconhecida, porém a expressão varia ao longo do ciclo celular, estando ausente na fase G0, apresenta expressão baixa durante a fase G1 e o início da fase S inicial e aumenta progressivamente apresentando expressão máxima durante a mitose. Assim, o Ki67 está ausente em células quiescentes e está universalmente expresso nas células em proliferação. Deste modo, esta proteína foi estabelecida como um marcador robusto de proliferação celular (Pathmanathan & Balleine, 2013). O Ki67 associou-se com prognóstico desfavorável a cancro do endométrio. Este índice apresentou um valor médio mais elevado em carcinomas pouco diferenciados, com invasão da metade externa do miométrio e em estágio II, apresentando uma correlação significativa com o grau de diferenciação e com o estágio da lesão (Stoian *et al*, 2011). Noutro estudo com tumores do endométrio, a expressão de Ki67 associou-se com o número do estágio e com o grau histológico (Zhu *et al*, 2009). O Ki67 correlacionou-se com a expressão de recetores de estrogénios  $\alpha$ , não apresentando correlação com a sobrevivência das doentes (Chakravarty *et al*, 2010). As variações microanatômicas dos carcinomas do endométrio tipo endometrioides têm dado ênfase às áreas glandulares compostas por microquistos, alongadas e fragmentadas (MELF, do inglês *microcystic, elongated and fragmented*). O Ki67 teve uma expressão negativa nestas áreas mas, em áreas glandulares periféricas a expressão de Ki67 foi elevada. Esta atividade proliferativa mínima, em áreas que proporcionam invasão, pode ser justificada por uma relação inversa entre a divisão celular e a invasão local durante o processo de EMT e pode traduzir uma alteração reversível no ciclo celular, durante a progressão tumoral (Stewart *et al*, 2010). Os resultados do nosso estudo poderão ser justificados pela ativação do processo EMT na progressão tumoral, já descrito em tumores endometriais e associado a CSC o que, transitoriamente poderá ter diminuído a proliferação celular.

Quanto à expressão da P53, nos tumores e nas metástases provenientes da linha celular ECC-1, da população de esferas ESI e das derivadas aderentes GI, a expressão nuclear foi intensa e difusa em todos os casos estudados. A sobre-expressão P53 em tumores do endométrio está mais associada a tumores não endometrioides e correlaciona-se com a diminuição da sobrevivência (Werner & Salvesen, 2014). A expressão de P53, detetada por imunohistoquímica, é habitualmente mais intensa na presença do produto do gene mutado que é mais estável que o produto do gene selvagem e, por isso, deteta-se facilmente por esta técnica. A positividade para a P53 reflete um defeito na maquinaria genética da célula pelo que, consequentemente, é um fator de mau prognóstico (González-Rodilla *et al*, 2011). Noutro estudo com a linha celular de cancro do endométrio HEC-1A, em modelo ortotópico, a marcação positiva para a P53 e para o Ki67 e negativa para recetores hormonais foi associada a tumores indiferenciados e mais agressivos, semelhantes ao do tipo 2. Também não se verificou diferenças nesta marcação entre o tumor e a metástase (Cabrera *et al*, 2012). Outro trabalho experimental com modelo ortotópico e a com a mesma linha celular também demonstrou tumores, com elevados níveis de Ki67 e de P53, para além de baixos níveis de recetores hormonais (Doll *et al*, 2009).

A perda de E-caderina foi observada nas amostras de tumor e nas metástases de tumores com origem nas células parentais ECC-1 e nas esferas ESI. No entanto, no tumor com origem nas células derivadas aderentes GI verificou-se expressão de E-caderina mas nas metástases observou-se perda desta expressão. Conforme já descrito, a EMT facilita o processo de invasão e de metastização que é mediado pela perda de E-caderina. A E-caderina é responsável por adesão intercelular e a sua degradação é uma sinalização para a indução de EMT (Masood *et al*, 2013). Este processo envolve proteínas como as caderinas, a catenina, a vimentina e as metaloproteinases da matriz, entre outras. A redução da expressão de E-caderina relaciona-se com um crescimento mais agressivo e é um fator de prognóstico no cancro do endométrio. Algumas mutações foram associadas à subregulação de E-caderina como do gene da caderina epitelial (*CDH1*), do PTEN, do *KRAS* e do *TP53* e também mecanismos epigenéticos como a metilação (Zhou *et al*, 2014b). No cancro do endométrio a sobre-expressão de E-caderina foi associada a melhor prognóstico (González-Rodilla *et al*, 2013). Nas lesões MELF observa-se uma redução da expressão de E-caderina comparando com as porções convencionais. Por outro lado, conforme já referido, esta área apresenta baixa atividade mitótica, associada com a EMT (Zaino, 2014). Num modelo ortotópico de cancro do endométrio, a subregulação da E-caderina foi associada a linhas celulares com elevada capacidade metastática, assim como a expressão da  $\beta$ -catenina, uma proteína colocalizada (Masood *et al*, 2013). No estudo de Cabrera e colaboradores a E-caderina foi expressa no tumor e em cerca de 50% das células das metástases (Cabrera *et al*, 2012). No nosso trabalho experimental, a expressão de E-caderina no tumor com origem nas células derivadas aderentes GI pode traduzir uma suspensão transitória da EMT no processo de progressão tumoral que voltou a estar ativa nas respetivas metástases, conforme se infere pela perda de E-caderina.

A expressão de ALDH foi avaliada nos tumores ortotópicos obtidos por injeção das 3 populações do

estudo e não se verificaram diferenças. A expressão de ALDH foi superior nas esferas ESI em relação às células da linha parental ECC-I e às células derivadas aderentes GI, conforme descrito no capítulo IV. Esta expressão de ALDH foi já descrita em tumores ortotópicos de carcinoma espinhocelular da cabeça e do pescoço obtidos por injeção de CSC, como foi descrita a influência de vias de regulação, nomeadamente da via C-MET-HGF (Lim *et al*, 2014). Assim, a expressão no tumor pode ser influenciada por vias de regulação *in vivo*. As células ALDH positivas de carcinoma da tiroide recapitularam o fenótipo característico dos tumores de origem e os xenotransplantes primários revelaram expressão de ALDH semelhante à dos tumores de origem. Os tumores derivados das esferas da tiroide mantêm as mesmas características dos carcinomas da tiroide (Todaro *et al*, 2010). Estes dados sugerem que a população com propriedades de CSC mantém uma heterogeneidade fenotípica característica *in vivo*. Em xenotransplantes de linhas celulares da mama a expressão de ALDH e de CD44 foi aleatória em todo o tumor e não apresentou nenhuma localização específica no tumor ou na interface com o estroma (Liu *et al*, 2014b). No microambiente uterino, a população das esferas poderá ser responsável pela recapitulação fenotípica do tumor *in vivo*, no entanto os mecanismos moleculares e as suas vias de regulação estão por esclarecer.

No nosso estudo, os animais injetados com células da linha celular ECC-I revelaram um aumento de ALDH nos implantes pélvicos em relação ao tumor. No entanto, a diferença nas metástases da parede abdominal foi menos notória. Por outro lado, a  $\beta$ -catenina apresentou uma elevação de expressão na metástase pélvica. Estes dados sugerem a presença de marcadores de CSC e de marcadores associados a EMT na metastização. Considerando a população de esferas, a expressão de ALDH foi semelhante no tumor e nas suas metástases. Na metástase abdominal a  $\beta$ -catenina foi semelhante, no entanto em relação à metástase mesentérica denota-se uma sobre-expressão em relação ao tumor, o que mais uma vez sugere o envolvimento da EMT, também já descrito por outros autores no processo de metastização (Mirantes *et al*, 2013). Nos animais injetados com células derivadas aderentes GI não se observou uma variação consistente de ALDH na metastização, mas observou-se uma sobre-expressão na metástase mesentérica em relação à da parede abdominal. Estes dados sugerem o provável envolvimento de vias de regulação distintas na disseminação peritoneal e na metastização da parede abdominal. A expressão de  $\beta$ -catenina na metástase em relação ao tumor com origem nas células derivadas aderentes GI também sugere a ativação desta via no processo de metastização. A expressão de marcadores da EMT também foi descrita em xenotransplantes de células com marcadores de CSC como a ALDH (Yin *et al*, 2014). A sobre-expressão de ALDH foi descrita em xenotransplantes de carcinoma espinhocelular da cabeça e do pescoço e foi semelhante entre a expressão no tumor e a expressão nos gânglios linfáticos (Masood *et al*, 2013). A análise de tumores e de metástases de ratos injetados ortotopicamente com esferas ALDH<sup>+</sup> originou tumores e metástases que mostraram enriquecimento em células tumorigénicas ALDH<sup>+</sup> maior nas metástases pulmonares em relação ao tumor (Todaro *et al*, 2010). Assim, não parece definir-se um perfil consistente de expressão dos marcadores de CSC ALDH e de  $\beta$ -catenina no tumor e na metástase de acordo com o tipo de células inoculado. Sugere-se a

provável integração de diversos processos de regulação que influenciam *in vivo* o comportamento de diferenciação celular.

## PARTE III – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS



A caracterização das células tumorais do cancro do endométrio, particularmente as células com propriedades de CSC *in vitro*, foi o principal objetivo conseguido com este trabalho, identificada também como uma população com maior resistência à terapêutica e com um comportamento biológico *in vivo* que favorece a metastização.

Neste estudo experimental a linha celular ECC-I constituiu a população parental para o isolamento das populações com propriedades de CSC *in vitro*, que apresentou capacidade de formação de esferas e que por sua vez, tiveram capacidade de desenvolver populações aderentes. Este potencial evidencia a capacidade de autorrenovação e de diferenciação destas populações. As esferas apresentaram maior marcação de CD133 e CD44, ALDH e tumorigenicidade *in vivo*, características associadas às CSC.

As populações de esferas apresentaram um fenótipo mais indiferenciado, patenteado por uma menor expressão de recetores de estrogénios  $\alpha$  característico dos tumores endometrioides bem diferenciados. Esta característica é ainda acentuada pela diminuição da P53, o que sugere perda da regulação desta proteína no processo de iniciação do crescimento tumoral. Por outro lado, a população de esferas parece apresentar sobre-regulação de vias responsáveis por propriedades estaminais como a ativação da via WNT/ $\beta$ -catenina, associada à aquisição do fenótipo EMT que determina a invasão e a metastização tumoral.

O estudo do metabolismo da glicose revelou um aumento da captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG, uma menor produção de lactato e maior acoplamento da via glicolítica com o ciclo de Krebs na população de esferas, sugerindo um estado mais oxidado. Estas populações de CSC parecem apresentar uma preferência por um metabolismo com completa oxidação que poderá refletir uma replicação celular menos intensa, em detrimento de um metabolismo fermentativo que ocorre em fases de proliferação.

A eletroforese bidimensional permitiu identificar a expressão diferencial de *spots* na população de esferas e na população de derivadas aderentes em comparação com a linha celular parental ECC-I. Nas esferas verificou-se um maior número de *spots* sobre-expressos, representando um total de 52 casos. Estes dados sugerem a presença de um perfil proteico distinto na população de esferas, que pode representar a ativação de vias moleculares particulares e a identificação de eventuais biomarcadores.

As propriedades estaminais das populações isoladas foram ainda corroboradas pela resposta à terapêutica. A população de esferas apresentou maior resistência à doxorrubicina e ao paclitaxel e este último citostático esteve associado a maior fator de sobrevivência. A resistência à apoptose pode constituir um mecanismo de

resposta, no entanto sem ativação da P53, por provável mutação, e independente de caspases. A genotoxicidade após o tratamento com paclitaxel foi inferior na população de esferas, enquanto os resultados com a carboplatina sugerem a existência de outros mecanismos que não fragmentam o DNA.

Ainda no que respeita à sensibilidade à irradiação, as populações derivadas aderentes apresentaram maior sobrevivência a doses mais elevadas de radiação, o que pode refletir um papel sinérgico das células progenitoras e das células diferenciadas no estabelecimento de células radorresistentes. Também neste tipo de tratamento a inibição da apoptose e menor fragmentação de DNA serão mecanismos de radorresistência associados com as CSC do endométrio.

O modelo ortotópico revelou um potencial de metastização superior nas populações de esferas, afirmando a intervenção das CSC neste processo. A expressão do marcador de CSC ALDH não foi distinta de acordo com a população celular que originou o tumor e, deste modo, no processo de tumorigênese as células estaminais parecem adquirir um fenótipo de células tumorais especializadas. A ativação da via WNT/ $\beta$ -catenina, com maior expressão nas esferas, constituirá uma regulação fundamental no processo de metastização.

Este estudo experimental identificou e caracterizou uma população celular com propriedades particulares no contexto da iniciação e da progressão tumoral. A otimização de diversas plataformas, no futuro, poderá permitir a continuação da investigação da patologia endometrial.

O próximo desafio constituirá a aplicação destas metodologias ao estudo de células de tumores primários, particularmente na identificação dos *spots* sobre-expressos na eletroforese bidimensional e posterior identificação no soro das doentes. Esta caracterização pode translacionar-se para a prática clínica na identificação de biomarcadores que possam auxiliar o diagnóstico precoce, a resposta à terapêutica e o seguimento das doentes.

Os estudos de citotoxicidade poderiam constituir uma estratificação de uma resposta à terapêutica individualizada que permitiriam ajustar o tipo de tratamento para cada tumor. Conforme foi esclarecido, a resposta varia de acordo com as populações celulares que constituem o tumor. Deste modo, poder-se-á contribuir para a implementação da medicina personalizada.

O contributo da continuação desta investigação básica pode ainda possibilitar o desenvolvimento de outras terapêuticas. O conhecimento das vias metabólicas e dos marcadores moleculares característicos poderiam suportar a implementação de tratamento dirigido a alvos moleculares expressos de forma diferencial nas células tumorais do cancro do endométrio, particularmente nas células com propriedades de CSC.



## PARTE IV — REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Aapro MS, van Wijk FH, Bolis G, Chevallier B, van der Burg MEL, Poveda A, de Oliveira CF, Tumolo S, Scotto di Palumbo V, Piccart M, Franchi M, Zanaboni F, Lacave AJ, Fontanelli R, Favalli G, Zola P, Guastalla JP, Rosso R, Marth C, Nooij M, Presti M, Scarabelli C, Splinter TAW, Ploch E, Beex LVA, ten Bokkel Huinink W, Forni M, Melpignano M, Blake P, Kerbrat P, Mendiola C, Cervantes A, Goupil A, Harper PG, Madronal C, Namer M, Scarfone G, Stoot JEGM, Teodorovic I, Coens C, Vergote I, Vermorken JB (2003) Doxorubicin versus doxorubicin and cisplatin in endometrial carcinoma: Definitive results of a randomised study (55872) by the EORTC Gynaecological Cancer Group. *Ann Oncol* **14**: 441–448, doi:10.1093/annonc/mdg112.

Abu-Rustum NR, Gomez JD, Alektiar KM, Soslow RA, Hensley ML, Leitao MM, Gardner GJ, Sonoda Y, Chi DS, Barakat RR (2009a) The incidence of isolated paraaortic nodal metastasis in surgically staged endometrial cancer patients with negative pelvic lymph nodes. *Gynecol Oncol* **115**: 236–238, doi:10.1016/j.ygyno.2009.07.016.

Abu-Rustum NR, Khoury-Collado F, Pandit-Taskar N, Soslow RA, Dao F, Sonoda Y, Levine DA, Brown CL, Chi DS, Barakat RR, Gemignani ML (2009b) Sentinel lymph node mapping for grade I endometrial cancer: Is it the answer to the surgical staging dilemma? *Gynecol Oncol* **113**: 163–169, doi:10.1016/j.ygyno.2009.01.003.

ACOG practice bulletin (2005) ACOG practice bulletin, clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists, number 65, August 2005: management of endometrial cancer. *Obstet Gynecol* **106**: 413–425, doi:10.1062/2/413 [pii].

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3983–3988, doi:10.1073/pnas.0530291100.

Ali AT (2014) Reproductive factors and the risk of endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* **24**: 384–393, doi:10.1097/IGC.0000000000000075.

Allegra A, Alonci A, Penna G, Innao V, Gerace D, Rotondo F, Musolino C (2014) The cancer stem cell hypothesis: a guide to potential molecular targets. *Cancer Invest* **32**: 470–495, doi:10.3109/07357907.2014.958231.

Alonso-Alconada L, Muinelo-Romay L, Madisoo K, Diaz-Lopez A, Krakstad C, Trovik J, Wik E, Hapangama D, Coenegrachts L, Cano A, Gil-Moreno A, Chiva L, Cueva J, Vieito M, Ortega E, Mariscal J, Colas E, Castellvi J, Cusido M, Dolcet X, Nijman HW, Bosse T, Green JA, Romano A, Reventos J, Lopez-Lopez R, Salvesen HB, Amant F, Matias-Guiu X, Moreno-Bueno G, Abal M, ENITEC Consortium (2014) Molecular profiling of circulating tumor cells links plasticity to the metastatic process in endometrial cancer. *Mol Cancer* **13**: 223, doi:10.1186/1476-4598-13-223.

An Y, Ongkeko WM (2009) ABCG2: the key to chemoresistance in cancer stem cells? *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **5**: 1529–1542, doi:10.1517/17425250903228834.

Angeloni V, Tiberio P, Appierto V, Daidone MG (2014) Implications of stemness-related signaling pathways in breast cancer response to therapy. *Semin Cancer Biol* **31**: 43–51, doi:10.1016/j.semcancer.2014.08.004.

Annovazzi L, Caldera V, Mellai M, Riganti C, Battaglia L, Chirio D, Melcarne A, Schiffer D (2015) The DNA damage/repair cascade in glioblastoma cell lines after chemotherapeutic agent treatment. *Int J Oncol* **2299**–2308, doi:10.3892/ijo.2015.2963.

Apostolou P, Toloudi M, Kourtidou E, Mimikakou G, Vlachou I, Chatziioannou M, Papatotiriou I (2014) Use of the comet assay technique for quick and reliable prediction of in vitro response to chemotherapeutics in breast and colon cancer. *J Biol Res (Thessalonikē, Greece)* **21**: 14, doi:10.1186/2241-5793-21-14.

Arora V, Quinn M a. (2012) Endometrial cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **26**: 311–324, doi:10.1016/j.bpobgyn.2011.12.007.

Baak JP, Mutter GL, Robboy S, Van Diest PJ, Uytendaele AM, Ørbo A, Palazzo J, Fiane B, Løvslett K, Burger C, Voorhorst F, Verheijen RH (2005) The molecular genetics and morphometry-based endometrial intraepithelial neoplasia classification system predicts disease progression in endometrial hyperplasia more accurately than the 1994 world health organization classification system. *Cancer* **103**: 2304–2312, doi:10.1002/cncr.21058.

Baldassarre G, Belletti B, Battista S, Nicoloso MS, Pentimalli F, Fedele M, Croce CM, Fusco A (2005) HMGAI protein expression

sensitizes cells to cisplatin-induced cell death. *Oncogene* **24**: 6809–6819, doi:10.1038/sj.onc.1208831.

Ballard KS, Hornesley HD, Hodson C, Present C a., Rutledge J, Hallquist A, Perree M (2010) Endometrial carcinoma in vitro chemosensitivity testing of single and combination chemotherapy regimens using the novel microculture kinetic apoptosis assay: Implications for endometrial cancer treatment. *J Gynecol Oncol* **21**: 45–49, doi:10.3802/jgo.2010.21.1.45.

Ballester M, Dubernard G, Lécuru F, Heitz D, Mathevet P, Marret H, Querleu D, Golfier F, Leblanc E, Rouzier R, Daraï E (2011) Detection rate and diagnostic accuracy of sentinel-node biopsy in early stage endometrial cancer: A prospective multicentre study (SENTI-ENDO). *Lancet Oncol* **12**: 469–476, doi:10.1016/S1470-2045(11)70070-5.

Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB, Shi Q, McLendon RE, Bigner DD, Rich JN (2006) Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* **66**: 7843–7848, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1010.

Barlin JN, Puri I, Bristow RE (2010) Cytoreductive surgery for advanced or recurrent endometrial cancer: A meta-analysis. *Gynecol Oncol* **118**: 14–18, doi:10.1016/j.ygyno.2010.04.005.

Barton DPJ, Naik R, Herod J (2009) Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC Trial) A Randomized Study. *Int J Gynecol Cancer* **19**: 1465, doi:10.1111/IGC.0b013e3181b89f95.

Belka C, Jendrossek V, Pruschy M, Vink S, Verheij M, Budach W (2004) Apoptosis-modulating agents in combination with radiotherapy-current status and outlook. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**: 542–554, doi:10.1016/j.ijrobp.2003.09.067.

Bensingher SJ, Christofk HR (2012) New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. *Semin Cell Dev Biol* **23**: 352–361, doi:10.1016/j.semcdb.2012.02.003.

Berek J (2007) Berek & Novak's Gynecology (philadelphia).

Berger C, Qian Y, Chen X (2013) The p53-Estrogen Receptor Loop in Cancer. *Curr Mol Med* **13**: 1229–1240, doi:10.2174/15665240113139990065.

Binotto G, Trentin L, Semenzato G (2003) Ifosfamide and cyclophosphamide: Effects on immunosurveillance. In *Oncology*, pp. 17–20.

Bjørge T, Engeland A, Tretli S, Weiderpass E (2007) Body size in relation to cancer of the uterine corpus in 1 million Norwegian women. *Int J Cancer* **120**: 378–383, doi:10.1002/ijc.22260.

Blumenthal RD, Goldenberg DM (2007) Methods and goals for the use of in vitro and in vivo chemosensitivity testing. *Mol Biotechnol* **35**: 185–197, doi:10.1007/s12033-007-9020-9.

Boiko AD, Razorenova O V, van de Rijn M, Swetter SM, Johnson DL, Ly DP, Butler PD, Yang GP, Joshua B, Kaplan MJ, Longaker MT, Weissman IL (2010) Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* **466**: 133–137, doi:10.1038/nature09759.

Bokhman J V (1983) Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* **15**: 10–17.

Bonnet D, Dick JE (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**: 730–737, doi:10.1038/nm0797-730.

Bortolomai I, Canevari S, Facetti I, De Cecco L, Castellano G, Zacchetti A, Alison MR, Miotti S (2010) Tumor initiating cells: Development and critical characterization of a model derived from the A431 carcinoma cell line forming spheres in suspension. *Cell Cycle* **9**: 1194–1206, doi:10.4161/cc.9.6.11108.

Bristow RE, Zerbe MJ, Rosenshein NB, Grumbine FC, Montz FJ (2000) Stage IVB endometrial carcinoma: the role of cytoreductive surgery and determinants of survival. *Gynecol Oncol* **78**: 85–91, doi:10.1006/gyno.2000.5843.

Brown MF, Leibowitz BJ, Chen D, He K, Zou F, Sobol RW, Beer-Stolz D, Zhang L, Yu J (2015) Loss of Caspase-3 sensitizes colon cancer cells to genotoxic stress via RIP1-dependent necrosis. *Cell Death Dis* **6**: e1729, doi:10.1038/cddis.2015.104.

Burger H, Zoumaro-Djayoon a., Boersma a. WM, Helleman J, Berns EMJJ, Mathijssen RHJ, Loos WJ, Wiemer E a C (2010)

Differential transport of platinum compounds by the human organic cation transporter hOCT2 (hSLC22A2). *Br J Pharmacol* **159**: 898–908, doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00569.x.

Burke WM, Orr J, Leitao M, Salom E, Gehrig P, Olawaiye AB, Brewer M, Boruta D, Herzog TJ, Shahin FA (2014a) Endometrial cancer: a review and current management strategies: part II. *Gynecol Oncol* **134**: 393–402, doi:10.1016/j.ygyno.2014.06.003.

Burke WM, Orr J, Leitao M, Salom E, Gehrig P, Olawaiye AB, Brewer M, Boruta D, Vilella J, Herzog T, Abu Shahin F (2014b) Endometrial cancer: a review and current management strategies: part I. *Gynecol Oncol* **134**: 385–392, doi:10.1016/j.ygyno.2014.05.018.

Butt RH, Coorssen JR (2013) Coomassie blue as a near-infrared fluorescent stain: a systematic comparison with Sypro Ruby for in-gel protein detection. *Mol Cell Proteomics* **12**: 3834–3850, doi:10.1074/mcp.M112.021881.

Cabrera S, Llauradó M, Castellví J, Fernandez Y, Alameda F, Colás E, Ruiz A, Doll A, Schwartz S, Carreras R, Xercavins J, Abal M, Gil-Moreno A, Reventós J (2012) Generation and characterization of orthotopic murine models for endometrial cancer. *Clin Exp Metastasis* **29**: 217–227, doi:10.1007/s10585-011-9444-2.

Calvet CY, André FM, Mir LM (2014) The culture of cancer cell lines as tumorspheres does not systematically result in cancer stem cell enrichment. *PLoS One* **9**: doi:10.1371/journal.pone.0089644.

Cao L, Zhou Y, Zhai B, Liao J, Xu W, Zhang R, Li J, Zhang Y, Chen L, Qian H, Wu M, Yin Z (2011) Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC Gastroenterol* **11**: 71, doi:10.1186/1471-230X-11-71.

Carrette O, Burkhard PR, Sanchez J-C, Hochstrasser DF (2006) State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: a key tool of proteomics research. *Nat Protoc* **1**: 812–823, doi:10.1038/nprot.2006.104.

Carvalho MJ, Abrantes AM, Laranjo M, Paiva B, Torgal I, Cabrita AS, Botelho F, DE Oliveira CF (2015a) Hematogenic Dissemination of Triple-negative Versus Hormonal Receptor-positive Breast Cancer Cells. *In Vivo* **29**: 435–444.

Carvalho MJ, Laranjo M, Abrantes AM, Torgal I, Botelho MF, Oliveira CF (2015b) Clinical translation for endometrial cancer stem cells hypothesis. *Cancer Metastasis Rev* **34**: 401–416, doi:10.1007/s10555-015-9574-0.

Carvalho R a, Rodrigues TB, Zhao P, Jeffrey FMH, Malloy CR, Sherry a D (2004) A <sup>13</sup>C isotopomer kinetic analysis of cardiac metabolism: influence of altered cytosolic redox and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**: H889–H895, doi:10.1152/ajpheart.00976.2003.

Carvalho R a, Zhao P, Wieggers CB, Jeffrey FMH, Malloy CR, Sherry a D, Tca a DS (2001) TCA cycle kinetics in the rat heart by analysis of isotopomers using indirect I H [ <sup>13</sup> C ] detection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **9085**: 1413–1421.

Carver BS, Pandolfi PP (2006) Mouse modeling in oncologic preclinical and translational research. *Clin Cancer Res* **12**: 5305–5311, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0482.

Cervelló I, Martínez-Conejero J a, Horcajadas J a, Pellicer a, Simón C (2007) Identification, characterization and co-localization of label-retaining cell population in mouse endometrium with typical undifferentiated markers. *Hum Reprod* **22**: 45–51, doi:10.1093/humrep/del332.

Cervelló I, Mirantes C, Santamaria X, Dolcet X, Matias-Guiu X, Simón C (2011) Stem cells in human endometrium and endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* **30**: 317–327, doi:10.1097/PGP.0b013e3182102754.

Chakravarty D, Gupta N, Goda JS, Srinivasan R, Patel FD, Dhaliwal L (2010) Steroid receptors, HER2/neu and Ki-67, in endometrioid type of endometrial carcinoma: Correlation with conventional histomorphological features of prognosis. *Acta Histochem* **112**: 355–363, doi:10.1016/j.acthis.2009.03.001.

Chan JK, Cheung MK, Huh WK, Osann K, Husain A, Teng NN, Kapp DS (2006) Therapeutic role of lymph node resection in endometrioid corpus cancer: A study of 12,333 patients. *Cancer* **107**: 1823–1830, doi:10.1002/cncr.22185.

Chan RWS, Gargett CE (2006) Identification of label-retaining cells in mouse endometrium. *Stem Cells* **24**: 1529–1538, doi:10.1634/stemcells.2005-0411.

Chan RWS, Schwab KE, Gargett CE (2004) Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod* **70**: 1738–1750, doi:10.1095/biolreprod.103.024109.

Chance EM, Seeholzer SH, Kobayashi K, Williamson JR (1983) Mathematical analysis of isotope labeling in the citric acid cycle with applications to <sup>13</sup>C NMR studies in perfused rat hearts. *J Biol Chem* **258**: 13785–13794.

Chang M-C, Chen J-H, Liang J-A, Yang K-T, Cheng K-Y, Kao C-H (2012) 18F-FDG PET or PET/CT for detection of metastatic lymph nodes in patients with endometrial cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Radiol* **81**: 3511–3517, doi:10.1016/j.ejrad.2012.01.024.

Chang S-J, Wang T-Y, Tsai C-Y, Hu T-F, Chang MD-T, Wang H-W (2009) Increased epithelial stem cell traits in advanced endometrial endometrioid carcinoma. *BMC Genomics* **10**: 613, doi:10.1186/1471-2164-10-613.

Chang YN, Zhang Y, Wang YJ, Wang LP, Duan H (2011) Effect of hysteroscopy on the peritoneal dissemination of endometrial cancer cells: A meta-analysis. *Fertil Steril* **96**: doi:10.1016/j.fertnstert.2011.07.1146.

Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Birnbaum D (2009) Breast cancer stem cells: tools and models to rely on. *BMC Cancer* **9**: 202, doi:10.1186/1471-2407-9-202.

Chen L, Chang W-C, Hung Y-C, Chang Y-Y, Bao B-Y, Huang H-C, Chung W-M, Shyr C-R, Ma W-L (2013) Androgen Receptor Increases CD133 Expression and Progenitor-Like Population That Associate With Cisplatin Resistance in Endometrial Cancer Cell Line. *Reprod Sci* **21**: 386–394, doi:10.1177/1933719113497281.

Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, Hung SC, Chang YL, Tsai ML, Lee YY, Ku HH, Chiou SH (2008) Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One* **3**: 1–14, doi:10.1371/journal.pone.0002637.

Cheng Y, Cheung AKL, Ko JMY, Phoon YP, Chiu PM, Lo PHY, Waterman ML, Lung ML (2013a) Physiological  $\beta$ -catenin signaling controls self-renewal networks and generation of stem-like cells from nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cell Biol* **14**: 44, doi:10.1186/1471-2121-14-44.

Cheng Y, Cheung AKL, Ko JMY, Phoon YP, Chiu PM, Lo PHY, Waterman ML, Lung ML (2013b) Physiological  $\beta$ -catenin signaling controls self-renewal networks and generation of stem-like cells from nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cell Biol* **14**: 44, doi:10.1186/1471-2121-14-44.

Cheon D-J, Orsulic S (2011) Mouse models of cancer. *Annu Rev Pathol* **6**: 95–119, doi:10.1146/annurev.pathol.3.121806.154244.

Cheung LWT, Hennessy BT, Li J, Yu S, Myers AP, Djordjevic B, Lu Y, Stemke-Hale K, Dyer MD, Zhang F, Ju Z, Cantley LC, Scherer SE, Liang H, Lu KH, Broaddus RR, Mills GB (2011) High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. *Cancer Discov* **1**: 170–185, doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0039.

Chiang S, Soslow R a (2014) Updates in diagnostic immunohistochemistry in endometrial carcinoma. *Semin Diagn Pathol* **31**: 205–215, doi:10.1053/j.semmp.2014.03.002.

Chitcholtan K, Sykes PH, Evans JJ (2012) The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer. *J Transl Med* **10**: 38, doi:10.1186/1479-5876-10-38.

Chitikova Z V., Gordeev S a., Bykova T V., Zubova SG, Pospelov V a., Pospelova T V. (2014) Sustained activation of DNA damage response in irradiated apoptosis-resistant cells induces reversible senescence associated with mTOR downregulation and expression of stem cell markers. *Cell Cycle* **13**: 1424–1439, doi:10.4161/cc.28402.

Chojiamts B, Jimi S, Kondo T, Naganuma Y, Matsumoto T, Kuroki M, Iwasaki H, Emoto M (2011) CD133 + cancer stem cell-like cells derived from uterine carcinosarcoma (malignant mixed Müllerian tumor). *Stem Cells* **29**: 1485–1495, doi:10.1002/stem.711.

Chung HH, Kim JW, Park N-H, Song Y-S, Kang S-B, Lee H-P (2006) Use of preoperative serum CA-125 levels for prediction of

lymph node metastasis and prognosis in endometrial cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand* **85**: 1501–1505, doi:10.1080/00016340601022777.

Chung L, Tang S, Wu Y, Sun G, Liu H-Y, Sun K-H (2015) Galectin-3 augments tumor initiating property and tumorigenicity of lung cancer through interaction with  $\beta$ -catenin. *Oncotarget* **6**: 4936–4952, doi:10.18632/oncotarget.3210.

Cioce M, Valerio M, Casadei L, Pulito C, Sacconi A, Mori F, Biagioni F, Manetti C, Muti P, Strano S, Blandino G (2014) Metformin-induced metabolic reprogramming of chemoresistant ALDHbright breast cancer cells. *Oncotarget* **5**: 4129–4143.

Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM (2006) Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* **66**: 9339–9344, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3126.

Clayton H, Titley I, Vivanco M dM (2004) Growth and differentiation of progenitor/stem cells derived from the human mammary gland. *Exp Cell Res* **297**: 444–460, doi:10.1016/j.yexcr.2004.03.029.

Cloke B, Huhtinen K, Fusi L, Kajihara T, Yliheikkilä M, Ho KK, Teklenburg G, Lavery S, Jones MC, Trew G, Kim JJ, Lam EWF, Cartwright JE, Poutanen M, Brosens JJ (2008) The androgen and progesterone receptors regulate distinct gene networks and cellular functions in decidualizing endometrium. *Endocrinology* **149**: 4462–4474, doi:10.1210/en.2008-0356.

Cojoc M, Mäbert K, Muders MH, Dubrovskaja A (2014) A role for cancer stem cells in therapy resistance: Cellular and molecular mechanisms. *Semin Cancer Biol* doi:10.1016/j.semcancer.2014.06.004.

Colak S, Medema JP (2014) Cancer stem cells - important players in tumor therapy resistance. *FEBS J* **281**: 4779–4791, doi:10.1111/febs.13023.

Coley HM (2008) Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev* **34**: 378–390, doi:10.1016/j.ctrv.2008.01.007.

Colombo N, Preti E, Landoni F, Carinelli S, Colombo a, Marini C, Sessa C (2011) Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **22 Suppl 6**: vi35–vi39, doi:10.1093/annonc/mdr374.

Cooke PS, Buchanan DL, Lubahn DB, Cunha GR (1998) Mechanism of estrogen action: lessons from the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Biol Reprod* **59**: 470–475.

Corbo C, Orrù S, Gemei M, Noto R Di, Mirabelli P, Imperlini E, Ruoppolo M, Vecchio L Del, Salvatore F (2012) Protein cross-talk in CD133+ colon cancer cells indicates activation of the Wnt pathway and upregulation of SRp20 that is potentially involved in tumorigenicity. *Proteomics* **12**: 2045–2059, doi:10.1002/pmic.201100370.

Cortes-Dericks L, Froment L, Boesch R, Schmid R a, Karoubi G (2014) Cisplatin-resistant cells in malignant pleural mesothelioma cell lines show ALDHhighCD44+ phenotype and sphere-forming capacity. *BMC Cancer* **14**: 304, doi:10.1186/1471-2407-14-304.

Coulon A, Flahaut M, Mühlethaler-Mottet A, Meier R, Liberman J, Balmas-Bourlout K, Nardou K, Yan P, Tercier S, Joseph J-M, Sommer L, Gross N (2011) Functional sphere profiling reveals the complexity of neuroblastoma tumor-initiating cell model. *Neoplasia* **13**: 991–1004, doi:10.1593/neo.11800.

Courneya KS, Karvinen KH, Campbell KL, Pearcey RG, Dundas G, Capstick V, Tonkin KS (2005) Associations among exercise, body weight, and quality of life in a population-based sample of endometrial cancer survivors. *Gynecol Oncol* **97**: 422–430, doi:10.1016/j.ygyno.2005.01.007.

Creasman W (2009) Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Int J Gynecol Obstet* **105**: 107–108, doi:10.1016/j.ijgo.2009.02.009.

Creutzberg CL, van Putten WL, Koper PC, Lybeert ML, Jobsen JJ, Wárlám-Rodenhuis CC, De Winter KA, Lutgens LC, van den Bergh AC, van de Steen-Banasik E, Beerman H, van Lent M (2000) Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-I endometrial carcinoma: multicentre randomised trial. PORTEC Study Group. Post Operative Radiation Therapy in Endometrial Carcinoma.

- Crippa F, Seregni E, Agresti R, Chiesa C, Pascali C, Bogni A, Decise D, De Sanctis V, Greco M, Daidone MG, Bombardieri E (1998) Association between [18F]fluorodeoxyglucose uptake and postoperative histopathology, hormone receptor status, thymidine labelling index and p53 in primary breast cancer: A preliminary observation. *Eur J Nucl Med* **25**: 1429–1434, doi:10.1007/s002590050319.
- Cuddihy AR, Jalali F, Coackley C, Bristow RG (2008) WTP53 induction does not override MTP53 chemoresistance and radioresistance due to gain-of-function in lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* **7**: 980–992, doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0471.
- Cui J, Li P, Liu X, Hu H, Wei W (2015) Abnormal expression of the Notch and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways in stem-like ALDHhiCD44+ cells correlates highly with Ki-67 expression in breast cancer. *Oncol Lett* **1600**–1606, doi:10.3892/ol.2015.2942.
- Dagrosa MA, Viaggi M, Longhino J, Calzetta O, Cabrini R, Edreira M, Juvenal G, Pisarev MA (2003) Experimental application of boron neutron capture therapy to undifferentiated thyroid carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **57**: 1084–1092, doi:10.1016/S0360-3016(03)00778-8.
- Darvishian F, Hummer AJ, Thaler HT, Bhargava R, Linkov I, Asher M, Soslow RA (2004) Serous endometrial cancers that mimic endometrioid adenocarcinomas: a clinicopathologic and immunohistochemical study of a group of problematic cases. *Am J Surg Pathol* **28**: 1568–1578.
- Dasari S, Bernard Tchounwou P (2014) Cisplatin in Cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* **740**: 364–378, doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- Dave B, Chang J (2009) Treatment resistance in stem cells and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **14**: 79–82, doi:10.1007/s10911-009-9117-9.
- Dawood S, Austin L, Cristofanilli M (2014) Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology (Williston Park)* **28**: 1101–1107,1110.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB (2008) The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab* **7**: 11–20, doi:10.1016/j.cmet.2007.10.002.
- Dedes KJ, Wetterskog D, Ashworth A, Kaye SB, Reis-Filho JS (2011) Emerging therapeutic targets in endometrial cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **8**: 261–271, doi:10.1038/nrclinonc.2010.216.
- DeSouza L V, Grigull J, Ghanny S, Dubé V, Romaschin AD, Colgan TJ, Siu KWM (2007) Endometrial carcinoma biomarker discovery and verification using differentially tagged clinical samples with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **6**: 1170–1182, doi:10.1074/mcp.M600378-MCP200.
- Dey D, Saxena M, Paranjape AN, Krishnan V, Giraddi R, Kumar MV, Mukherjee G, Rangarajan A (2009) Phenotypic and Functional Characterization of Human Mammary Stem/Progenitor Cells in Long Term Culture. *PLoS One* **4**: doi:10.1371/journal.pone.0005329.
- Diep CH, Daniel a. R, Mauro LJ, Knutson TP, Lange C a. (2015) Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. *J Mol Endocrinol* **54**: R31–R53, doi:10.1530/JME-14-0252.
- Dimitriadis E, White C a., Jones RL, Salamonsen L a. (2005) Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* **11**: 613–630, doi:10.1093/humupd/dmi023.
- Dingwall S, Lee JB, Guezguez B, Fiebig A, McNicol J, Boreham D, Collins TJ, Bhatia M (2015) Neoplastic human embryonic stem cells as a model of radiation resistance of human cancer stem cells. *Oncotarget* **1**–12.
- Dizdarevic S, Peters a M (2011) Imaging of multidrug resistance in cancer. *Cancer Imaging* **11**: 1–8, doi:10.1102/1470-7330.2011.0001.
- Doll A, Gonzalez M, Abal M, Llaurodo M, Rigau M, Colas E, Monge M, Xercavins J, Capella G, Diaz B, Gil-Moreno A, Alameda F, Reventos J (2009) An orthotopic endometrial cancer mouse model demonstrates a role for RUNX1 in distant metastasis. *Int J Cancer* **125**: 257–263, doi:10.1002/ijc.24330.



- Dong P, Kaneuchi M, Konno Y, Watari H, Sudo S, Sakuragi N (2013) Emerging therapeutic biomarkers in endometrial cancer. *Biomed Res Int* **2013**: doi:10.1155/2013/130362.
- Dong P, Kaneuchi M, Watari H, Hamada J, Sudo S, Ju J, Sakuragi N (2011) MicroRNA-194 inhibits epithelial to mesenchymal transition of endometrial cancer cells by targeting oncogene BMI-1. *Mol Cancer* **10**: 99, doi:10.1186/1476-4598-10-99.
- Dong P, Konno Y, Watari H, Hosaka M, Noguchi M, Sakuragi N (2014) The impact of microRNA-mediated PI3K/AKT signaling on epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness in endometrial cancer. *J Transl Med* **12**: 231, doi:10.1186/s12967-014-0231-0.
- Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS (2003a) In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem / progenitor cells. *Genes Dev* **17**: 1253–1270, doi:10.1101/gad.1061803.potential.
- Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS (2003b) In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* **17**: 1253–1270, doi:10.1101/gad.1061803.
- Dontu G, Wicha MS (2005) Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**: 75–86, doi:10.1007/s10911-005-2542-5.
- Dowdy SC, Jiang S, Zhou XC, Hou X, Jin F, Podratz KC, Jiang S-W (2006) Histone deacetylase inhibitors and paclitaxel cause synergistic effects on apoptosis and microtubule stabilization in papillary serous endometrial cancer cells. *Mol Cancer Ther* **5**: 2767–2776, doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0209.
- Duncan KA, Drinkwater KJ, Frost C, Remedios D, Barter S (2012) Staging cancer of the uterus: A national audit of MRI accuracy. *Clin Radiol* **67**: 523–530, doi:10.1016/j.crad.2011.10.019.
- El-Serafi I, Abedi-Valugherdi M, Potáková Z, Afsharian P, Mattsson J, Moshfegh A, Hassan M (2014) Cyclophosphamide alters the gene expression profile in patients treated with high doses prior to stem cell transplantation. *PLoS One* **9**: doi:10.1371/journal.pone.0086619.
- Eng C (2003) PTEN: One gene, Many syndromes. *Hum Mutat* **22**: 183–198, doi:10.1002/humu.10257.
- Epstein E, Blomqvist L (2014) Imaging in endometrial cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **28**: 721–739, doi:10.1016/j.bpobgyn.2014.04.007.
- Epstein E, Ramirez A, Skoog L, Valentin L (2001) Dilatation and curettage fails to detect most focal lesions in the uterine cavity in women with postmenopausal bleeding. *Acta Obstet Gynecol Scand* **80**: 1131–1136, doi:10.1034/j.1600-0412.2001.801210.x.
- Eramo a, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Biffoni M, Di Virgilio a, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R (2008) Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* **15**: 504–514, doi:10.1038/sj.cdd.4402283.
- Erickson RI, Paucar AA, Jackson RL, Visnyei K, Kornblum H (2008) Roles of insulin and transferrin in neural progenitor survival and proliferation. *J Neurosci Res* **86**: 1884–1894, doi:10.1002/jnr.21631.
- Fambrini M, Sorbi F, Sisti G, Cioni R, Turrini I, Taddei G, Guaschino S (2014) Endometrial carcinoma in high-risk populations: is it time to consider a screening policy? *Cytopathology* **25**: 71–77, doi:10.1111/cyt.12131.
- Fan F, Bellister S, Lu J, Ye X, Boulbes DR, Tozzi F, Sceusi E, Kopetz S, Tian F, Xia L, Zhou Y, Bhattacharya R, Ellis LM (2014) The requirement for freshly isolated human colorectal cancer (CRC) cells in isolating CRC stem cells. *Br J Cancer* **112**: 539–546, doi:10.1038/bjc.2014.620.
- Fan X, Liu S, Su F, Pan Q, Lin T (2012) Effective enrichment of prostate cancer stem cells from spheres in a suspension culture system. *Urol Oncol Semin Orig Investig* **30**: 314–318, doi:10.1016/j.urolonc.2010.03.019.
- Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle P a., Xu X, Elder DE, Herlyn M (2005) A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* **65**: 9328–9337, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1343.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D, Forman D, Bray F (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. <http://globocan.iarc.fr> (accessed: 17/02/2015).

Fisher B, Costantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronin WM (1994) Endometrial Cancer in Tamoxifen-Treated Breast Cancer Patients: Findings From the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *JNCI J Natl Cancer Inst* **86**: 527–537, doi:10.1093/jnci/86.7.527.

Fleming GF, Brunetto VL, Cella D, Look KY, Reid GC, Munkarah AR, Kline R, Burger RA, Goodman A, Burks RT, Mackey D (2004) Phase III trial of doxorubicin plus cisplatin with or without paclitaxel plus filgrastim in advanced endometrial carcinoma: A gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* **22**: 2159–2166, doi:10.1200/JCO.2004.07.184.

Fleming GF, Sill MW, Darcy KM, McMeekin DS, Thigpen JT, Adler LM, Berek JS, Chapman JA, DiSilvestro PA, Horowitz IR, Fiorica J V. (2010) Phase II trial of trastuzumab in women with advanced or recurrent, HER2-positive endometrial carcinoma: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* **116**: 15–20, doi:10.1016/j.ygyno.2009.09.025.

Fojo T, Menefee M (2007) Mechanisms of multidrug resistance: The potential role of microtubule-stabilizing agents. *Ann Oncol* **18**: 3–8, doi:10.1093/annonc/mdm172.

Folkens C, Man S, Xu P, Shaked Y, Hicklin DJ, Kerbel RS (2007) Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors. *Cancer Res* **67**: 3560–3564, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4238.

Franken N a P, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* **1**: 2315–2319, doi:10.1038/nprot.2006.339.

Freeman SJ, Aly a. M, Kataoka MY, Addley HC, Reinhold C, Sala E (2012) The Revised FIGO Staging System for Uterine Malignancies: Implications for MR Imaging. *Radiographics* **32**: 1805–1827, doi:10.1148/rg.326125519.

Freshney RI (2010) Culture of Animal Cells.

Friberg E, Orsini N, Mantzoros CS, Wolk a. (2007) Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: A meta-analysis. *Diabetologia* **50**: 1365–1374, doi:10.1007/s00125-007-0681-5.

Friel AM, Sergent PA, Patnaude C, Szotek PP, Oliva E, Scadden DT, Seiden M V., Foster R, Rueda BR (2008) Functional analyses of the cancer stem cell-like properties of human endometrial tumor initiating cells. *Cell Cycle* **7**: 242–249, doi:10.4161/cc.7.2.5207.

Friel AM, Zhang L, Curley MD, Therrien V a, Sergent P a, Belden SE, Borger DR, Mohapatra G, Zukerberg LR, Foster R, Rueda BR (2010) Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133 positive and negative endometrial cancer cells. *Reprod Biol Endocrinol* **8**: 147, doi:10.1186/1477-7827-8-147.

Fritz MA SL (2011) Clinical gynecologic endocrinology and infertility (philadelphia).

Fukamachi H, Seol HS, Shimada S, Funasaka C, Baba K, Kim JH, Park YS, Kim MJ, Kato K, Inokuchi M, Kawachi H, Yook JH, Eishi Y, Kojima K, Kim WH, Jang SJ, Yuasa Y (2013) CD49<sup>high</sup> Cells Retain Sphere-Forming and Tumor-Initiating Activities in Human Gastric Tumors. *PLoS One* **8**: doi:10.1371/journal.pone.0072438.

Gadducci A, Cosio S, Genazzani AR (2011) Tissue and serum biomarkers as prognostic variables in endometrioid-type endometrial cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **80**: 181–192, doi:10.1016/j.critrevonc.2010.11.005.

Gadepalli VS, Deb SP, Deb S, Rao RR (2014) Lung Cancer Stem Cells, p53 Mutations and MDM2. pp. 359–370.

Gagnon V, Van Themsche C, Turner S, Leblanc V, Asselin E (2008) Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis* **13**: 259–271, doi:10.1007/s10495-007-0165-6.

Gajjar M, Candeias MM, Malbert-Colas L, Mazars A, Fujita J, Olivares-Illana V, Fähræus R (2012) The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls mdm2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following dna damage. *Cancer Cell* **21**: 25–35, doi:10.1016/j.ccr.2011.11.016.

Galaal K, M AM, Bryant a, Ad L, Ta L (2014) Adjuvant chemotherapy for advanced endometrial cancer ( Review ) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON.

Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G (2012) Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* **31**: 1869–1883, doi:10.1038/onc.2011.384.

Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan a, Castedo M, Kroemer G (2014) Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis* **5**: e1257, doi:10.1038/cddis.2013.428.

Gao Y, Liu T, Cheng W, Wang H (2012) Isolation and characterization of proliferative, migratory and multidrug-resistant endometrial carcinoma-initiating cells from human type II endometrial carcinoma cell lines. *Oncol Rep* **28**: 527–532, doi:10.3892/or.2012.1807.

Gao Y, Liu T, Huang Y (2015) MicroRNA-134 suppresses endometrial cancer stem cells by targeting POGUT1 and Notch pathway proteins. *FEBS Lett* **589**: 207–214, doi:10.1016/j.febslet.2014.12.002.

Gargett CE, Chan RWS, Schwab KE (2008) Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: role of stem/progenitor cells. *Mol Cell Endocrinol* **288**: 22–29, doi:10.1016/j.mce.2008.02.026.

Gargett CE, Masuda H (2010) Adult stem cells in the endometrium. *Mol Hum Reprod* **16**: 818–834, doi:10.1093/molehr/gaq061.

Gatenby R a, Gillies RJ (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* **4**: 891–899, doi:10.1038/nrc1478.

Gaviraghi M, Tunici P, Valensin S, Rossi M, Giordano C, Magnoni L, Dandrea M, Montagna L, Ritelli R, Scarpa A, Bakker A (2010) Pancreatic cancer spheres are more than just aggregates of stem marker-positive cells. *Biosci Rep* **31**: 45–55, doi:10.1042/BSR20100018.

Ghooshkhaneh H, Treglia G, Sabouri G, Davoodi R, Sadeghi R (2014) Risk stratification and prognosis determination using 18F-FDG PET imaging in endometrial cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol* **132**: 669–676, doi:10.1016/j.ygyno.2014.01.039.

Gielen SCJP, Hanekamp EE, Hanifi-Moghaddam P, Sijbers a M, van Gool a J, Burger CW, Blok LJ, Huikeshoven FJ (2006) Growth regulation and transcriptional activities of estrogen and progesterone in human endometrial cancer cells. *Int J Gynecol Cancer* **16**: 110–120, doi:10.1111/j.1525-1438.2006.00279.x.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G (2007) ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell* **1**: 555–567, doi:10.1016/j.stem.2007.08.014.

Girouard J, Lafleur MJ, Parent S, Leblanc V, Asselin E (2013) Involvement of Akt isoforms in chemoresistance of endometrial carcinoma cells. *Gynecol Oncol* **128**: 335–343, doi:10.1016/j.ygyno.2012.11.016.

Gomez-Casal R, Bhattacharya C, Ganesh N, Bailey L, Basse P, Gibson M, Epperly M, Levina V (2013) Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes. *Mol Cancer* **12**: 94, doi:10.1186/1476-4598-12-94.

González-Rodilla I, Aller L, Llorca J, Muñoz AB, Verna V, Estévez J, Schneider J (2013) The E-cadherin expression vs. tumor cell proliferation paradox in endometrial cancer. *Anticancer Res* **33**: 5091–5096.

González-Rodilla I, Verna V, Muñoz AB, Estévez J, Boix M, Schneider J (2011) Expression of the apoptosis-related genes Bcl-2 and p53 in clinical samples from endometrial carcinoma patients. *Anticancer Res* **31**: 4191–4193.

Gorai I, Yanagibashi T, Taki A, Udagawa K, Miyagi E, Nakazawa T, Hirahara F, Nagashima Y, Minaguchi H (1997) Uterine carcinosarcoma is derived from a single stem cell: An in vitro study. *Int J Cancer* **72**: 821–827, doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19970904)72:5<821::AID-IJC19>3.0.CO;2-B.

Götte M, Greve B, Kelsch R, Müller-Uthoff H, Weiss K, Kharabi Masouleh B, Sibrowski W, Kiesel L, Buchweitz O (2011) The

adult stem cell marker Musashi-1 modulates endometrial carcinoma cell cycle progression and apoptosis via Notch-1 and p21WAF1/CIP1. *Int J Cancer* **129**: 2042–2049, doi:10.1002/ijc.25856.

Götte M, Wolf M, Staebler A, Buchweitz O, Kelsch R, Schüring AN, Kiesel L (2008) Increased expression of the adult stem cell marker Musashi-1 in endometriosis and endometrial carcinoma. *J Pathol* **215**: 317–329, doi:10.1002/path.2364.

Green SK, Francia G, Isidoro C, Kerbel RS (2004) Antiadhesive antibodies targeting E-cadherin sensitize multicellular tumor spheroids to chemotherapy in vitro. *Mol Cancer Ther* **3**: 149–159.

Gu C, Banasavadi-Siddegowda YK, Joshi K, Nakamura Y, Kurt H, Gupta S, Nakano I (2013) Tumor-specific activation of the C-JUN/MELK pathway regulates glioma stem cell growth in a p53-dependent manner. *Stem Cells* **31**: 870–881, doi:10.1002/stem.1322.

Guralp O, Kushner DM (2011) Iatrogenic transtubal spill of endometrial cancer: risk or myth. *Arch Gynecol Obstet* **1–13**, doi:10.1007/s00404-011-2031-6.

Gutiérrez-González a., Belda-Iniesta C, Bargiela-Iparraquirre J, Dominguez G, García Alfonso P, Perona R, Sanchez-Perez I (2013) Targeting Chk2 improves gastric cancer chemotherapy by impairing DNA damage repair. *Apoptosis* **18**: 347–360, doi:10.1007/s10495-012-0794-2.

Guttilla IK, Phoenix KN, Hong X, Tirnauer JS, Claffey KP, White B a. (2012) Prolonged mammosphere culture of MCF-7 cells induces an EMT and repression of the estrogen receptor by microRNAs. *Breast Cancer Res Treat* **132**: 75–85, doi:10.1007/s10549-011-1534-y.

Halperin E, Wazer D, Carlos P, Brady L (2013) Principles of practice of Radiation Oncology (Philadelphia: Wolters Kluwer).

Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P (2004) Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol Vitr* **18**: 703–710, doi:10.1016/j.tiv.2004.03.012.

Hapangama DK, Kamal a. M, Bulmer JN (2014) Estrogen receptor : the guardian of the endometrium. *Hum Reprod Update* **21**: 174–193, doi:10.1093/humupd/dmu053.

Harkenrider MM, Block AM, Siddiqui Z a., Small W (2015) The role of vaginal cuff brachytherapy in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* **136**: 365–372, doi:10.1016/j.ygyno.2014.12.036.

Hartomo T, Van Huyen Pham T, Yamamoto N, Hirase S, Hasegawa D, Kosaka Y, Matsuo M, Hayakawa A, Takeshima Y, Iijima K, Nishio H, Nishimura N (2014) Involvement of aldehyde dehydrogenase IA2 in the regulation of cancer stem cell properties in neuroblastoma. *Int J Oncol* doi:10.3892/ijo.2014.2801.

Hashimoto N, Tsunedomi R, Yoshimura K, Watanabe Y, Hazama S, Oka M (2014) Cancer stem-like sphere cells induced from de-differentiated hepatocellular carcinoma-derived cell lines possess the resistance to anti-cancer drugs. *BMC Cancer* **14**: 722, doi:10.1186/1471-2407-14-722.

Hassan M, Andersson BS (2013) Role of pharmacogenetics in busulfan/cyclophosphamide conditioning therapy prior to hematopoietic stem cell transplantation. *Pharmacogenomics* **14**: 75–87, doi:10.2217/pgs.12.185.

Hato S V., Khong A, De Vries IJM, Lesterhuis WJ (2014) Molecular pathways: The immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics. *Clin Cancer Res* **20**: 2831–2837, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3141.

He Q-Z, Luo X-Z, Wang K, Zhou Q, Ao H, Yang Y, Li S-X, Li Y, Zhu H-T, Duan T (2014) Isolation and characterization of cancer stem cells from high-grade serous ovarian carcinomas. *Cell Physiol Biochem* **33**: 173–184, doi:10.1159/000356660.

Hidaka T, Kato K, Yonezawa R, Shima T, Nakashima A, Nagira K, Nakamura T, Saito S (2007) Omission of lymphadenectomy is possible for low-risk corpus cancer. *Eur J Surg Oncol* **33**: 86–90, doi:10.1016/j.ejso.2006.09.035.

Hidaka T, Nakamura T, Shima T, Yuki H, Saito S (2006) Paclitaxel/carboplatin versus cyclophosphamide/adriamycin/cisplatin as postoperative adjuvant chemotherapy for advanced endometrial adenocarcinoma. *J Obstet Gynaecol Res* **32**: 330–337, doi:10.1111/j.1447-0756.2006.00405.x.

Hill EK, Dizon DS (2012) Medical Therapy of Endometrial Cancer. *Drugs* **72**: 705–713, doi:10.2165/11631840-000000000-00000.

Hilton HN, Santucci N, Silvestri a., Kantimm S, Huschtscha LI, Graham JD, Clarke CL (2014) Progesterone stimulates progenitor cells in normal human breast and breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **143**: 423–433, doi:10.1007/s10549-013-2817-2.

Hinata N, Shirakawa T, Zhang Z, Matsumoto A, Fujisawa M, Okada H, Kamidono S, Gotoh A (2003) Radiation induces p53-dependent cell apoptosis in bladder cancer cells with wild-type-p53 but not in p53-mutated bladder cancer cells. *Urol Res* **31**: 387–396, doi:10.1007/s00240-003-0355-9.

Hoekstra A V., Ward EC, Hardt JL, Lurain JR, Singh DK, Buttin BM, Schink JC, Kim JJ (2008) Chemosensitization of endometrial cancer cells through AKT inhibition involves FOXO1. *Gynecol Oncol* **108**: 609–618, doi:10.1016/j.ygyno.2007.11.007.

Hogberg T (2008) Adjuvant Chemotherapy in Endometrial Carcinoma: Overview of Randomised Trials. *Clin Oncol* **20**: 463–469, doi:10.1016/j.clon.2008.04.001.

Hogberg T, Signorelli M, De Oliveira CF, Fossati R, Lissoni AA, Sorbe B, Andersson H, Grenman S, Lundgren C, Rosenberg P, Boman K, Tholander B, Scambia G, Reed N, Cormio G, Tognon G, Clarke J, Sawicki T, Zola P, Kristensen G (2010) Sequential adjuvant chemotherapy and radiotherapy in endometrial cancer-Results from two randomised studies. *Eur J Cancer* **46**: 2422–2431, doi:10.1016/j.ejca.2010.06.002.

Honig a., Weidler C, Häusler S, Krockenberger M, Buchholz S, Köster F, Segerer SE, Dietl J, Engel JB (2010) Overexpression of polycomb protein BMI-1 in human specimens of breast, ovarian, endometrial and cervical cancer. *Anticancer Res* **30**: 1559–1564.

Hope KJ, Jin L, Dick JE (2004) Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* **5**: 738–743, doi:10.1038/ni1080.

House CD, Hernandez L, Annunziata CM (2015) *In vitro* Enrichment of Ovarian Cancer Tumor-initiating Cells. *J Vis Exp* 1–8, doi:10.3791/52446.

Huang Y-W, Xu L-Q, Luo R-Z, Huang X, Hou T, Zhang Y-N (2013) VEGF-c expression in an *in vivo* model of orthotopic endometrial cancer and retroperitoneal lymph node metastasis. *Reprod Biol Endocrinol* **11**: 49, doi:10.1186/1477-7827-11-49.

Hubbard S a, Friel AM, Kumar B, Zhang L, Rueda BR, Gargett CE (2009) Evidence for cancer stem cells in human endometrial carcinoma. *Cancer Res* **69**: 8241–8248, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4808.

Hubbard S a, Gargett CE (2010) A cancer stem cell origin for human endometrial carcinoma? *Reproduction* **140**: 23–32, doi:10.1530/REP-09-0411.

Hubenak JR, Zhang Q, Branch CD, Kronowitz SJ (2014) Mechanisms of injury to normal tissue after radiotherapy: a review. *Plast Reconstr Surg* **133**: 49e – 56e, doi:10.1097/01.prs.0000440818.23647.0b.

Hunn J, Dodson MK, Webb J, Soisson AP (2009) Endometrial Cancer-current state of the art therapies and unmet clinical needs: The role of surgery and preoperative radiographic assessment. *Adv Drug Deliv Rev* **61**: 890–895, doi:10.1016/j.addr.2009.04.015.

Indermaur MD, Xiong Y, Kamath SG, Boren T, Hakam A, Wenham RM, Apte SM, Lancaster JM (2010) Genomic-directed targeted therapy increases endometrial cancer cell sensitivity to doxorubicin. *Am J Obstet Gynecol* **203**: 158.e1–e158.e40, doi:10.1016/j.ajog.2010.02.003.

Insinga A, Cicalese A, Pelicci PG (2014) DNA damage response in adult stem cells. *Blood Cells, Mol Dis* **52**: 147–151, doi:10.1016/j.bcmd.2013.12.005.

Islam F, Qiao B, Smith R a., Gopalan V, Lam AK-Y (2015) Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates. *Exp Mol Pathol* doi:10.1016/j.yexmp.2015.02.002.

Issaq HJ, Veenstra TD (2008) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): Advances and perspectives.

*Biotechniques* **44**: 697–700, doi:10.2144/000112823.

Ito T, Sato N, Yamaguchi Y, Tazawa C, Moriya T, Hirakawa H, Hayashi S-I (2014) Differences in Stemness Properties Associated With the Heterogeneity of Luminal-Type Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* **15**: 1–11, doi:10.1016/j.clbc.2014.11.002.

Jacobsen BM, Richer JK, Schittone S a., Horwitz KB (2002) New human breast cancer cells to study progesterone receptor isoform ratio effects and ligand-independent gene regulation. *J Biol Chem* **277**: 27793–27800, doi:10.1074/jbc.M202584200.

Jang H, Yang J, Lee E, Cheong J-H (2015) Metabolism in embryonic and cancer stemness. *Arch Pharm Res* **38**: 381–388, doi:10.1007/s12272-015-0558-y.

Janku F, Tsimberidou AM, Garrido-Laguna I, Wang X, Luthra R, Hong DS, Naing A, Falchook GS, Moroney JW, Piha-Paul SA, Wheler JJ, Moulder SL, Fu S, Kurzrock R (2011) PIK3CA mutations in patients with advanced cancers treated with PI3K/AKT/mTOR axis inhibitors. *Mol Cancer Ther* **10**: 558–565, doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0994.

Jeffrey FM, Rajagopal A, Malloy CR, Sherry AD (1991) <sup>13</sup>C-NMR: a simple yet comprehensive method for analysis of intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci* **16**: 5–10, doi:10.1016/0968-0004(91)90004-F.

Jia L, Liu Y, Yi X, Miron A, Crum CP, Kong B, Zheng W (2008) Endometrial glandular dysplasia with frequent p53 gene mutation: a genetic evidence supporting its precancer nature for endometrial serous carcinoma. *Clin Cancer Res* **14**: 2263–2269, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4837.

Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, Wang H, Liu Z, Su Y, Stass SA, Katz RL (2009) Aldehyde dehydrogenase I is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res* **7**: 330–338, doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0393.

Johnson N, Bryant a, Miles T, Hogberg T, Cornes P (2014) Adjuvant chemotherapy for endometrial cancer after hysterectomy ( Review ). doi:10.1002/14651858.CD003175.pub2.Adjuvant.

Kamat A a, Merritt WM, Coffey D, Lin YG, Patel PR, Broaddus R, Nugent E, Han LY, Landen CN, Spannuth W a, Lu C, Coleman RL, Gershenson DM, Sood AK (2007a) Clinical and biological significance of vascular endothelial growth factor in endometrial cancer. *Clin Cancer Res* **13**: 7487–7495, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1017.

Kamat AA, Merritt WM, Coffey D, Lin YG, Patel PR, Broaddus R, Nugent E, Han LY, Landen CN, Spannuth WA, Lu C, Coleman RL, Gershenson DM, Sood AK (2007b) Clinical and biological significance of vascular endothelial growth factor in endometrial cancer. *Clin Cancer Res* **13**: 7487–7495, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1017.

Kamata Y, Watanabe J, Hata H, Hamano M, Kuramoto H (2004) Quantitative study on the correlation between p53 gene mutation and its expression in endometrial carcinoma cell lines. *Eur J Gynaecol Oncol* **25**: 55–60.

Kapuscinski J (1995) DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* **70**: 220–233, doi:10.3109/10520299509108199.

Karimi-Busheri F, Rasouli-Nia A, Mackey JR, Weinfeld M (2010) Senescence evasion by MCF-7 human breast tumor-initiating cells. *Breast Cancer Res* **12**: R31, doi:10.1186/bcr2583.

Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P (1990) Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* **9**: 1603–1614.

Kato K, Kuhara A, Yoneda T, Inoue T, Takao T, Ohgami T, Dan L, Kuboyama A, Kusunoki S, Takeda S, Wake N (2011) Sodium butyrate inhibits the self-renewal capacity of endometrial tumor side-population cells by inducing a DNA damage response. *Mol Cancer Ther* **10**: 1430–1439, doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-1062.

Kato K, Takao T, Kuboyama A, Tanaka Y, Ohgami T, Yamaguchi S, Adachi S, Yoneda T, Ueoka Y, Kato K, Hayashi S, Asanoma K, Wake N (2010) Endometrial cancer side-population cells show prominent migration and have a potential to differentiate into the mesenchymal cell lineage. *Am J Pathol* **176**: 381–392, doi:10.2353/ajpath.2010.090056.

Kato K, Yoshimoto M, Kato K, Adachi S, Yamayoshi A, Arima T, Asanoma K, Kyo S, Nakahata T, Wake N (2007)

Characterization of side-population cells in human normal endometrium. *Hum Reprod* **22**: 1214–1223, doi:10.1093/humrep/del514.

Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL, Strasser A (2007) Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science* (80- ).

Khanna C, Hunter K (2005) Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* **26**: 513–523, doi:10.1093/carcin/bgh261.

Kim JY, Tavaré S, Shibata D (2005) Counting human somatic cell replications: methylation mirrors endometrial stem cell divisions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 17739–17744, doi:10.1073/pnas.0503976102.

Kim K, Howell B (1997) Resistance to Cytotoxic Drugs in DNA Mismatch maintained. *Clin Cancer Res* **3**:

Kim KH, Yoo BC, Kim WK, Hong JP, Kim K, Song EY, Lee JY, Cho JY, Ku JL (2014) CD133 and CD133-regulated nucleophosmin linked to 5-fluorouracil susceptibility in human colon cancer cell line SW620. *Electrophoresis* **35**: 522–532, doi:10.1002/elps.201300364.

Kitajima K, Suenaga Y, Ueno Y, Maeda T, Ebina Y, Yamada H, Okunaga T, Kubo K, Sofue K, Kanda T, Tamaki Y, Sugimura K (2015) Preoperative risk stratification using metabolic parameters of 18F-FDG PET/CT in patients with endometrial cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **42**: 1268–1275, doi:10.1007/s00259-015-3037-2.

Klatte S, Wendisch VF (2015) Role of L-alanine for redox self-sufficient amination of alcohols. *Microb Cell Fact* **14**: 1–10, doi:10.1186/s12934-014-0189-x.

Knapp P, Chabowski a, Błachnio-Zabielska a, Walentowicz-Sadłacka M, Grabiec M, Knapp P (2013) Expression of Estrogen Receptors ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), Cyclooxygenase-2 and Aromatase in normal endometrium and endometrioid cancer of uterus. *Adv Med Sci* **58**: 96–103, doi:10.2478/v10039-012-0055-1.

Kondo C, Shibata K, Terauchi M, Kajiyama H, Ino K, Nomura S, Nawa A, Mizutani S, Kikkawa F (2006) A novel role for placental leucine aminopeptidase (P-LAP) as a determinant of chemoresistance in endometrial carcinoma cells. *Int J Cancer* **118**: 1390–1394, doi:10.1002/ijc.21509.

Konduri SD, Medisetty R, Liu W, Kaiparettu BA, Srivastava P, Brauch H, Fritz P, Swetzig WM, Gardner AE, Khan S a, Das GM (2010) Mechanisms of estrogen receptor antagonism toward p53 and its implications in breast cancer therapeutic response and stem cell regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 15081–15086, doi:10.1073/pnas.1009575107.

Kong A, Johnson N, Kitchener HC, Lawrie T a (2012a) Adjuvant radiotherapy for stage I endometrial cancer. *Cochrane Database Syst Rev* **3**: doi:10.1002/14651858.CD003916.pub4.Adjuvant.

Kong A, Johnson N, Kitchener HC, Lawrie TA (2012b) Adjuvant radiotherapy for stage i endometrial cancer: An updated cochrane systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* **104**: 1625–1634, doi:10.1093/jnci/djs374.

Konno Y, Dong P, Xiong Y, Suzuki F, Lu J (2014) MicroRNA-101 targets EZH2, MCL-1 and FOS to suppress proliferation, invasion and stem cell-like phenotype of aggressive endometrial cancer cells. *Oncotarget* **5**: 6049–6062.

Korkaya H, Paulson A, Iovino F, Wicha MS (2008) HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene* **27**: 6120–6130, doi:10.1038/onc.2008.207.

Korkaya H, Wicha MS (2013) HER2 and breast cancer stem cells: More than meets the eye. *Cancer Res* **73**: 3489–3493, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0260.

Kraynak a. R, Barnum JE, Cunningham CL, Ng a., Ykoruk B a., Bennet B, Stoffregen D, Merschman M, Freeland E, Galloway SM (2015) Alkaline comet assay in liver and stomach, and micronucleus assay in bone marrow, from rats treated with 2-acetylaminofluorene, azidothymidine, cisplatin, or isobutyraldehyde. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* **786-788**: 77–86, doi:10.1016/j.mrgentox.2015.03.005.

Kreizman-Shefer H, Pricop J, Goldman S, Elmalah I, Shalev E (2014) Distribution of estrogen and progesterone receptors isoforms in endometrial cancer. *Diagn Pathol* **9**: 77, doi:10.1186/1746-1596-9-77.

- Kroemer G, Martin SJ (2005) Caspase-independent cell death. *Nat Med* **11**: 725–730, doi:10.1038/nm1263.
- Kryczek I, Liu S, Roh M, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Banerjee M, Mao Y, Kotarski J, Wicha MS, Liu R, Zou W (2012) Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells. *Int J Cancer* **130**: 29–39, doi:10.1002/ijc.25967.
- Kurra V, Krajewski KM, Jagannathan J, Giardino A, Berlin S, Ramaiya N (2013) Typical and atypical metastatic sites of recurrent endometrial carcinoma. *Cancer Imaging* **13**: 113–122, doi:10.1102/1470-7330.2013.0011.
- Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar A V., Ghanate AD, Chaskar PD, Doiphode RY, Bapat S a. (2009) Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells* **27**: 2059–2068, doi:10.1002/stem.154.
- Kusunoki S, Kato K, Tabu K, Inagaki T, Okabe H, Kaneda H, Suga S, Terao Y, Taga T, Takeda S (2013) The inhibitory effect of salinomycin on the proliferation, migration and invasion of human endometrial cancer stem-like cells. *Gynecol Oncol* **129**: 598–605, doi:10.1016/j.ygyno.2013.03.005.
- Lai C-H, Lin G, Yen T-C, Liu F-Y (2014) Molecular imaging in the management of gynecologic malignancies. *Gynecol Oncol* **135**: 4–10, doi:10.1016/j.ygyno.2014.07.092.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**: 645–648, doi:10.1038/367645a0.
- Lee E-J, Kim T-J, Kim DS, Choi CH, Lee J-W, Lee J-H, Bae D-S, Kim B-G (2010a) P53 Alteration Independently Predicts Poor Outcomes in Patients With Endometrial Cancer: a Clinicopathologic Study of 131 Cases and Literature Review. *Gynecol Oncol* **116**: 533–538, doi:10.1016/j.ygyno.2009.11.018.
- Lee HE, Kim JH, Kim YJ, Choi SY, Kim S-W, Kang E, Chung IY, Kim IA, Kim EJ, Choi Y, Ryu HS, Park SY (2011) An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer* **104**: 1730–1738, doi:10.1038/bjc.2011.159.
- Lee SC, Kaunitz AM, Sanchez-Ramos L, Rhatigan RM (2010b) The oncogenic potential of endometrial polyps: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* **116**: 1197–1205, doi:10.1097/AOG.0b013e3182273e6a.
- Lee SI, Catalano O a., Dehdashti F (2015) Evaluation of Gynecologic Cancer with MR Imaging, 18F-FDG PET/CT, and PET/MR Imaging. *J Nucl Med* **56**: 436–443, doi:10.2967/jnumed.114.145011.
- Lehmann C, Jobs G, Thomas M, Burtscher H, Kubbies M (2012) Established breast cancer stem cell markers do not correlate with in vivo tumorigenicity of tumor-initiating cells. *Int J Oncol* **41**: 1932–1942, doi:10.3892/ijo.2012.1654.
- Leong HS, Chong FT, Sew PH, Lau DP, Wong BH, Teh B-T, Tan DSW, Iyer NG (2014) Targeting Cancer Stem Cell Plasticity Through Modulation of Epidermal Growth Factor and Insulin-Like Growth Factor Receptor Signaling in Head and Neck Squamous Cell Cancer. *Stem Cells Transl Med* **3**: 1055–1065, doi:10.5966/sctm.2013-0214.
- Li a, Jiao Y, Yong KJ, Wang F, Gao C, Yan B, Srivastava S, Lim GSD, Tang P, Yang H, Tenen DG, Chai L (2013) SALL4 is a new target in endometrial cancer. *Oncogene* **1**–10, doi:10.1038/onc.2013.529.
- Li J, Sasaki H, Sheng YL, Schneiderman D, Xiao CW, Kotsuji F, Tsang BK (2000) Apoptosis and chemoresistance in human ovarian cancer: is Xiap a determinant? *Biol Signals Recept* **9**: 122–130, doi:10.1159/000014631.
- Li M, Knight D a., Smyth MJ, Stewart TJ (2012) Sensitivity of a novel model of mammary cancer stem cell-like cells to TNF-related death pathways. *Cancer Immunol Immunother* **61**: 1255–1268, doi:10.1007/s00262-012-1200-1.
- Li S, Li Q (2014) Cancer stem cells and tumor metastasis (Review). *Int J Oncol* **44**: 1806–1812, doi:10.3892/ijo.2014.2362.
- Li Z, Huang C, Bai S, Pan X, Zhou R, Wei Y, Zhao X (2008a) Prognostic evaluation of epidermal fatty acid-binding protein and calcyphosine, two proteins implicated in endometrial cancer using a proteomic approach. *Int J Cancer* **123**: 2377–2383, doi:10.1002/ijc.23808.



Li Z, Zhao X, Bai S, Wang Z, Chen L, Wei Y, Huang C (2008b) Proteomics identification of cyclophilin a as a potential prognostic factor and therapeutic target in endometrial carcinoma. *Mol Cell Proteomics* **7**: 1810–1823, doi:10.1074/mcp.M700544-MCP200.

Liao WWW, Ye YY, Deng YY, Bian XX, Ding YY (2014) Metastatic cancer stem cells: from the concept to therapeutics. *Am J Stem Cells* **3**: 46–62.

Lim YC, Kang HJ, Moon JH (2014) C-Met pathway promotes self-renewal and tumorigenicity of head and neck squamous cell carcinoma stem-like cell. *Oral Oncol* **50**: 633–639, doi:10.1016/j.oraloncology.2014.04.004.

Liu JC, Lerou PH, Lahav G (2014a) Stem cells: balancing resistance and sensitivity to DNA damage. *Trends Cell Biol* **24**: 268–274, doi:10.1016/j.tcb.2014.03.002.

Liu S, Liu C, Min X, Ji Y, Wang N, Liu D, Cai J, Li K (2013) Prognostic value of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase in ovarian cancer: A meta-analysis. *PLoS One* **8**: 3080–3088, doi:10.1371/journal.pone.0081050.

Liu W, Moulay M, Willenbrock S, Roof C, Junghans C, Ngenzahayo A, Nolte I, Murua Escobar H (2015) Comparative characterization of stem cell marker expression, metabolic activity and resistance to doxorubicin in adherent and spheroid cells derived from the canine prostate adenocarcinoma cell line CT1258. *Anticancer Res* **35**: 1917–1927.

Liu Y, Nenutil R, Appleyard M V, Murray K, Boylan M, Thompson a M, Coates PJ (2014b) Lack of correlation of stem cell markers in breast cancer stem cells. *Br J Cancer* **110**: 2063–2071, doi:10.1038/bjc.2014.105.

Llauradó M, Ruiz A, Majem B, Ertekin T, Colás E, Pedrola N, Devis L, Rigau M, Sequeiros T, Montes M, Garcia M, Cabrera S, Gil-Moreno A, Xercavins J, Castellví J, Garcia A, Ramón y Cajal S, Moreno G, Alameda F, Vázquez-Levin M, Palacios J, Prat J, Doll A, Matías-Guiu X, Abal M, Reventós J (2012) Molecular bases of endometrial cancer: new roles for new actors in the diagnosis and the therapy of the disease. *Mol Cell Endocrinol* **358**: 244–255, doi:10.1016/j.mce.2011.10.003.

Lomnyska MI, Becker S, Gemoll T, Lundgren C, Habermann J, Olsson a, Bodin I, Engström U, Hellman U, Hellman K, Hellström a-C, Andersson S, Mints M, Auer G (2012) Impact of genomic stability on protein expression in endometrioid endometrial cancer. *Br J Cancer* **106**: 1297–1305, doi:10.1038/bjc.2012.67.

López J, Poitevin A, Mendoza-Martínez V, Pérez-Plasencia C, García-Carrancá A (2012) Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer* **12**: 48, doi:10.1186/1471-2407-12-48.

López J, Valdez-Morales FJ, Benítez-Bribiesca L, Cerbón M, Carrancá AG (2013) Normal and cancer stem cells of the human female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol* **11**: 53, doi:10.1186/1477-7827-11-53.

Ma B, Lei X, Guan Y, Mou LS, Yuan YF, Yue H, Lu Y, Xu GT, Qian J (2011) Maintenance of retinal cancer stem cell-like properties through long-term serum-free culture from human retinoblastoma. *Oncol Rep* **26**: 135–143, doi:10.3892/or.2011.1291.

Maggi R, Lissoni A, Spina F, Melpignano M, Zola P, Favalli G, Colombo A, Fossati R (2006) Adjuvant chemotherapy vs radiotherapy in high-risk endometrial carcinoma: results of a randomised trial. *Br J Cancer* **95**: 266–271, doi:10.1038/sj.bjc.6603279.

Mahmood T, Yang PC (2012) Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* **4**: 429–434, doi:10.4103/1947-2714.100998.

Malloy CR, Sherry a. D, Jeffrey FMH (1988) Evaluation of carbon flux and substrate selection through alternate pathways involving the citric acid cycle of the heart by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *J Biol Chem* **263**: 6964–6971.

Mamat S, Ikeda J-I, Tian T, Wang Y, Luo W, Aozasa K, Morii E (2011) Transcriptional Regulation of Aldehyde Dehydrogenase IAI Gene by Alternative Spliced Forms of Nuclear Factor Y in Tumorigenic Population of Endometrial Adenocarcinoma. *Genes Cancer* **2**: 979–984, doi:10.1177/1947601911436009.

Mani S a, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg R a (2008) The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells.

*Cell* **133**: 704–715, doi:10.1016/j.cell.2008.03.027.

Marampon F, Gravina GL, Popov VM, Scarsella L, Festuccia C, La Verghetta ME, Parente S, Cerasani M, Bruera G, Ficorella C, Ricevuto E, Tombolini V, Di Cesare E, Zani BM (2014) Close correlation between MEK/ERK and Aurora-B signaling pathways in sustaining tumorigenic potential and radioresistance of gynecological cancer cell lines. *Int J Oncol* **44**: 285–294, doi:10.3892/ijo.2013.2167.

Marcato P, Dean C a., Giacomantonio C a., Lee PWK (2011) Aldehyde dehydrogenase: Its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle* **10**: 1378–1384, doi:10.4161/cc.10.9.15486.

Margolin D a., Myers T, Zhang X, Bertoni DM, Reuter B a., Obokhare I, Borgovan T, Grimes C, Green H, Driscoll T, Lee C-G, Davis NK, Li L (2015) The critical roles of tumor-initiating cells and the lymph node stromal microenvironment in human colorectal cancer extranodal metastasis using a unique humanized orthotopic mouse model. *FASEB J* **1**–11, doi:10.1096/fj.14-268938.

Mariani A, Dowdy SC, Cliby WA, Gostout BS, Jones MB, Wilson TO, Podratz KC (2008) Prospective assessment of lymphatic dissemination in endometrial cancer: A paradigm shift in surgical staging. *Gynecol Oncol* **109**: 11–18, doi:10.1016/j.ygyno.2008.01.023.

Maruyama T, Yoshimura Y (2008) Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. *Endocr J* **55**: 795–810, doi:10.1507/endocrj.K08E-067.

Masood R, Hochstim C, Cervenka B, Zu S, Baniwal SK, Patel V, Kobiela a., Sinha UK (2013) A novel orthotopic mouse model of head and neck cancer and lymph node metastasis. *Oncogenesis* **2**: e68, doi:10.1038/oncis.2013.33.

Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL (1997) Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: A remarkable coordination of genetic, transcriptional, post-translational, and mutational events that lead to a critical role for Type II hexokinase. *J Bioenerg Biomembr* **29**: 339–443, doi:10.1023/A:1022494613613.

Matsuzaki S, Enomoto T, Serada S, Yoshino K, Nagamori S, Morimoto A, Yokoyama T, Kim A, Kimura T, Ueda Y, Fujita M, Fujimoto M, Kanai Y, Kimura T, Naka T (2014) Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A. *Int J Cancer* **134**: 1796–1809, doi:10.1002/ijc.28526.

Maugeri-Saccà M, Vici P, Di Lauro L, Barba M, Amoreo CA, Gallo E, Mottolise M, De Maria R (2014) Cancer stem cells: are they responsible for treatment failure? *Future Oncol* **10**: 2033–2044, doi:10.2217/fon.14.126.

McConechy MK, Ding J, Cheang MCU, Wiegand KC, Senz J, Tone AA, Yang W, Prentice LM, Tse K, Zeng T, McDonald H, Schmidt AP, Mutch DG, McAlpine JN, Hirst M, Shah SP, Lee CH, Goodfellow PJ, Gilks CB, Huntsman DG (2012) Use of mutation profiles to refine the classification of endometrial carcinomas. *J Pathol* **228**: 20–30, doi:10.1002/path.4056.

Mertens K, Mees G, Lambert B, Van de Wiele C, Goethals I (2012) FJFluoro-D-Glucose Uptake: Practical Considerations. *Cancer Biother Radiopharm* **27**: 183–188, doi:10.1089/cbr.2011.1125.

Miao Q, Bi LL, Li X, Miao S, Zhang J, Zhang S, Yang Q, Xie YH, Zhang J, Wang SW (2013) Anticancer effects of bufalin on human hepatocellular carcinoma HepG2 Cells: Roles of apoptosis and autophagy. *Int J Mol Sci* **14**: 1370–1382, doi:10.3390/ijms14011370.

Mirantes C, Espinosa I, Ferrer I, Dolcet X, Prat J, Matias-Guiu X (2013) Epithelial-to-mesenchymal transition and stem cells in endometrial cancer. *Hum Pathol* **44**: 1973–1981, doi:10.1016/j.humpath.2013.04.009.

Mizrak D, Brittan M, Alison MR (2008) CD133: molecule of the moment. *J Pathol* **214**: 3–9, doi:10.1002/path.2283.

Monge M, Colas E, Doll A, Gil-Moreno A, Castellvi J, Diaz B, Gonzalez M, Lopez-Lopez R, Xercavins J, Carreras R, Alameda F, Canals F, Gabrielli F, Reventos J, Abal M (2009) Proteomic approach to ETV5 during endometrial carcinoma invasion reveals a link to oxidative stress. *Carcinogenesis* **30**: 1288–1297, doi:10.1093/carcin/bgp119.

Montejo M, Werner TL, Gaffney D (2009) Current challenges in clinical management of endometrial cancer. *Adv Drug Deliv Rev* **61**: 883–889, doi:10.1016/j.addr.2009.04.014.

Moreb JS, Ucar D, Han S, Amory JK, Goldstein AS, Ostmark B, Chang LJ (2012) The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance. *Chem Biol Interact* **195**: 52–60, doi:10.1016/j.cbi.2011.10.007.

Morel A-P, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A (2008) Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* **3**: e2888, doi:10.1371/journal.pone.0002888.

Morelli SS, Rameshwar P, Goldsmith LT (2013) Experimental evidence for bone marrow as a source of nonhematopoietic endometrial stromal and epithelial compartment cells in a murine model. *Biol Reprod* **89**: 7, doi:10.1095/biolreprod.113.107987 [pii]r10.1095/biolreprod.113.107987.

Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sarrió D, Sánchez C, Cassia R, Prat J, Herman JG, Esteller M, Matías-Guiu X, Palacios J (2003) Abnormalities of E- and P-cadherin and catenin (beta-, gamma-catenin, and p120ctn) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia. *J Pathol* **199**: 471–478, doi:10.1002/path.1310.

Morfouace M, Lalier L, Bahut M, Bonnain V, Naveilhan P, Guette C, Oliver L, Gueguen N, Reynier P, Vallette FM (2012) Comparison of Spheroids Formed by Rat Glioma Stem Cells and Neural Stem Cells Reveals Differences in Glucose Metabolism and Promising Therapeutic Applications. *J Biol Chem* **287**: 33664–33674, doi:10.1074/jbc.M111.320028.

Morneau M, Foster W, Lalancette M, Van Nguyen-Huynh T, Renaud MC, Samouëlian V, Letarte N, Almanric K, Boily G, Bouchard P, Boulanger J, Courmoyer G, Couture F, Gervais N, Goulet S, Guay MP, Kavanagh M, Lemieux J, Lespérance B, Ouellet JF, Pineau G, Rajan R, Roy I, Samson B, Sidéris L, Vincent F (2013) Adjuvant treatment for endometrial cancer: Literature review and recommendations by the Comité de l'évolution des pratiques en oncologie (CEPO). *Gynecol Oncol* **131**: 231–240, doi:10.1016/j.ygyno.2013.07.084.

Morrison BJ, Steel JC, Morris JC (2012) Sphere Culture of Murine Lung Cancer Cell Lines Are Enriched with Cancer Initiating Cells. *PLoS One* **7**: 1–12, doi:10.1371/journal.pone.0049752.

Mota F (2011) *Compêndio de Ginecologia Oncológica*.

Muggia F, Oliva E (2009) *Uterine cancer screening, diagnosis, and treatment* (New York: Humana press).

Munro SK, Farquhar CM, Mitchell MD, Ponnampalam a. P (2010) Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* **16**: 297–310, doi:10.1093/molehr/gaq010.

Murali R, Soslow R a, Weigelt B (2014) Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *Lancet Oncol* **15**: e268–e278, doi:10.1016/S1470-2045(13)70591-6.

Mutter GL (2000) Endometrial intraepithelial neoplasia (EIN): will it bring order to chaos? The Endometrial Collaborative Group. *Gynecol Oncol* **76**: 287–290, doi:10.1006/gyno.1999.5580.

Mutter GL, Zaino RJ, Baak JPA, Bentley RC, Robboy SJ (2007) Benign endometrial hyperplasia sequence and endometrial intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* **26**: 103–114, doi:10.1097/PGP.0b013e31802e4696.

Nakamura M, Kyo S, Zhang B, Zhang X, Mizumoto Y, Takakura M, Maida Y, Mori N, Hashimoto M, Ohno S, Inoue M (2010) Prognostic impact of CD133 expression as a tumor-initiating cell marker in endometrial cancer. *Hum Pathol* **41**: 1516–1529, doi:10.1016/j.humpath.2010.05.006.

Nelson G, Randall M, Sutton G, Moore D, Hurteau J, Look K (1999) FIGO stage IIIC endometrial carcinoma with metastases confined to pelvic lymph nodes: analysis of treatment outcomes, prognostic variables, and failure patterns following adjuvant radiation therapy. *Gynecol Oncol* **75**: 211–214, doi:10.1097/00006254-200003000-00018.

Nesterenko I, Wannigen S, Bagci-Onder T, Anderegg M, Shah K (2012) Evaluating the Effect of Therapeutic Stem Cells on TRAIL Resistant and Sensitive Medulloblastomas. *PLoS One* **7**: 1–9, doi:10.1371/journal.pone.0049219.

Network CGAR, Institute G sequencing centres: B, Getz G, Gabriel SB, Cibulskis K, Lander E, Sivachenko A, Sougnez C, Lawrence M, Louis WU in S, Kandoth C, Dooling D, Fulton R, Fulton L, Kalicki-Veizer J, McLellan MD, O'Laughlin M, Schmidt H, Wilson RK, Ye K, Ding L, Mardis ER, Agency G characterization centres: BCC, Ally A, Balasundaram M, Birol I, Butterfield YSN,

Carlsen R, Carter C, Chu A, Chuah E, Chun H-JE, Dhalla N, Guin R, Hirst C, Holt RA, Jones SJM, Lee D, Li HI, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall AJ, Plettner P, Schein JE, Sipahimalani P, Tam A, Varhol RJ, Robertson AG, Institute B, Cherniack AD, Pashtan I, Saksena G, Onofrio RC, Schumacher SE, Tabak B, Carter SL, Hernandez B, Gentry J, Salvesen HB, Ardlie K, Winckler W, Beroukhi R, Meyerson M, Center HMS& WHAC, Hadjipanayis A, Lee S, Mahadeshwar HS, Park P, Protopopov A, Ren X, Seth S, Song X, Tang J, Xi R, Yang L, Zeng D, Kucherlapati R, Chin L, Zhang J, Carolina U of N, Auman JT, Balu S, Bodenheimer T, Buda E, Hayes DN, Hoyle AP, Jefferys SR, Jones CD, Meng S, Mieczkowski PA, Mose LE, Parker JS, Perou CM, Roach J, Shi Y, Simons J V, Soloway MG, Tan D, Topal MD, Waring S, Wu J, Hoadley KA, Hopkins U of SC& J, Baylin SB, Bootwalla MS, Lai PH, Triche TJ, Van Den Berg DJ, Weisenberger DJ, Laird PW, Shen H, Institute G data analysis centres: B, Cho J, Dicara D, Frazer S, Heiman D, Jing R, Lin P, Mallard W, Stojanov P, Voet D, Zhang H, Zou L, Noble M, Biology I for S, Reynolds SM, Shmulevich I, Center MS-KC, Aksoy BA, Antipin Y, Ciriello G, Dresdner G, Gao J, Gross B, Jacobsen A, Ladanyi M, Reva B, Sander C, Sinha R, Sumer SO, Taylor BS, Cerami E, Weinhold N, Schultz N, Shen R, University of California SCI, Benz S, Goldstein T, Haussler D, Ng S, Szeto C, Stuart J, Benz CC, Yau C, Center U of TMDAC, Zhang W, Annala M, Broom BM, Casasent TD, Ju Z, Liang H, Liu G, Lu Y, Unruh AK, Wakefield C, Weinstein JN, Zhang N, Liu Y, Broaddus R, Akbani R, Mills GB, Hospital B core resource NC, Adams C, Barr T, Black AD, Bowen J, Deardurff J, Frick J, Gastier-Foster JM, Grossman T, Harper HA, Hart-Kothari M, Hessel C, Hobensack A, Kuck H, Kneile K, Leraas KM, Lichtenberg TM, McAllister C, Pyatt RE, Ramirez NC, Tabler TR, Vanhoose N, White P, Wise L, Zmuda E, Asterand T source sites, Barnabas N, Berry-Green C, Blanc V, Boice L, Button M, Farkas A, Green A, Mackenzie J, Nicholson D, Agency BCC, Kalloger SE, Gilks CB, Center C-SM, Karlan BY, Lester J, Orsulic S, Care C, Borowsky M, Cadungog M, Czerwinski C, Huelsenbeck-Dill L, Iacocca M, Petrelli N, Rabeno B, Witkin G, Cureline, Nemirovich-Danchenko E, Potapova O, Rotin D, University D, Berchuck A, Group GO, Birrer M, Disaia P, Monovich L, Consortium IG, Curley E, Gardner J, Mallery D, Penny R, Clinic M, Dowdy SC, Winterhoff B, Dao L, Gostout B, Meuter A, Teoman A, Dao F, Olvera N, Bogomolny F, Garg K, Soslow RA, Levine DA, Center NNBRCC, Abramov M, Bank OT, Bartlett JMS, Kodeeswaran S, Parfitt J, University SPA, Moiseenko F, Network UH, Clarke BA, Hawaii U of, Goodman MT, Carney ME, Matsuno RK, Fisher J, Huang M, Rathmell WK, Thorne L, Van Le L, Pittsburgh U of, Dhir R, Edwards R, Elishaev E, Zorn K, Medicine WUS of, Goodfellow PJ, Mutch D, Group D analysis working, Kahn AB, Bell DW, Pollock PM, Wang C, Wheeler DA, Shinbrot E, Centre D coordination, Ayala B, Chu AL, Jensen MA, Kothiyal P, Pihl TD, Pontius J, Pot DA, Snyder EE, Srinivasan D, Institute P team: NC, Shaw KRM, Sheth M, Davidsen T, Ferguson GEML, Demchok JA, Yang L, Institute NHGR, Guyer MS, Ozenberger BA, Sofia HJ, Committee W (2013) Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* **497**: 67–73, doi:10.1038/nature12113.

Nguyen HN, Sevin BU, Averette HE, Perras J, Donato D, Penalver M (1991) Comparative evaluation of single and combination chemotherapy in uterine cancer cell lines. *Gynecol Oncol* **42**: 227–232, doi:10.1016/0090-8258(91)90350-E.

Nicolay NH, Lopez Perez R, Saffrich R, Huber PE (2015) Radio-resistant mesenchymal stem cells: mechanisms of resistance and potential implications for the clinic. *Oncotarget* **6**: 19366–19380.

Nieto-Estévez V, Pignatelli J, Araúzo-Bravo MJ, Hurtado-Chong A, Vicario-Abejón C (2013) A Global Transcriptome Analysis Reveals Molecular Hallmarks of Neural Stem Cell Death, Survival, and Differentiation in Response to Partial FGF-2 and EGF Deprivation. *PLoS One* **8**: doi:10.1371/journal.pone.0053594.

Niikura H, Kaiho-Sakuma M, Tokunaga H, Toyoshima M, Utsunomiya H, Nagase S, Takano T, Watanabe M, Ito K, Yaegashi N (2013) Tracer injection sites and combinations for sentinel lymph node detection in patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol* **131**: 299–303, doi:10.1016/j.ygyno.2013.08.018.

Ning Y, Li Q, Ren K, Quan M, Cao J (2014) 7-difluoromethoxy-5,4'-di-n-octyl genistein inhibits ovarian cancer stem cell characteristics through the downregulation of FOXM1. *Oncol Lett* **295**–300, doi:10.3892/ol.2014.2080.

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**: 106–110, doi:10.1038/nature05372.

Oikawa F, Kojima-Aikawa K, Inoue F, Suzuki A, Tanaka K, Tominaga E, Aoki D (2013) HMMC-1, a human monoclonal antibody to fucosylated core I O-glycan, suppresses growth of uterine endometrial cancer cells. *Cancer Sci* **104**: 62–69, doi:10.1111/cas.12038.

Olive PL, Banáth JP (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* **1**: 23–29,

doi:10.1038/nprot.2006.5.

Onda T, Yoshikawa H, Mizutani K, Mishima M, Yokota H, Nagano H, Ozaki Y, Murakami A, Ueda K, Taketani Y (1997) Treatment of node-positive endometrial cancer with complete node dissection, chemotherapy and radiation therapy. *Br J Cancer* **75**: 1836–1841.

Ong L-C, Jin Y, Song I-C, Yu S, Zhang K, Chow PKH (2008) 2-[<sup>18</sup>F]-2-deoxy-D-glucose (FDG) uptake in human tumor cells is related to the expression of GLUT-1 and hexokinase II. *Acta radiol* **49**: 1145–1153, doi:10.1080/02841850802482486.

Osol G, Moore LG (2014) Maternal Uterine Vascular Remodeling During Pregnancy. *Microcirculation* **21**: 38–47, doi:10.1111/micc.12080.

Oza AM, Eisenhauer EA, Elit L, Cutz JC, Sakurada A, Tsao MS, Hoskins PJ, Biagi J, Ghatage P, Mazurka J, Provencher D, Dore N, Dancy J, Fyles A (2008) Phase II study of erlotinib in recurrent or metastatic endometrial cancer: NCIC IND-148. *J Clin Oncol* **26**: 4319–4325, doi:10.1200/JCO.2007.15.8808.

Oza AM, Elit L, Tsao M-S, Kamel-Reid S, Biagi J, Provencher DM, Gotlieb WH, Hoskins PJ, Ghatage P, Tonkin KS, Mackay HJ, Mazurka J, Sederis J, Ivy P, Dancy JE, Eisenhauer EA (2011) Phase II Study of Temsirolimus in Women With Recurrent or Metastatic Endometrial Cancer: A Trial of the NCIC Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* **29**: 3278–3285, doi:10.1200/JCO.2010.34.1578.

Palomba S, Falbo A, Russo T, Zullo F (2009) Updating of a recent meta-analysis of randomized controlled trials to assess the safety and the efficacy of the laparoscopic surgery for treating early stage endometrial cancer. *Gynecol Oncol* **114**: 135–136, doi:10.1016/j.ygyno.2009.03.025.

Palorini R, Votta G, Balestrieri C, Monestiroli A, Olivieri S, Vento R, Chiaradonna F (2014) Energy metabolism characterization of a novel cancer stem cell-like line 3AB-OS. *J Cell Biochem* **115**: 368–379, doi:10.1002/jcb.24671.

Pandey V, Jung Y, Kang J, Steiner M, Qian P-X, Banerjee A, Mitchell MD, Wu Z-S, Zhu T, Liu D-X, Lobie PE (2010) Artemin Reduces Sensitivity to Doxorubicin and Paclitaxel in Endometrial Carcinoma Cells through Specific Regulation of CD24. *Transl Oncol* **3**: 218–229, doi:http://dx.doi.org/10.1593/tlo.09325.

Panici PB, Basile S, Maneschi F, Lissoni AA, Signorelli M, Scambia G, Angioli R, Tateo S, Mangili G, Katsaros D, Garozzo G, Campagnutta E, Donadello N, Greggi S, Melpignano M, Raspagliesi F, Ragni N, Cormio G, Grassi R, Franchi M, Giannarelli D, Fossati R, Torri V, Amoroso M, Crocè C, Mangioni C (2008) Systematic pelvic lymphadenectomy vs no lymphadenectomy in early-stage endometrial carcinoma: Randomized clinical trial. *J Natl Cancer Inst* **100**: 1707–1716, doi:10.1093/jnci/djn397.

Park I-H, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ (2008a) Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* **451**: 141–146, doi:10.1038/nature06534.

Park J-Y, Kim EN, Kim D-Y, Suh D-S, Kim J-H, Kim Y-M, Kim Y-T, Nam J-H (2008b) Comparison of the validity of magnetic resonance imaging and positron emission tomography/computed tomography in the preoperative evaluation of patients with uterine corpus cancer. *Gynecol Oncol* **108**: 486–492, doi:10.1016/j.ygyno.2007.11.044.

Park S-S, Park S-K, Lim J-H, Choi YH, Kim W-J, Moon S-K (2011) Esculetin inhibits cell proliferation through the Ras/ERK1/2 pathway in human colon cancer cells. *Oncol Rep* **25**: 223–230, doi:10.3892/or.

Parslov M, Lidgaard O, Klinton S, Pedersen B, Jønsson L, Eriksen PS, Ottesen B (2000) Risk factors among young women with endometrial cancer: a Danish case-control study. *Am J Obstet Gynecol* **182**: 23–29.

Pastò A, Bellio C, Pilotto G, Ciminale V, Silic-Benussi M, Guzzo G, Rasola A, Frasson C, Nardo G, Zulato E, Nicoletto MO, Manicone M, Indraccolo S, Amadori A (2014) Cancer stem cells from epithelial ovarian cancer patients privilege oxidative phosphorylation, and resist glucose deprivation. *Oncotarget* **5**:

Pathmanathan N, Balleine RL (2013) Ki67 and proliferation in breast cancer. *J Clin Pathol* **66**: 512–516, doi:10.1136/jclinpath-2012-201085.

Paul H. L. J. Dijkhuizen F, Mol BWJ, Brilman HAM, Peter M Heintz A (2000) The accuracy of endometrial sampling in the

diagnosis of patients with endometrial carcinoma and hyperplasia: A meta-analysis. *Cancer* **89**: 1765–1772, doi:10.1002/1097-0142(20001015)89:8<1765::AID-CNCR17>3.0.CO;2-F.

Pawinski A, Tumolo S, Hoesel G, Cervantes A, Van Oosterom AT, Hocht Boes G, Pecorelli S (1999) Cyclophosphamide or ifosfamide in patients with advanced and/or recurrent endometrial carcinoma: A randomized phase II study of the EORTC Gynecological Cancer Cooperative Group. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **86**: 179–183, doi:10.1016/S0301-2115(99)00066-4.

Pedrola N, Devis L, Llauradó M, Campoy I, Martínez-García E, García M, Muínelo-Romay L, Alonso-Alconada L, Abal M, Alameda F, Mancebo G, Carreras R, Castellví J, Cabrera S, Gil-Moreno A, Matias-Guiu X, Iovanna JL, Colas E, Reventós J, Ruiz A (2015) Nidogen 1 and Nuclear Protein 1: novel targets of ETV5 transcription factor involved in endometrial cancer invasion. *Clin Exp Metastasis* **32**: 467–478, doi:10.1007/s10585-015-9720-7.

Pereira SL, Ramalho-Santos J, Branco AF, Sardão VA, Oliveira PJ, Carvalho RA (2011) Metabolic remodeling during H9c2 myoblast differentiation: Relevance for in vitro toxicity studies. *Cardiovasc Toxicol* **11**: 180–190, doi:10.1007/s12012-011-9112-4.

Pfeiffer RM, Mitani A, Landgren O, Ekblom A, Kristinsson SY, Björkholm M, Biggar RJ, Brinton LA (2009) Timing of births and endometrial cancer risk in Swedish women. *Cancer Causes Control* **20**: 1441–1449, doi:10.1007/s10552-009-9370-7.

Pham P V, Phan NL, Nguyen NT, Truong NH, Duong TT, Le D V, Truong KD, Phan NK (2011) Differentiation of breast cancer stem cells by knockdown of CD44: promising differentiation therapy. *J Transl Med* **9**: 209, doi:10.1186/1479-5876-9-209.

Piccirillo SGM, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, Brem H, Olivi A, Dimeco F, Vescovi AL (2006) Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* **444**: 761–765, doi:10.1038/nature05349.

Pike MC, Peters RK, Cozen W, Probst-Hensch NM, Wan PC, Mack TM, Felix JC (1997) Estrogen-Progestin Replacement Therapy and Endometrial Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* **89**: 1110–1116, doi:10.1093/jnci/89.15.1110.

Pillozzi S, Fortunato A, De Lorenzo E, Borrani E, Giachi M, Scarselli G, Arcangeli A, Noci I (2013) Over-Expression of the LH Receptor Increases Distant Metastases in an Endometrial Cancer Mouse Model. *Front Oncol* **3**: 285, doi:10.3389/fonc.2013.00285.

Piper M. Treuting SMD (2012) *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas* (London, UK).

Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG (2005) Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* **65**: 5506–5511, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0626.

Portugal J, Mansilla S, Bataller M (2010) Mechanisms of drug-induced mitotic catastrophe in cancer cells. *Curr Pharm Des* **16**: 69–78, doi:10.2174/138161210789941801.

Prasetyanti PR, Zimmerlin C, De Sousa E Melo F, Medema JP (2013) Isolation and propagation of colon cancer stem cells. *Methods Mol Biol* **1035**: 247–259, doi:10.1007/978-1-62703-508-8\_21.

Pruschy M (2009) Cell death pathways - in response to rt. 409–421.

Rahadiani N, Ikeda J, Mamat S, Matsuzaki S, Ueda Y, Umehara R, Tian T, Wang Y, Enomoto T, Kimura T, Aozasa K, Morii E (2011) Expression of aldehyde dehydrogenase I (ALDH1) in endometrioid adenocarcinoma and its clinical implications. *Cancer Sci* **102**: 903–908, doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01864.x.

Randall ME, Filiaci VL, Muss H, Spirtos NM, Mannel RS, Fowler J, Thigpen JT, Benda JA, Mackey D (2006) Randomized phase III trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in advanced endometrial carcinoma: A gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* **24**: 36–44, doi:10.1200/JCO.2004.00.7617.

Revet I, Feeney L, Bruguera S, Wilson W, Dong TK, Oh DH, Dankort D, Cleaver JE (2011) Functional relevance of the histone gammaH2Ax in the response to DNA damaging agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 8663–8667, doi:10.1073/pnas.1105866108.

Reynolds B a, Weiss S (1996) Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* **175**: 1–13, doi:10.1006/dbio.1996.0090.

- Ricci MS, Toscano DG, Mattingly CJ, Toscano W a. (1999) Estrogen receptor reduces CYP1A1 induction in cultured human endometrial cells. *J Biol Chem* **274**: 3430–3438, doi:10.1074/jbc.274.6.3430.
- Rivlin N, Koifman G, Rotter V (2014) P53 Orchestrates Between Normal Differentiation and Cancer. *Semin Cancer Biol* **32**: 10–17, doi:10.1016/j.semcancer.2013.12.006.
- Roland PY, Kelly FJ, Kulwicki CY, Blitzer P, Curcio M, Orr JW (2004) The benefits of a gynecologic oncologist: A pattern of care study for endometrial cancer treatment. *Gynecol Oncol* **93**: 125–130, doi:10.1016/j.ygyno.2003.12.018.
- Rosen JM, Jordan CT (2009) The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* **324**: 1670–1673, doi:10.1126/science.1171837.
- Rutella S, Bonanno G, Procoli A, Mariotti A, Corallo M, Prisco MG, Eramo A, Napoletano C, Gallo D, Perillo A, Nuti M, Pierelli L, Testa U, Scambia G, Ferrandina G (2009) Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors. *Clin Cancer Res* **15**: 4299–4311, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1883.
- Rybak AP, He L, Kapoor A, Cutz JC, Tang D (2011) Characterization of sphere-propagating cells with stem-like properties from DU145 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1813**: 683–694, doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.018.
- Rycaj K, Tang DG (2014) Cancer stem cells and radioresistance. *Int J Radiat Biol* **90**: 615–621, doi:10.3109/09553002.2014.892227.
- Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, Kimata J, Kinumi T, Yoshida Y, Noguchi N, Niki E (2006) Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Res* **40**: 619–630, doi:10.1080/10715760600632552.
- Salamonsen LA (2003) Tissue injury and repair in the female human reproductive tract. *Reproduction* **125**: 301–311, doi:10.1530/rep.0.1250301.
- Salvesen HB, Haldorsen IS, Trovik J (2012) Markers for individualised therapy in endometrial carcinoma. *Lancet Oncol* **13**: e353–e361, doi:10.1016/S1470-2045(12)70213-9.
- Samineni S, Glackin C, Shively JE (2011) Role of CEACAM1, ECM, and mesenchymal stem cells in an orthotopic model of human breast cancer. *Int J Breast Cancer* **2011**: 381080, doi:10.4061/2011/381080.
- Saunders DE, Christensen C, Wappler NL, Cho YL, Lawrence WD, Malone JM, Malviya VK, Deppe G (1993) Additive inhibition of RL95-2 endometrial carcinoma cell growth by carboplatin and 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Gynecol Oncol* **51**: 155–159, doi:10.1006/gy.1993.1264.
- Scherl A (2015) Clinical protein mass spectrometry. *Methods* doi:10.1016/j.ymeth.2015.02.015.
- Schieber MS, Chandel NS (2013) ROS links glucose metabolism to breast cancer stem cell and emt phenotype. *Cancer Cell* **23**: 265–267, doi:10.1016/j.ccr.2013.02.021.
- Schillace R V, Skinner AM, Pommier RF, O'Neill S, Muller PJ, Naik AM, Hansen JE, Pommier SJ (2014) Estrogen receptor, progesterone receptor, interleukin-6 and interleukin-8 are variable in breast cancer and benign stem/progenitor cell populations. *BMC Cancer* **14**: 733, doi:10.1186/1471-2407-14-733.
- Schlosshauer PW, Ellenson LH, Soslow RA (2002) Beta-catenin and E-cadherin expression patterns in high-grade endometrial carcinoma are associated with histological subtype. *Mod Pathol* **15**: 1032–1037, doi:10.1097/01.MP.0000028573.34289.04.
- Schrauwen S, Coenegrachts L, Depreuw J, Luyten C, Verbist G, Debruyne D, Vergote I, Lambrechts D, Amant F (2015) Microsatellite instable and microsatellite stable primary endometrial carcinoma cells and their subcutaneous and orthotopic xenografts recapitulate the characteristics of the corresponding primary tumor. *Int J Gynecol Cancer* **25**: 363–371, doi:10.1097/IGC.0000000000000363.
- Semczuk A, Schneider-Stock R, Szewczuk W (2010) Prevalence of allelic loss at TP53 in endometrial carcinomas. *Oncology* **78**: 220–228, doi:10.1159/000314353.
- Setiawan VW, Yang HP, Pike MC, McCann SE, Yu H, Xiang YB, Wolk A, Wentzensen N, Weiss NS, Webb PM, van den Brandt

P a., van de Vijver K, Thompson PJ, Australian National Endometrial Cancer Study Group, Strom BL, Spurdle AB, Soslow R a., Shu XO, Schairer C, Sacerdote C, Rohan TE, Robien K, Risch H a., Ricceri F, Rebbeck TR, Rastogi R, Prescott J, Polidoro S, Park Y, Olson SH, Moysich KB, Miller AB, McCullough ML, Matsuno RK, Magliocco AM, Lurie G, Lu L, Lissowska J, Liang X, Lacey J V., Kolonel LN, Henderson BE, Hankinson SE, Håkansson N, Goodman MT, Gaudet MM, Garcia-Closas M, Friedenreich CM, Freudenheim JL, Doherty J, De Vivo I, Courneya KS, Cook LS, Chen C, Cerhan JR, Cai H, Brinton L a., Bernstein L, Anderson KE, Anton-Culver H, Schouten LJ, Horn-Ross PL (2013) Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? *J Clin Oncol* **31**: 2607–2618, doi:10.1200/JCO.2012.48.2596.

Shen Y-A, Wang C-Y, Hsieh Y-T, Chen Y-J, Wei Y-H (2015) Metabolic reprogramming orchestrates cancer stem cell properties in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Cycle* **14**: 86–98, doi:10.4161/15384101.2014.974419.

Sherman ME, Sturgeon S, Brinton LA, Potischman N, Kurman RJ, Berman ML, Mortel R, Twiggs LB, Barrett RJ, Wilbanks GD (1997) Risk factors and hormone levels in patients with serous and endometrioid uterine carcinomas. *Mod Pathol* **10**: 963–968.

Sherry AD, Jeffrey FMH, Malloy CR (2004) Analytical solutions for <sup>13</sup>C isotopomer analysis of complex metabolic conditions: Substrate oxidation, multiple pyruvate cycles, and gluconeogenesis. *Metab Eng* **6**: 12–24, doi:10.1016/j.ymben.2003.10.007.

Shetzer Y, Solomon H, Koifman G, Molchadsky A, Horesh S, Rotter V (2014) The paradigm of mutant p53-expressing cancer stem cells and drug resistance. *Carcinogenesis* **35**: 1196–1208, doi:10.1093/carcin/bgu073.

Shibuya K, Okada M, Suzuki S, Seino M (2015) Targeting the facilitative glucose transporter GLUT1 inhibits the self-renewal and tumor-initiating capacity of cancer stem cells. *Oncotarget* **6**: 651–661.

Shih KK, Yun E, Gardner GJ, Barakat RR, Chi DS, Leitao MM (2011) Surgical cytoreduction in stage IV endometrioid endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* **122**: 608–611, doi:10.1016/j.ygyno.2011.05.020.

Silva IA, Bai S, McLean K, Yang K, Griffith K, Thomas D, Ginestier C, Johnston C, Kueck A, Reynolds RK, Wicha MS, Buckanovich RJ (2011) Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival. *Cancer Res* **71**: 3991–4001, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3175.

Singh M, Darcy KM, Brady WE, Clubwala R, Weber Z, Rittenbach J V., Akalin A, Whitney CW, Zaino R, Ramirez NC, Leslie KK (2011) Cadherins, catenins and cell cycle regulators: Impact on survival in a Gynecologic Oncology Group phase II endometrial cancer trial. *Gynecol Oncol* **123**: 320–328, doi:10.1016/j.ygyno.2011.07.005.

Singh S, Brocker C, Koppaka V, Chen Y, Jackson BC, Matsumoto A, Thompson DC, Vasiliou V (2013) Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radic Biol Med* **56**: 89–101, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.010.

Singh S, Trevino JG, Bora-Singhal N, Coppola D, Haura E, Altiok S, Chellappan SP (2012) EGFR/Src/Akt signaling modulates Sox2 expression and self-renewal of stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* **11**: 73, doi:10.1186/1476-4598-11-73.

Singh SK (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**: 5821–5828.

Skidan I, Steinger S (2014) Review article in vivo models for cancer stem cells research: a clinical guide. *J Physiol Pharmacol* **65**: 157–169.

Skvortsov S, Debbage P, Cho WCS, Lukas P, Skvortsova I (2014) Putative biomarkers and therapeutic targets associated with radiation resistance. *Expert Rev Proteomics* **11**: 207–214, doi:10.1586/14789450.2014.893194.

Slomovitz BM, Lu KH, Johnston T, Coleman RL, Munsell M, Broaddus RR, Walker C, Ramondetta LM, Burke TW, Gershenson DM, Wolf J (2010) A phase 2 study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor, everolimus, in patients with recurrent endometrial carcinoma. *Cancer* **116**: 5415–5419, doi:10.1002/cncr.25515.

Smart CE, Morrison BJ, Saunus JM, Vargas AC, Keith P, Reid L, Wockner L, Amiri MA, Sarkar D, Simpson PT, Clarke C, Schmidt CW, Reynolds B a., Lakhani SR, Lopez JA (2013) In Vitro Analysis of Breast Cancer Cell Line Tumourspheres and Primary Human Breast Epithelia Mammospheres Demonstrates Inter- and Intrasphere Heterogeneity. *PLoS One* **8**: doi:10.1371/journal.pone.0064388.



- Smith J a., Brown J, Martin MC, Ramondetta LM, Wolf JK (2004) An in vitro study of the inhibitory activity of gemcitabine and platinum agents in human endometrial carcinoma cell lines. *Gynecol Oncol* **92**: 314–319, doi:10.1016/j.ygyno.2003.09.037.
- Smith T a D (2010) Influence of chemoresistance and p53 status on fluoro-2-deoxy-d-glucose incorporation in cancer. *Nucl Med Biol* **37**: 51–55, doi:10.1016/j.nucmedbio.2009.08.007.
- Smith T a D, Sharma RI, Thompson AM, Paulin FEM (2006) Tumor 18F-FDG incorporation is enhanced by attenuation of P53 function in breast cancer cells in vitro. *J Nucl Med* **47**: 1525–1530.
- Smith-Bindman R, Kerlikowske K, Feldstein VA, Subak L, Scheidler J, Segal M, Brand R, Grady D (1998) Endovaginal ultrasound to exclude endometrial cancer and other endometrial abnormalities. *JAMA* **280**: 1510–1517, doi:10.1001/jama.280.17.1510.
- Sodergard R, Backstrom T, Shanbhag V, Carstensen H (1982) Calculation of free and bound fractions of testosterone and estradiol-17?? to human plasma proteins at body temperature. *J Steroid Biochem* **16**: 801–810, doi:10.1016/0022-4731(82)90038-3.
- Solima E, Martinelli F, Ditto A, MacCauro M, Carcangiu M, Mariani L, Kusamura S, Fontanelli R, Grijuela B, Raspagliesi F (2012) Diagnostic accuracy of sentinel node in endometrial cancer by using hysteroscopic injection of radiolabeled tracer. *Gynecol Oncol* **126**: 419–423, doi:10.1016/j.ygyno.2012.05.025.
- Soliman PT, Wu D, Tortolero-Luna G, Schmeler KM, Slomovitz BM, Bray MS, Gershenson DM, Lu KH (2006) Association between adiponectin, insulin resistance, and endometrial cancer. *Cancer* **106**: 2376–2381, doi:10.1002/cncr.21866.
- Sood AK, Buller RE, Burger RA, Dawson JD, Sorosky JI, Berman M (1997) Value of preoperative CA 125 level in the management of uterine cancer and prediction of clinical outcome. *Obstet Gynecol* **90**: 441–447, doi:10.1016/S0029-7844(97)00286-X.
- Sorosky JI (2012) Endometrial Cancer. *Obstet Gynecol* **120**: 383–397, doi:10.1097/AOG.0b013e3182605bfl.
- Sovak MA, Hensley ML, Dupont J, Ishill N, Alektiar KM, Abu-Rustum N, Barakat R, Chi DS, Sabbatini P, Spriggs DR, Aghajanian C (2006) Paclitaxel and carboplatin in the adjuvant treatment of patients with high-risk stage III and IV endometrial cancer: A retrospective study. *Gynecol Oncol* **103**: 451–457, doi:10.1016/j.ygyno.2006.03.019.
- Stacey GN (2011) Cancer Cell Culture. *Methods Mol Biol* **731**: 79–91, doi:10.1007/978-1-61779-080-5.
- von Stechow L, Ruiz-Aracama A, van de Water B, Peijnenburg A, Danen E, Lommen A (2013) Identification of Cisplatin-Regulated Metabolic Pathways in Pluripotent Stem Cells. *PLoS One* **8**: doi:10.1371/journal.pone.0076476.
- Stewart CJR, Crook ML, Doherty D a. (2010) Micro-anatomical variation in cellular proliferation in endometrial adenocarcinoma, and inverse correlation between Ki67 and cytokeratin 7 expression. *Histopathology* **57**: 46–54, doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03588.x.
- Stoian SC, Simionescu C, Mărgăritescu C, Stepan a., Nurciu M (2011) Endometrial carcinomas: Correlation between ER, PR, Ki67 status and histopathological prognostic parameters. *Rom J Morphol Embryol* **52**: 631–636.
- Straughn JM, Huh WK, Orr JW, Kelly FJ, Roland PY, Gold MA, Powell M, Mutch DG, Partridge EE, Kilgore LC, Barnes MN, Austin JM, Alvarez RD (2003) Stage IC adenocarcinoma of the endometrium: Survival comparisons of surgically staged patients with and without adjuvant radiation therapy. In *Gynecologic Oncology*, pp. 295–300.
- Su Y, Qiu Q, Zhang X, Jiang Z, Leng Q, Liu Z, Stass SA, Jiang F (2010) Aldehyde dehydrogenase I A1-positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**: 327–337, doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0865.
- Susumu N, Sagae S, Udagawa Y, Niwa K, Kuramoto H, Satoh S, Kudo R (2008) Randomized phase III trial of pelvic radiotherapy versus cisplatin-based combined chemotherapy in patients with intermediate- and high-risk endometrial cancer: A Japanese Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* **108**: 226–233, doi:10.1016/j.ygyno.2007.09.029.
- Sutton G, Axelrod JH, Bundy BN, Roy T, Homesley HD, Malfetano JH, Mychalczak BR, King ME (2005) Whole abdominal

radiotherapy in the adjuvant treatment of patients with stage III and IV endometrial cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* **97**: 755–763, doi:10.1016/j.ygyno.2005.03.011.

Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP (2011) Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol* **8**: 97–106, doi:10.1038/nrclinonc.2010.196.

Tanaka (2010) Establishment and characterization of monoclonal 5-fluorouracil-resistant cell lines derived from human endometrial adenocarcinoma. *Int J Oncol* **37**: 1261–1269, doi:10.3892/ijo\_00000722.

Tanaka T, Toujima S, Tanaka J (2012) Differential sensitivity to paclitaxel-induced apoptosis and growth suppression in paclitaxel-resistant cell lines established from HEC-1 human endometrial adenocarcinoma cells. *Int J Oncol* **41**: 1837–1844, doi:10.3892/ijo.2012.1600.

Tang DG (2012) Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res* **22**: 457–472, doi:10.1038/cr.2012.13.

Tashiro H, Isacson C, Levine R, Kurman RJ, Cho KR, Hedrick L (1997) p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol* **150**: 177–185.

Tate Thigpen J, Brady MF, Homesley HD, Malfetano J, Dubeshter B, Burger R a., Liao S, Mackey D (2004) Phase III trial of doxorubicin with or without cisplatin in advanced endometrial carcinoma: A gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* **22**: 3902–3908, doi:10.1200/JCO.2004.02.088.

Taylor HS (2004) Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA* **292**: 81–85, doi:10.1001/jama.292.1.81.

Terauchi T, Murano T, Daisaki H, Kanou D, Shoda H, Kakinuma R, Hamashima C, Moriyama N, Kakizoe T (2008) Evaluation of whole-body cancer screening using 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose positron emission tomography: a preliminary report. *Ann Nucl Med* **22**: 379–385, doi:10.1007/s12149-008-0130-7.

Timmermans A, Opmeer BC, Khan KS, Bachmann LM, Epstein E, Clark TJ, Gupta JK, Bakour SH, van den Bosch T, van Doorn HC, Cameron ST, Giusa MG, Dessole S, Dijkhuizen FPHLJ, Ter Riet G, Mol BWJ (2010) Endometrial thickness measurement for detecting endometrial cancer in women with postmenopausal bleeding: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* **116**: 160–167, doi:10.1097/AOG.0b013e3181e3e7e8.

Tirino V, Camerlingo R, Franco R, Malanga D, La Rocca A, Viglietto G, Rocco G, Pirozzi G (2009) The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardio-thoracic Surg* **36**: 446–453, doi:10.1016/j.ejcts.2009.03.063.

Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, La Noce M, Laino L, De Francesco F, Papaccio G (2013) Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J* **27**: 13–24, doi:10.1096/fj.12-218222.

Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, Tripodo C, Russo A, Gulotta G, Medema JP, Stassi G (2007) Colon Cancer Stem Cells Dictate Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4. *Cell Stem Cell* **1**: 389–402, doi:10.1016/j.stem.2007.08.001.

Todaro M, Iovino F, Eterno V, Cammareri P, Gambaro G, Espina V, Gulotta G, Dieli F, Giordano S, De Maria R, Stassi G (2010) Tumorigenic and metastatic activity of human thyroid cancer stem cells. *Cancer Res* **70**: 8874–8885, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1994.

Tomiyasu S, Miyamoto T, Mori M, Yaguchi T, Yakushiji H, Ohno S, Miyake Y, Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E (2014) Isolation of side population cells from endometrial cancer cells using a violet laser diode. *Hum Cell* **27**: 36–42, doi:10.1007/s13577-013-0079-2.

Tonigold M, Rossmann A, Meinold M, Bette M, Märken M, Henkenius K, Bretz AC, Giel G, Cai C, Rodepeter FR, Beneš V, Grénman R, Carey TE, Lage H, Stiewe T, Neubauer A, Werner J a., Brendel C, Mandic R (2014) A cisplatin-resistant head and neck cancer cell line with cytoplasmic p53mut exhibits ATP-binding cassette transporter upregulation and high glutathione levels.

*J Cancer Res Clin Oncol* doi:10.1007/s00432-014-1727-y.

Trachootham D, Alexandre J, Huang P (2009) Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* **8**: 579–591, doi:10.1038/nrd2803.

Trautmann F, Cojoc M, Kurth I, Melin N, Bouchez LC, Dubrovskaya A, Peitzsch C (2014) CXCR4 as biomarker for radioresistant cancer stem cells. *Int J Radiat Biol* **90**: 687–699, doi:10.3109/09553002.2014.906766.

Trimble CL, Kauderer J, Zaino R, Silverberg S, Lim PC, Burke JJ, Alberts D, Curtin J, Mackey D (2006) Concurrent endometrial carcinoma in women with a biopsy diagnosis of atypical endometrial hyperplasia: A gynecologic oncology group study. *Cancer* **106**: 812–819, doi:10.1002/cncr.21650.

Tysnes BB (2010) Tumor-initiating and -propagating cells: cells that we would like to identify and control. *Neoplasia* **12**: 506–515, doi:10.1593/neo.10290.

Umene K, Banno K, Kisu I, Yanokura M, Nogami Y, Tsuji K, Masuda K, Ueki A, Kobayashi Y, Yamagami W, Tominaga E, Susumu N, Aoki D (2013) New candidate therapeutic agents for endometrial cancer: Potential for clinical practice (Review). *Oncol Rep* **29**: 855–860, doi:10.3892/or.2013.2221.

Vaidya AP, Littell R, Krasner C, Duska LR (2006) Treatment of uterine papillary serous carcinoma with platinum-based chemotherapy and paclitaxel. *Int J Gynecol Cancer* **16 Suppl 1**: 267–272.

Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW (2009) Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics* **3**: 281–290, doi:10.1186/1479-7364-3-3-281.

Vejpongsa P, Yeh ETH (2014) Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *J Am Coll Cardiol* **64**: 938–945, doi:10.1016/j.jacc.2014.06.1167.

Visvader JE, Lindeman GJ (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* **8**: 755–768, doi:10.1038/nrc2499.

Vlasi E, Lagadec C, Vergnes L, Matsutani T, Masui K, Poulou M, Popescu R, Della Donna L, Evers P, Dekmezian C, Reue K, Christofk H, Mischel PS, Pajonk F (2011) Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 16062–16067, doi:10.1073/pnas.1106704108.

Vlasi E, Lagadec C, Vergnes L, Reue K, Frohnen P, Chan M, Alhiyari Y, Dratver MB, Pajonk F (2014) Metabolic differences in breast cancer stem cells and differentiated progeny. *Breast Cancer Res Treat* **145**: 525–534, doi:10.1007/s10549-014-3051-2.

Vollmer G (2003) Endometrial cancer: Experimental models useful for studies on molecular aspects of endometrial cancer and carcinogenesis. *Endocr Relat Cancer* **10**: 23–42, doi:10.1677/erc.0.0100023.

Vozza A, Parisi G, De Leonardi F, Lasorsa FM, Castegna A, Amorese D, Marmo R, Calcagnile VM, Palmieri L, Ricquier D, Paradies E, Scarcia P, Palmieri F, Bouillaud F, Fiermonte G (2014) UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 960–965, doi:10.1073/pnas.1317400111.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**: 45–65, doi:10.1038/sj.cdd.4401189.

Walker JL, Piedmonte MR, Spirtos NM, Eisenkop SM, Schlaerth JB, Mannel RS, Spiegel G, Barakat R, Pearl ML, Sharma SK (2009) Laparoscopy compared with laparotomy for comprehensive surgical staging of uterine cancer: Gynecologic Oncology Group Study LAP2. *J Clin Oncol* **27**: 5331–5336, doi:10.1200/JCO.2009.22.3248.

Walter D, Satheesha S, Albrecht P, Bornhauser BC, D'Alessandro V, Oesch SM, Rehrauer H, Leuschner I, Koscielniak E, Gengler C, Moch H, Bernasconi M, Niggli FK, Schäfer BW (2011) CD133 positive embryonal rhabdomyosarcoma stem-like cell population is enriched in rhabdospheres. *PLoS One* **6**: 1–12, doi:10.1371/journal.pone.0019506.

Wan X, Li J, Xie X, Lu W (2007) PTEN augments doxorubicin-induced apoptosis in PTEN-null Ishikawa cells. *Int J Gynecol Cancer* **17**: 808–812, doi:10.1111/j.1525-1438.2007.00890.x.

- Wang H, Zhang Y, Du Y (2013) Ovarian and breast cancer spheres are similar in transcriptomic features and sensitive to fenretinide. *Biomed Res Int* **2013**: doi:10.1155/2013/510905.
- Wang J-L (2014) Radiobiological characteristics of cancer stem cells from esophageal cancer cell lines. *World J Gastroenterol* **20**: 18296, doi:10.3748/wjg.v20.i48.18296.
- Wang L, Guo H, Lin C, Yang L, Wang X (2014) Enrichment and characterization of cancer stem-like cells from a cervical cancer cell line. *Mol Med Rep* **9**: 2117–2123, doi:10.3892/mmr.2014.2063.
- Wang Y, Hanifi-Moghaddam P, Hanekamp EE, Kloosterboer HJ, Franken P, Veldscholte J, Van Doorn HC, Ewing PC, Kim JJ, Grootegoed JA, Burger CW, Fodde R, Blok LJ (2009) Progesterone inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in normal endometrium and endometrial cancer. *Clin Cancer Res* **15**: 5784–5793, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0814.
- Wang Y, van der Zee M, Fodde R, Blok LJ (2010) Wnt/ $\beta$ -catenin and sex hormone signaling in endometrial homeostasis and cancer. *Oncotarget* **1**: 674–684, doi:10.18632/oncotarget.101007.
- de Weger V a, Beijnen JH, Schellens JHM (2014) Cellular and clinical pharmacology of the taxanes docetaxel and paclitaxel - a review. *Anticancer Drugs* **25**: 488–494, doi:10.1097/CAD.000000000000093.
- Weiderpass E, Antoine J, Bray FI, Oh J-K, Arbyn M (2014) Trends in corpus uteri cancer mortality in member states of the European Union. *Eur J Cancer* **50**: 1675–1684, doi:10.1016/j.ejca.2014.02.020.
- Weiswald L-B, Bellet D, Dangles-Marie V (2015) Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia* **17**: 1–15, doi:10.1016/j.neo.2014.12.004.
- Werner HMJ, Salvesen HB (2014) Current status of molecular biomarkers in endometrial cancer. *Curr Oncol Rep* **16**: doi:10.1007/s11912-014-0403-3.
- Westin SN, Broaddus RR (2012) Personalized therapy in endometrial cancer: Challenges and opportunities. *Cancer Biol Ther* **13**: 1–3, doi:10.4161/cbt.13.1.18438.
- Wik E, Ræder MB, Krakstad C, Trovik J, Birkeland E, Hoivik E a., Mjos S, Werner HMJ, Mannelqvist M, Stefansson IM, Oyan AM, Kalland KH, Akslen L a., Salvesen HB (2013) Lack of estrogen receptor- $\alpha$  is associated with epithelial-mesenchymal transition and PI3K alterations in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* **19**: 1094–1105, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3039.
- Wilson H, Huelsmeyer M, Chun R, Young KM, Friedrichs K, Argyle DJ (2008) Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *Vet J* **175**: 69–75, doi:10.1016/j.tvjl.2007.07.025.
- Winkler C, Denker K, Wortelkamp S, Sickmann A (2007) Silver-and Coomassie-staining protocols: Detection limits and compatibility with ESI MS. *Electrophoresis* **28**: 2095–2099, doi:10.1002/elps.200600670.
- Wong SCC, Chan CML, Ma BBY, Lam MYY, Choi GCG, Au TCC, Chan ASK, Chan ATC (2009) Advanced proteomic technologies for cancer biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics* **6**: 123–134, doi:10.1586/epr.09.1.
- Wright JD, Medel NIB, Sehouli J, Fujiwara K, Herzog TJ (2012) Contemporary management of endometrial cancer. *Lancet* **379**: 1352–1360, doi:10.1016/S0140-6736(12)60442-5.
- Wu H, Zhang H, Hu Y, Xia Q, Liu C, Li Y, Yu B, Gu T, Zhang X, Yu X, Kong W (2013a) Sphere Formation Assay is Not an Effective Method for Cancer Stem Cell Derivation and Characterization from the Caco-2 Colorectal Cell Line. *Curr Stem Cell Res Ther* **82**–88.
- Wu JH, Jones NJ (2012) Assessment of DNA Interstrand Crosslinks Using the Modified Alkaline Comet Assay. pp. 165–181.
- Wu LM, Xu JR, Gu HY, Hua J, Haacke EM, Hu J (2013b) Predictive value of T2-weighted imaging and contrast-enhanced MR imaging in assessing myometrial invasion in endometrial cancer: A pooled analysis of prospective studies. *Eur Radiol* **23**: 435–449, doi:10.1007/s00330-012-2609-9.
- Wu S, Wang X, Chen J, Chen Y (2013c) Autophagy of cancer stem cells is involved with chemoresistance of colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **434**: 898–903, doi:10.1016/j.bbrc.2013.04.053.

- Wu Y, Liu S, Xin H, Jiang J, Younglai E, Sun S, Wang H (2011) Up-regulation of microRNA-145 promotes differentiation by repressing OCT4 in human endometrial adenocarcinoma cells. *Cancer* **117**: 3989–3998, doi:10.1002/cncr.25944.
- Xia P, Gou W, Wang J, Niu Z, Chen S, Takano Y, Zheng H (2013) Distinct Radiosensitivity of Lung Carcinoma Stem-Like Side Population and Main Population Cells. *Cancer Biother Radiopharm* **28**: 471–478, doi:10.1089/cbr.2012.1388.
- Yahata H, Hirakawa T, Fujita T, Ariyoshi K, Sonoda K, Amada S, Kobayashi H, Nakano H (2004) Postoperative adjuvant chemotherapy with cisplatin, cyclophosphamide, and anthracycline (doxorubicin, epirubicin, pirarubicin) for endometrial cancer. *Int J Clin Oncol* **9**: 317–321, doi:10.1007/s10147-004-0400-x.
- Yamamoto S, Tsuda H, Aida S, Shimazaki H, Tamai S, Matsubara O (2007) Immunohistochemical detection of hepatocyte nuclear factor 1beta in ovarian and endometrial clear-cell adenocarcinomas and nonneoplastic endometrium. *Hum Pathol* **38**: 1074–1080, doi:10.1016/j.humpath.2006.12.018.
- Yamanaka S (2008) Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. In *Cell Proliferation*, pp. 51–56.
- Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang Y, Jia H, Ye Q, Qin L, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang Z, Wang XW (2010) NIH Public Access. **136**: 1012–1024, doi:10.1053/j.gastro.2008.12.004.EpCAM-positive.
- Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S (2014) Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* **1845**: 84–89, doi:10.1016/j.bbcan.2013.12.002.
- Yang M-H, Hsu DS-S, Wang H-W, Wang H-J, Lan H-Y, Yang W-H, Huang C-H, Kao S-Y, Tzeng C-H, Tai S-K, Chang S-Y, Lee OK-S, Wu K-J (2010) Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* **12**: 982–992, doi:10.1038/ncb2099.
- Yared J a., Tkaczuk KHR (2012) Update on taxane development: New analogs and new formulations. *Drug Des Devel Ther* **6**: 371–384, doi:10.2147/DDDT.S28997.
- Yin B, Ma ZY, Zhou ZW, Gao WC, Du ZG, Zhao ZH, Li QQ (2014) The TrkB+ cancer stem cells contribute to post-chemotherapy recurrence of triple-negative breast cancers in an orthotopic mouse model. *Oncogene* **1**–10, doi:10.1038/onc.2014.8.
- Younis JS, Ezra Y, Sherman Y, Simon A, Schenker JG, Laufer N (1994) The effect of estradiol depletion during the luteal phase on endometrial development.
- Yu SC, Bian XW (2009) Enrichment of cancer stem cells based on heterogeneity of invasiveness. *Stem Cell Rev Reports* **5**: 66–71, doi:10.1007/s12015-008-9047-8.
- Yuan M, Eberhart CG, Kai M (2014) RNA binding protein RBM14 Promotes Radio-resistance in Glioblastoma by Regulating DNA Repair and Cell Differentiation. *Oncotarget* **5**: 1–7.
- Yuan S, Wang F, Chen G, Zhang H, Feng L, Wang L, Colman H, Keating MJ, Li X, Xu R-H, Wang J, Huang P (2013) Effective elimination of cancer stem cells by a novel drug combination strategy. *Stem Cells* **31**: 23–34, doi:10.1002/stem.1273.
- Yusuf N, Inagaki T, Kusunoki S, Okabe H, Yamada I, Matsumoto A, Terao Y, Takeda S, Kato K (2014) SPARC was overexpressed in human endometrial cancer stem-like cells and promoted migration activity. *Gynecol Oncol* **134**: 356–363, doi:10.1016/j.ygyno.2014.04.009.
- Zaino RJ (2014) Unusual patterns of endometrial carcinoma including MELF and its relation to epithelial mesenchymal transition. *Int J Gynecol Pathol* **33**: 357–364, doi:10.1097/PGP.000000000000137.
- Zaino RJ, Kauderer J, Trimble CL, Silverberg SG, Curtin JP, Lim PC, Gallup DG, Mackey D (2006) Reproducibility of the diagnosis of atypical endometrial hyperplasia: A gynecologic oncology group study. *Cancer* **106**: 804–811, doi:10.1002/cncr.21649.
- Zaino RJ, Kurman R, Herbold D, Gliedman J, Bundy BN, Voet R, Advani H (1991) The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. Data from a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* **68**: 2293–2302.

Zannoni GF, Vellone VG, Arena V, Prisco MG, Scambia G, Carbone A, Gallo D (2010) Does high-grade endometrioid carcinoma (grade 3 FIGO) belong to type I or type II endometrial cancer? A clinical-pathological and immunohistochemical study. *Virchows Arch* **457**: 27–34, doi:10.1007/s00428-010-0939-z.

Zanotti KM, Belinson JL, Kennedy AW, Webster KD, Markman M (1999) The use of paclitaxel and platinum-based chemotherapy in uterine papillary serous carcinoma. *Gynecol Oncol* **74**: 272–277, doi:10.1006/gyno.1999.5444\rs0090-8258(99)95444-6 [pii].

Zhang L, Jiao M, Wu K, Li L, Zhu G, Wang X, He D, Wu D (2014) TNF- $\alpha$  induced epithelial mesenchymal transition increases stemness properties in renal cell carcinoma cells. *Int J Clin Exp Med* **7**: 4951–4958.

Zhang WC, Ng SC, Yang H, Rai A, Umashankar S, Ma S, Soh BS, Sun LL, Tai BC, Nga ME, Bhakoo KK, Jayapal SR, Nichane M, Yu Q, Ahmed D a., Tan C, Sing WP, Tam J, Thirugananam A, Noghabi MS, Pang YH, Ang HS, Robson P, Kaldis P, Soo RA, Swarup S, Lim EH, Lim B (2012) Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell* **148**: 259–272, doi:10.1016/j.cell.2011.11.050.

Zhang X-L, Jia Q, Lv L, Deng T, Gao J (2015) Tumorspheres Derived from HCC Cells are Enriched with Cancer Stem Cell-like Cells and Present High Chemoresistance Dependent on the Akt Pathway. *Anticancer Agents Med Chem* **15**: 755–763.

Zhong Y, Guan K, Guo S, Zhou C, Wang D, Ma W, Zhang Y, Li C, Zhang S (2010) Spheres derived from the human SK-RC-42 renal cell carcinoma cell line are enriched in cancer stem cells. *Cancer Lett* **299**: 150–160, doi:10.1016/j.canlet.2010.08.013.

Zhou B, Yang L, Sun Q, Cong R, Gu H, Tang N, Zhu H, Wang B (2008) Cigarette smoking and the risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Am J Med* **121**: 501–508.e3, doi:10.1016/j.amjmed.2008.01.044.

Zhou X, Gao Q, Wang J, Zhang X, Liu K, Duan Z (2014a) Linc-RNA-RoR acts as a ‘sponge’ against mediation of the differentiation of endometrial cancer stem cells by microRNA-145. *Gynecol Oncol* **133**: 333–339, doi:10.1016/j.ygyno.2014.02.033.

Zhou X, Zhang H, Han X (2014b) Role of epithelial to mesenchymal transition proteins in gynecological cancers: pathological and therapeutic perspectives. *Tumor Biol* **35**: 9523–9530, doi:10.1007/s13277-014-2537-1.

Zhou X, Zhou Y-P, Huang G-R, Gong B-L, Yang B, Zhang D-X, Hu P, Xu S-R (2011a) Expression of the stem cell marker, Nanog, in human endometrial adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol* **30**: 262–270, doi:10.1097/PGP.0b013e3182055a1f.

Zhou Y, Jorgensen EM, Gan Y, Taylor HS (2011b) Cigarette smoke increases progesterone receptor and homeobox A10 expression in human endometrium and endometrial cells: a potential role in the decreased prevalence of endometrial pathology in smokers. *Biol Reprod* **84**: 1242–1247, doi:10.1095/biolreprod.110.087494.

Zhu C, Luo J, Shi H, Xie X, Ding Z (2009) Expression of tubulin, p53, Ki67, receptors for estrogen, and progesterone in endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* **30**: 514–517.

Zhu L, Zhang W, Yu L, Zheng Y, Hu J, LIAO Q (2008) Proteomic patterns for endometrial cancer using SELDI-TOF-MS. *J Zhejiang Univ Sci B* **9**: 286–290, doi:10.1631/jzus.B0710589.

Ziebarth AJ, Newshean S, Steg AD, Shah MM, Katre A a., Dobbin ZC, Han HD, Lopez-Berestein G, Sood AK, Conner M, Yang ES, Landen CN (2013) Endoglin (CD105) contributes to platinum resistance and is a target for tumor-specific therapy in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **19**: 170–182, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1045.

Zoni E, van der Pluijm G, Gray PC, Kruithof-de Julio M (2015) Epithelial Plasticity in Cancer: Unmasking a MicroRNA Network for TGF-  $\beta$  -, Notch-, and Wnt-Mediated EMT. *J Oncol* **2015**: 1–13, doi:10.1155/2015/198967.

Zuurendonk LD, Smit RA, Mol BWJ, Feijen HWH, de Graaff J, Sykora D, de Winter KAJ, vd Wurff A, Snijders MPML, Kruitwagen RFPM (2006) Routine pelvic lymphadenectomy in apparently early stage endometrial cancer. *Eur J Surg Oncol* **32**: 450–454, doi:10.1016/j.ejso.2006.02.008.

## PARTE V — SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E FÓRMULAS





---

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABCB5	<i>ATP-binding cassette sub-family B member 5.</i>
ACOG	<i>American College of Obstetrics and Gynecology</i>
ADAM17	<i>A disintegrin and A metalloproteinase 17</i>
$\alpha$ -SMA	<i><math>\alpha</math> smooth muscle actin</i>
AKT	<i>Protein kinase B</i>
AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
ALHD	<i>Aldehyde dehydrogenase</i>
ALT	<i>Alanine aminotransferase</i>
AMPK	<i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APAF1	<i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
APE1	<i>Apurinic/aprimidinic endonuclease 1</i>
APEX1	<i>Multifunctional DNA-repair Enzyme-1</i>
ARID1A	<i>Rich interactive domain-containing protein 1A</i>
ARID5B	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 5B</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>
Ber-EP4	<i>Epithelial antigen antibody</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BMI1	<i>B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
BRCA	<i>Breast Cancer susceptibility gene</i>
BrdU+	<i>Bromodesoxiuridina</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
B72.3	<i>Tumor associated glycoprotein-72</i>
CA	<i>Cancer antigen</i>
CAP1	<i>Adenylate cyclase-associated protein 1</i>
CAPS	<i>3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid</i>

CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CK	<i>Citoqueratina</i>
c-Kit	<i>Tyrosine-protein kinase Kit</i>
CFU	<i>Colonies forming units</i>
CPM	<i>Contagens por minuto</i>
CSC	<i>Cancer stem cells</i>
CTC	<i>Circulating tumor cell(s)</i>
CTNNB1	<i>Gene <math>\beta</math>-catenina</i>
<i>CXCR4</i>	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
CYP	<i>Cytochrome</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-fenilindol</i>
DED	<i>Death effector domain</i>
DISC	<i>Intracellular death-inducing signaling complex</i>
DLLs	<i>Delta-like ligands</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM-F12	<i>DMEM e mistura de nutrientes F12 (Ham's)</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DTC	<i>Disseminated tumor cells</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>EGF receptor</i>
EMA	<i>Epithelial membrane antigen</i>
EMT	<i>Epithelial-to-mesenchymal transition</i>
EP	<i>Eficiência da placa</i>
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
EpiSCs	<i>Epithelial stem cells</i>
ESA	<i>Epithelial specific antigen</i>
FBXW7	<i>F-box/WD repeat-containing protein 7</i>
18F-FDG	<i>Fluorine-18-fluorodeoxyglucose</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
FAZ	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>

---

<i>FBXW7</i>	<i>F-box/WD repeat-containing protein 7</i>
<i>FGF</i>	<i>Fibroblast growth factor</i>
<i>FGFR2</i>	<i>FGF receptor-2</i>
<i>FIGO</i>	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
<i>FS</i>	Fator de sobrevivência
<i>FSC</i>	<i>Forward Scatter</i>
<i>FAZ</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6</i>
<i>GABA</i>	<i>γ-amino butyric acid</i>
<i>GLUT</i>	<i>Facultative glucose transporter</i>
<i>GOG</i>	<i>Gynecologic Oncology Group</i>
<i>HER2/neu</i>	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
<i>HGF</i>	<i>Hepatocyte growth factor</i>
<i>HIF</i>	<i>Hypoxia-inducible factors</i>
<i>HNF-1β</i>	<i>Hepatocyte nuclear factor-1B</i>
<i>HNPCC</i>	<i>Hereditary nonpolyposis colon cancer</i>
<i>HSP</i>	<i>Heat shock proteins</i>
<i>HtrA2/Omi</i>	<i>Human protein serine protease</i>
<i>ICR</i>	<i>Institute for Cancer Research</i>
<i>IC<sub>50</sub></i>	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
<i>IGF-1</i>	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
<i>IGF1R</i>	<i>Receptor IGF-1</i>
<i>IGFBP</i>	<i>IGF binding proteins</i>
<i>IMC</i>	Índice de massa corporal
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>KIF4</i>	<i>kinesin superfamily proteina member 4</i>
<i>LAVH</i>	<i>Laparoscopic assisted vaginal hysterectomy</i>
<i>LDH</i>	<i>Lactate dehydrogenase</i>
<i>LEF1</i>	<i>Lymphoid enhancer-binding factor-1</i>
<i>LH</i>	<i>Luteinizing hormone</i>
<i>LIF</i>	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
<i>linc-RoR</i>	<i>Large intergenic non-coding ribonucleic acids-RoR</i>
<i>LKB1</i>	<i>Serine/threonine kinase 1</i>
<i>LOH</i>	<i>Loss of heterozygosity</i>

MDR	<i>Multi-drug resistant</i>
MDM2	<i>Murine double minute 2</i>
MELF	<i>Microcystic, elongated and fragmented</i>
MELK	<i>Maternal embryonic leucine zipper kinase</i>
MET	<i>Mesenchymal-epithelial transition</i>
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MIBI	<i>Six (sesta=6) methoxyisobutylisonitrile ligands)</i>
MLC	<i>Multileaf Collimator</i>
MLH1	<i>MutL homolog 1</i>
MMP	<i>Matrix metallo-proteinases</i>
mNumb	<i>Mammalian Numb</i>
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MRP2	<i>MDR associated resistance protein 2</i>
MSC	<i>Mesenchymal stem cells-like</i>
MSH2	<i>MutS protein homolog 2</i>
MSH6	<i>MutS homolog 6</i>
MSI	<i>Microsatellite instability</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MU	<i>Monitor Units</i>
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NFYA	<i>Nuclear factor YA</i>
NME1	<i>Nucleoside diphosphate kinase-1</i>
OCT-4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDGF	<i>Platelet- derived growth factor</i>
<i>PDCD10</i>	<i>Programmed cell death protein 10</i>
PDH	<i>Pyruvate dehydrogenase</i>
PDGFR	<i>PDGF receptor</i>
PET	<i>Positron emission tomography</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>

---

PMS2	<i>Postmeiotic segregation increased 2</i>
POLE	<i>Catalytic subunit of DNA polymerase epsilon</i>
PORTEC-1	<i>Post Operative Radiation Therapy in Endometrial Cancer</i>
PPP2R1A	<i>Serine/threonine-protein phosphatase-2A</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PSEN1	<i>Presenilin 1</i>
PUMA	<i>P53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
qPCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate-1)</i>
RIP	<i>Receptor-interacting protein</i>
RM	<i>Ressonância magnética</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNU	<i>Rowett Nude</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPL22	<i>Ribosomal protein L22</i>
RPMI	<i>Rooswell Park Memorial Institute</i>
SCA-1	<i>Stem cell antigen-1</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SCID/NOD	<i>Severe combined immunodeficiency/nonobese diabetic</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate—polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SENP2	<i>SUMO-specific protease 2</i>
SHBG	<i>Sex hormone-binding globulin</i>
SIU-LNG	<i>Sistema intrauterino com levonorgestrel</i>
SOG	<i>Society of Gynecologic Oncologists</i>
SOX2	<i>Sex determining region Y-box 2</i>
SP	<i>Side population</i>
SPARC	<i>Secreted protein acidic and rich in cysteine)</i>
SP11	<i>Transcription factor PU.1</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription3</i>
STK15	<i>Serine/Threonine Kinase-15</i>

SUV	<i>Standardized uptake value</i>
S6K1	<i>Ribosomal protein S6 kinase <math>\beta</math>-1</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>
TC	Tomografia computadorizada
TGF- $\alpha$	<i>Transforming growth factor-<math>\alpha</math></i>
TLH	<i>Total laparoscopic hysterectomy</i>
TNF	<i>Tumor necrosis fator</i>
TNF-RI	<i>TNF-receptor-1</i>
TRAIL	<i>TNF related apoptosis inducing ligand</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>VEGF receptor</i>

## PARTE VI — ANEXOS





**ANEXO I – ESTADIAMENTO DO CANCRO DO ENDOMÉTRIO, FIGO 2009**



Estádio	
I	Tumor confinado ao corpo uterino
IA	Invasão da metade interna do miométrio
IB	Invasão da metade externa do miométrio
II	Invasão do estroma cervical, sem invasão extrauterina
III	Invasão local ou regional
IIIA	Invasão da serosa uterina ou anexos
IIIB	Invasão da vagina e/ou paramétrios
IIIC	Metastização ganglionar pélvica ou para-aórtica
IIIC1	Metastização ganglionar pélvica
IIIC2	Metastização ganglionar para-aórtica, com ou sem metastização ganglionar pélvica
IV	Invasão da mucosa vesical e/ou intestinal e/ou metastização à distância
IVA	Invasão da mucosa vesical e/ou intestinal
IVB	Metastização à distância, incluindo intra-abdominal e/ou ganglionar inguinal



## **ANEXO II – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA**



**Fmeduc**  
Faculdade de Medicina  
Universidade de Coimbra  
WWW.fmed.uc.pt

COMISSÃO DE ÉTICA  
FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA  
COIMBRA

em 1/7/2009  
*[Handwritten signature]*

À  
Comissão de Ética da  
Faculdade de Medicina  
Universidade de Coimbra

Coimbra, 25 de Junho de 2009

*N/ ref:* Of. IBB/48/09

*Assunto:* Envio de projecto

Junto envio o projecto "Cancro do endométrio: caracterização da célula tumoral, perfil proteómico sérico e implicações na disseminação metastática *in vivo*", para aprovação por essa Comissão de Ética.

Com os melhores cumprimentos,

*Maria Filomena Botelho*

Prof. Doutora Maria Filomena Botelho





