



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Daniela Filipa Mendes Cancelinha

**QUANTIFICAÇÃO DO DANO BIOLÓGICO
INDUZIDO PELO RÁDIO-223 EM CULTURAS
CELULARES DE CANCRO DA PRÓSTATA
METASTÁTICO**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Engenharia Biomédica, com
especialização em Imagem Médica e Radiação, orientada pela Professora
Doutora Ana Salomé dos Santos Pires Lourenço e pela Investigadora
Doutora Ana Lúcia Vital Belchior, apresentada ao Departamento de Física da
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.**

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Daniela Filipa Mendes Cancelinha

**QUANTIFICAÇÃO DO DANO BIOLÓGICO
INDUZIDO PELO RÁDIO-223 EM CULTURAS
CELULARES DE CANCRO DA PRÓSTATA
METASTÁTICO**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Engenharia Biomédica, com
especialização em Imagem Médica e Radiação, orientada pela Professora
Doutora Ana Salomé dos Santos Pires Lourenço e pela Investigadora
Doutora Ana Lúcia Vital Belchior, apresentada ao Departamento de Física da
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.**

Setembro de 2023

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

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

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

Marie Curie

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e diretora do Instituto de Biofísica, por me ter acolhido na sua equipa permitindo a realização desta dissertação. Agradeço toda a partilha de conhecimento e rigor científico ao longo deste ano, assim como todas as críticas construtivas na correção deste documento.

À Professora Doutora Ana Salomé dos Santos Pires Lourenço, Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e orientadora desta dissertação, por toda a dedicação, apoio, simpatia e preocupação para comigo. Agradeço, genuinamente, todos os ensinamentos, o rigor e a disponibilidade constante em esclarecer qualquer dúvida que pudesse surgir ao longo deste trabalho experimental.

À Investigadora Doutora Ana Belchior, orientadora desta dissertação, pela sua boa disposição, partilha de conhecimentos e disponibilidade em esclarecer as dúvidas que foram surgindo no decorrer da realização deste projeto.

À Mestre Inês Marques, por ser um exemplo diário de trabalho, dedicação, rigor e empenho. Acima de tudo, agradeço a ajuda na integração no laboratório, a disponibilidade incansável e toda a partilha de conhecimento científico e visão oportuna. Obrigada pelas palavras amigas e acompanhamento em todas as fases deste projeto. Foi, sem dúvida, um enorme prazer trabalhar e aprender contigo.

Aos Mestres Ana Rita Gomes, Beatriz Serambeque, Catarina Ferreira, Eurico Pereira e Ricardo Teixo, por toda a ajuda no laboratório, por todos os ensinamentos transmitidos e por toda a boa disposição partilhada.

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

À Diana, à Joana e à Rafaela, com quem partilhei muito mais do que um laboratório ou uma mesa de trabalho. Agradeço a ajuda incondicional, o apoio incansável e toda a preocupação que sempre demonstraram para comigo. A vossa amizade será sempre guardada com muito carinho.

À Bea, à Diana O., à Sofia e à Sara, que me acompanharam ao longo dos últimos anos. Obrigada por toda a amizade, toda a preocupação e todos os momentos de descontração que passámos juntas. Estas memórias bonitas ficarão sempre no meu coração.

Ao António, ao Miroto, ao Eduardo, ao Gui, ao Henrique e ao Mineiro. Os meninos que a família de praxe me deu e que animaram os últimos dois anos de forma icónica. Sem dúvida que não esquecerei a alegria que transbordam e as mil noites loucas juntos.

Ao Jorge e à Bea, que, mesmo longe de Ansião, me fizeram sentir em casa. Obrigada por todos os conselhos, apoio, preocupação e palavras amigas que sempre tiveram para comigo. Estou muito grata que tenham feito parte deste percurso.

À Mague e à Paloma, as afilhadas que tive a sorte de me escolherem. Obrigada por todos os momentos tão bonitos que passámos juntas, por todo o carinho que partilhamos e por me mostrarem diariamente o verdadeiro significado de amizade. O meu orgulho e gratidão por vos ter será sempre inexplicável.

À Anita, muito mais do que netinha e companheira de laboratório. Agradeço toda a entreatajuda, paciência, apoio e ouvidos que me dás. Sem dúvida que foste a melhor surpresa do último ano.

À Ariana, a amiga mais especial que Coimbra me deu. São incontáveis as histórias que temos juntas e, seguramente, que os últimos 5 anos não fariam sentido sem ti. Obrigada por toda a preocupação, carinho, apoio e amizade que me dás. Não duvido que seremos para sempre Timon e Pumba.

À Bárbara, à Dani, ao Chico, à Brás, à Inês, ao João, ao Manel e à Tixa que, de ano para ano, me dão a sorte de ir crescendo e partilhando momentos inesquecíveis com eles. Obrigada por, seja qual for a distância, estarem sempre presentes e nunca me largarem a mão. Sei que são amigos e família para a vida toda.

Ao João, por toda a paciência, apoio e calma que me dá. Por ser o meu porto de abrigo e nunca duvidar das minhas capacidades. Por saber arrancar sempre um sorriso de mim, seja qual for a circunstância. Palavras nunca serão suficientes para te agradecer e mostrar o quanto gosto de ti.

A toda a minha família, em especial aos meus avós e às minhas madrinhas. Obrigada por estarem sempre presentes e se esforçarem para garantir o meu bem. Sou muito grata pelo carinho incansável que me dão.

Por fim, aos meus pais. A quem agradeço genuinamente todos os valores transmitidos. Sem dúvida que são o meu maior exemplo de esforço, empenho e dedicação. Obrigada por toda a paciência, ajuda e amor incondicional. Sem vocês nunca teria completado este percurso. (E como é óbvio, não poderia faltar o Óscar... o rei da casa e o melhor companheiro que poderia ter para me animar nos dias mais tristes. Sou muito feliz em ter-te comigo.)

Resumo

O cancro da próstata (CaP) ocupa a segunda posição na lista das neoplasias mais frequentemente diagnosticadas, sendo a quinta causa de morte oncológica no sexo masculino. O estágio mais avançado de CaP, denominado de CaP metastático resistente à castração, está maioritariamente associado ao desenvolvimento de metástases ósseas e a um prognóstico muito desfavorável devido à escassez de terapêuticas. Nesta situação, o recurso à terapia de radionuclídeos com o dicloreto de rádio-223, um emissor alfa mímico do cálcio com afinidade pelas metástases ósseas de CaP, tem vindo a demonstrar elevado potencial. Todavia, as lacunas no conhecimento sobre os efeitos radiobiológicos e dosimétricos do rádio-223, inclusive a nível molecular, são apontadas como limites da eficácia clínica.

Neste sentido, este projeto visou a avaliação dos efeitos radiobiológicos e dosimétricos do rádio-223 em culturas celulares 3D (esferoides), sendo os estudos dosimétricos alargados aos modelos celulares 2D. Para tal, foi utilizado um modelo celular de esferoides, estabelecido a partir de células LNCaP ou PC3, ambas linhas celulares de CaP metastático, através da técnica de cultura por sobreposição líquida. Os efeitos radiobiológicos do rádio-223, em específico na morfometria, viabilidade, migração e invasão celulares, foram avaliados cinco ou sete dias após a exposição dos esferoides a diferentes atividades volúmicas iniciais (55 – 7 040 Bq/mL), durante 24h. A dosimetria do rádio-223 em modelos celulares *in vitro* foi realizada de acordo com o formalismo MIRD, através da determinação dos *S-values*, para as células PC3 e LNCaP, e do cálculo da dose absorvida para diferentes atividades volúmicas e tempos de irradiação, tendo em conta as diferentes abordagens experimentais realizadas *in vitro*.

Os resultados obtidos mostraram que a irradiação dos esferoides de células PC3 e LNCaP induziu uma desintegração progressiva na periferia dos esferoides, que se traduz na redução do seu tamanho e da viabilidade celular com o aumento da atividade volúmica inicial administrada. O decréscimo da viabilidade celular dos esferoides foi estatisticamente significativo após a exposição a atividades volúmicas iguais ou superiores a 55 Bq/mL (LNCaP) ou 3 520 Bq/mL (PC3). Além disso, verificou-se uma viabilidade menor em esferoides de células LNCaP do que em esferoides de células PC3, quando expostos às mesmas condições de irradiação, sugerindo uma maior radiosensibilidade ao rádio-223 para as células LNCaP. Adicionalmente, os ensaios de migração e invasão celular evidenciaram um decréscimo das células PC3 migratórias e invasoras na periferia dos esferoides com o aumento da atividade volúmica inicial.

A dosimetria do rádio-223 mostrou um aumento da dose absorvida por célula de acordo com o acréscimo da atividade internalizada e, por conseguinte, da atividade integrada no tempo, com o tempo de exposição ao radiofármaco, assim como com a diminuição da concentração e das dimensões celulares. Para além disso, a avaliação da influência da vizinhança celular na dose total absorvida por uma célula demonstrou que as células vizinhas são responsáveis por uma pequena fração na totalidade da dose que uma célula absorve, tanto menor quanto maior é a distância intercelular. Os resultados obtidos em condições de avaliação do conteúdo proteico celular corroboraram o sugerido através do ensaio de viabilidade, denotando também uma maior radiosensibilidade para a linha celular LNCaP. Nas condições subjacentes ao ensaio clonogénico, os valores de dose letal média alcançados foram concordantes com os estudos anteriormente realizados, evidenciando ainda a

ocorrência do efeito biológico sobretudo num período inicial de exposição ao rádio-223. Por fim, e de acordo com as curvas de simulação obtidas, verificou-se uma maior radiorresistência dos esferoides comparativamente às culturas em monocamada devido, essencialmente, à arquitetura espacial das estruturas 3D e ao baixo poder de penetração das partículas alfa emitidas pelo rádio-223.

Concluindo, os resultados obtidos demonstram o efeito citotóxico do rádio-223 em esferoides de células de CaP, em particular na diminuição do seu tamanho e no decréscimo da viabilidade celular e da capacidade migratória e invasiva das células. Em simultâneo, verificou-se ainda que o desenvolvimento de esferoides de diferentes dimensões e o efeito biológico do rádio-223 nestas estruturas é dependente do tipo e do número inicial de células semeadas. Por outro lado, a dose absorvida por uma célula demonstrou-se dependente de um conjunto de fatores associados à cinética do rádio-223, aos tempos de exposição e à atividade de radiofármaco inicialmente administrada. Perante estes factos, e tendo em conta os conhecimentos obtidos, a otimização das opções terapêuticas atuais que incorporam o rádio-223 será uma mais-valia no tratamento de doentes com CaP metastático, contribuindo para o aumento da sobrevivência global e da melhoria da qualidade de vida.

Palavras-chave: Cancro da próstata metastático resistente à castração; Cultura celular 3D; Dosimetria de radiofármacos; Formalismo MIRDo; Radiobiologia; Rádio-223; Terapia com radionuclídeos.

Abstract

Prostate cancer (PCa) holds the second position among the most frequently diagnosed neoplasms and ranks as the fifth leading cause of oncological mortality in men. The most advanced stage of PCa, metastatic castration-resistant PCa, is closely associated with the development of bone metastases and with a very unfavourable prognosis due to therapeutic limitations. In this context, the use of the radionuclide therapy, especially the radiopharmaceutical radium-223 dichloride, an alpha emitter that mimics calcium and it is readily deposited into areas exhibiting high osteoblastic activity and bone renewal (such as bone metastases in PCa), has shown a promising potential. However, its precise mode of interaction and effects on the metastatic microenvironment are not yet fully understood limiting its clinical applicability, essentially due to the absence of molecular-level radiobiological and dosimetric studies.

Thus, this project was developed to assess the radiobiological effect of radium-223 in 3D cell cultures (spheroids) of metastatic PCa cells and conduct dosimetric studies involving two- and three-dimensional cell models of metastatic PCa. To achieve this, a spheroid cellular model was established using LNCaP or PC3 cells, both representative metastatic PCa cell lines, through the liquid overlay culture technique. The radiobiological effects of radium-223 were assessed five or seven days after exposing the spheroids to different volumetric activities (from 55 to 7 040 Bq/mL) for 24 hours. Specifically, the effects of the radiopharmaceutical were evaluated on morphometry, proliferation, migration, and cell invasion. Radium-223 *in vitro* dosimetry was performed following the MIRD formalism, through the determination of *S-values* for PC3 and LNCaP cells followed by absorbed doses calculation at different volumic activities and radiation exposure durations, accounting with the diverse experimental approaches *in vitro*.

Results showed that irradiation of PC3 and LNCaP cells' spheroids led to progressive disintegration at the periphery of these structures, resulting in a reduction in size with increasing initial volumic activity compared to non-irradiated spheroids. Additionally, cell proliferation was affected by radium-223 exposure, with a statistically significant decline observed when spheroids were exposed to volumic activities from 55 Bq/mL (LNCaP) or 3 520 Bq/mL (PC3). Furthermore, a more pronounced decrease in cellular proliferation was observed in LNCaP cells' spheroids compared to PC3 cells' spheroids under the same irradiation conditions, indicating a greater radiosensitivity of LNCaP cells to radium-223. Migration and invasion assays in 3D PC3 cell structures demonstrated fewer migratory and invasive cells at the spheroid periphery with increasing initial volumic activity.

Regarding radium-223 dosimetry, the absorbed dose per cell increased proportionally with internalized activity, exposure duration, and decreased concentration and cellular dimensions. Moreover, analysis of the influence of neighbouring cells on the total absorbed dose by a cell indicated that these cells contributed with a little fraction for the total absorbed dose, which contribution decreases as intercellular distance increases. Results obtained from cellular protein content assay supported the findings of the proliferation assay, confirming greater radiosensitivity in the LNCaP cell line. In clonogenic assays, the mean lethal dose values were consistent with previous studies and indicated a biological effect, particularly during the initial time of exposure to radium-223. Lastly, simulation curves demonstrated that spheroids exhibited greater radioresistance compared to

monolayer cultures, due to the spatial architecture of 3D structures and the limited penetration depth of alpha particles emitted by radium-223.

To conclude, the presented results showed a cytotoxic effect of radium-223 on PCa cells' spheroids, in particular a decrease in their size and a reduced cell viability, as well as impairing the migratory and invasive cells capabilities. Simultaneously, it was observed that the development of spheroids of varying sizes and the biological impact of radium-223 within these structures depends on the type and on the initial number of seeded cells. Additionally, the absorbed dose by a cell was demonstrated to be dependent on a set of factors related to the kinetics of radium-223, exposure times, and the initially administered radiopharmaceutical activity. Given these findings and considering the knowledge acquired, the optimization of current therapeutic options that incorporate radium-223 will be an added value in the treatment of patients with metastatic PCa, contributing to increased overall survival and improved quality of life.

Keywords: Metastatic castration-resistant prostate cancer; 3D cell culture; Radiopharmaceuticals dosimetry; MIRDO formalism; Radiobiology; Radium-223; Radionuclide therapy.

Índice

Agradecimentos.....	IX
Resumo	XI
Abstract	XIII
Índice de Figuras.....	XVII
Índice de Tabelas	XX
Índice de Equações.....	XXI
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XXIII
1. Introdução.....	27
1.1. A radiação.....	29
1.1.1. Tipos de radiação	29
1.1.2. A radiação ionizante na medicina.....	31
1.1.2.1. Terapia com radionuclídeos.....	32
1.2. Cancro da próstata metastático resistente à castração.....	38
1.2.1. Epidemiologia.....	38
1.2.2. Fatores de risco.....	39
1.2.3. Diagnóstico e estadiamento	40
1.2.4. Evolução do cancro da próstata.....	43
1.2.4.1. A influência dos recetores de androgénios.....	43
1.2.4.2. Resistência à castração	44
1.2.4.3. Processo de metastização.....	44
1.2.5. Terapêutica	47
1.3. O rádio-223 no CPMRC.....	48
1.3.1. Características do rádio-223	49
1.3.2. Administração, farmacocinética e mecanismo de ação	50
1.3.3. Dosimetria.....	51
1.3.4. Estudos pré-clínicos	53
1.3.4.1. Culturas celulares tridimensionais.....	53
1.3.4.2. Modelos celulares tridimensionais no estudo do CaP.....	57
2. Objetivos	59
3. Materiais e Métodos.....	63
3.1. Efeitos radiobiológicos do rádio-223.....	65
3.1.1. Cultura Celular	65
3.1.2. Estabelecimento de culturas celulares 3D.....	67
3.1.3. Irradiação das culturas 3D de CaP com rádio-223	68
3.1.4. Análise da morfometria dos esferoides.....	69

3.1.5.	Avaliação da viabilidade celular	70
3.1.6.	Estudo da migração e da invasão celulares	71
3.2.	Dosimetria <i>in vitro</i> do rádio-223: Formalismo MIRD	73
3.2.1.	Determinação das dimensões celulares através de microscopia confocal.....	73
3.2.2.	Determinação da distância entre células.....	74
3.2.3.	Determinação dos <i>S-values</i>	75
3.2.4.	Cálculo da dose absorvida.....	76
3.2.5.	Simulação das curvas de sobrevivência	77
3.3.	Análise Estatística	79
4.	Resultados	81
4.1.	Efeitos radiobiológicos do rádio-223 em culturas 3D de CaP	83
4.1.1.	Caracterização dos esferoides (PC3 e LNCaP).....	83
4.1.2.	Morfometria dos esferoides	85
4.1.3.	Viabilidade celular.....	97
4.1.4.	Migração e invasão celular	98
4.2.	Dosimetria <i>in vitro</i> do rádio-223	101
4.2.1.	Dimensões celulares	102
4.2.2.	Distância entre células	102
4.2.3.	<i>S-values</i>	103
4.2.4.	Dose Absorvida	104
4.2.5.	Curvas de simulação da sobrevivência para culturas 2D e 3D.....	112
5.	Discussão	115
6.	Conclusão e Perspetivas Futuras.....	125
7.	Bibliografia	131

Índice de Figuras

Figura 1: Comparação entre o alcance dos diferentes tipos de radiação. Retirado de (Energy Education, 2023).	30
Figura 2: Efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante. Retirado de (Radiology Key, 2023).	35
Figura 3: Conjunto de etapas do procedimento dosimétrico realizado na terapia com radionuclídeos. Retirado de (O'donoghue et al., 2022).	36
Figura 4: Representação gráfica do alcance da deposição da dose de radionuclídeos com diferentes modos de decaimento. Retirado de (O'donoghue et al., 2022).	38
Figura 5: Comparação entre as taxas de incidência e mortalidade, em 2020, por tipo de cancro a nível mundial, no sexo masculino, para todas as idades (Ferlay et al., 2021).	39
Figura 6: Distribuição do estágio da neoplasia quando diagnosticada e relação do mesmo com a sobrevivência em 5 anos. Retirado de (Rebello et al., 2021).	42
Figura 7: Locais comuns de disseminação metastática para casos de cancro da próstata avançado. Retirado de (Rebello et al., 2021).	45
Figura 8: Conjunto de etapas representativas do processo de metastização. Retirado de (Valastyan & Weinberg, 2011).	45
Figura 9: Representação do processo de metastização óssea. O "ciclo vicioso" gerado pelo mecanismo de feedback positivo entre as células tumorais, os osteoblastos e os osteoclastos permite a progressão metastática. Retirado de (Furesi. Et al, 2021).	47
Figura 10: Efeitos radiobiológicos do rádio-223 em doentes com CPMRC com metástases ósseas ocorridos ao nível do tecido e a nível molecular. Retirado de (Deshayes et al., 2017).	49
Figura 11: Representação esquemática do decaimento do rádio-223. Retirado de (Abou et al., 2016).	50
Figura 12: Mecanismo de ação do rádio-223 nas metástases ósseas – efeito citotóxico nas células de CaP, nos osteoclastos e nos osteoblasto. Retirado de (O'sullivan, 2017).	51
Figura 13: Diferenças entre as culturas celulares a 2D e 3D. Retirado de (Fontana et al., 2020).	55
Figura 14: Imagem representativa de células PC3 (esquerda) e LNCaP (direita) adquiridas com um microscópio ótico invertido (Motic AE31), com uma ampliação de 100x. A escala corresponde a 600 μm	66
Figura 15: Processo de estabelecimento e de irradiação dos esferoides da linha celular PC3.	68
Figura 16: Processo de estabelecimento e de irradiação dos esferoides da linha celular LNCaP.	69
Figura 17: Interface do software AnaSP (a), exemplo do output da segmentação da imagem em imagem binária (b) e dos parâmetro extraídos, em pixels (c).	70
Figura 18: Exemplo da determinação da distância entre células (em μm) através do programa ImageJ.	75
Figura 19: Interface do software MIRDcell V3.12 para o cálculo dos S-values.	76
Figura 20: Interface do software MIRDcell V3.12 para a determinação das curvas de sobrevivência.	78
Figura 21: Esquema da evolução temporal dos esferoides de células PC3, estabelecidos a partir de 1 000 células iniciais, através da técnica de sobreposição líquida em placas ULA de 96 poços. O dia 2 corresponde a 48 horas após se semearem as células nos poços. As imagens foram obtidas através de um microscópio ótico invertido com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 600 μm	83
Figura 22: Esquema da evolução temporal dos esferoides de células LNCaP, estabelecidos a partir de 1 000 (A) ou 2 500 (B) células, através da técnica de sobreposição líquida em placas ULA de 96 poços. O dia 1 corresponde a 24 horas após se semearem as células nos poços. As imagens foram obtidas	

através de um microscópio ótico invertido com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 600 μm84

Figura 23: Imagens representativas da morfologia dos esferoides da linha celular PC3 em diversos planos de Z, 10 dias após o início da realização da experiência. A cor verde mostra a marcação da membrana celular após 24h de incubação com *CytoPainter* #ab176735 (Abcam). As imagens foram obtidas por microscopia confocal, com ampliação de 10X, em planos adquiridos com intervalos de 210 μm . A escala corresponde a 200 μm84

Figura 24: Painel representativo da evolução temporal dos esferoides com 1 000 células PC3 após irradiação, durante 24h, com uma atividade volúmica inicial de 0, de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL de rádio-223. As imagens foram adquiridas aos dias 1 (adição da atividade volúmica de rádio-223), 3, 5 e 9, recorrendo a um microscópio ótico invertido, com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 600 μm86

Figura 25: Representação gráfica da evolução da área (a), do diâmetro equivalente (b) e do perímetro (c) dos esferoides com 1 000 células PC3 quando sujeitos à irradiação com rádio-223. O dia 1 corresponde ao dia da irradiação com as atividades volúmicas de 0, de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL. Os resultados são apresentados como a média \pm erro-padrão de 2 experiências independentes, realizadas em triplicado, e analisados estatisticamente através da comparação entre os dias 1 e 9, para todas as condições, recorrendo ao teste ANOVA de 2 fatores e ao teste de Dunnett (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).87

Figura 26: Representação gráfica da evolução da circularidade (a), do volume (b), da compacidade (c) e da esfericidade (d) dos esferoides com 1 000 células PC3 quando sujeitos à irradiação com rádio-223. O dia 1 corresponde ao dia da irradiação com as atividades volúmicas de 0, de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL. Os resultados são apresentados como a média \pm erro-padrão de 2 experiências independentes, realizadas em triplicado, e analisados estatisticamente através da comparação entre os dias 1 e 9, para todas as condições, recorrendo ao teste ANOVA de 2 fatores e ao teste de Dunnett (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).89

Figura 27: Painel representativo da evolução temporal dos esferoides com 2 500 células LNCaP após irradiação, durante 24h, com uma atividade volúmica inicial de 0, de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL de rádio-223. As imagens foram adquiridas ao dia 1 (adição da atividade volúmica de rádio-223), 2, 3 e 6, recorrendo a um microscópio ótico invertido, com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 600 μm92

Figura 28: Representação gráfica da evolução da área (a), do diâmetro equivalente (b) e do perímetro (c) dos esferoides com 2 500 células LNCaP, quando sujeitos à irradiação com rádio-223. O dia 1 corresponde ao dia da irradiação com as atividades volúmicas de 0, de 55, de 3520 e de 7040 Bq/mL. Os resultados são apresentados como a média \pm erro-padrão de 1 experiência realizada em quintuplicado e analisados estatisticamente através da comparação entre os dias 1 e 6, para todas as condições, recorrendo ao teste ANOVA de 2 fatores e ao teste de Dunnett (**** $p < 0,0001$).93

Figura 29: Representação gráfica da evolução da circularidade (a), do volume (b), da compacidade (c) e da esfericidade (d) dos esferoides com 2 500 células LNCaP quando sujeitos à irradiação com rádio-223. O dia 1 corresponde ao dia da irradiação com as atividades volúmicas iniciais de 0, de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL. Os resultados são apresentados como a média \pm erro-padrão de 1 experiência realizada em quintuplicado e analisados estatisticamente através da comparação entre os dias 1 e 6, para todas as condições, recorrendo ao teste ANOVA de 2 fatores e ao teste de Dunnett (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$).95

Figura 30: Análise da viabilidade celular (%) dos esferoides com 1 000 células PC3, medida através do ensaio CellTiter-Glo® 3D 7 dias após a remoção da atividade volúmica inicial de rádio-223 (55, 3 520 e 7 040 Bq/mL) administrada (irradiação de 24h). Os resultados são apresentados como a média \pm erro-

padrão, normalizados ao controlo, de 4 experiências independentes realizadas em triplicado. Os dados foram analisados através do teste ANOVA de 1 fator e do teste de Tukey. (**** $p < 0,0001$).	97
Figura 31: Análise da viabilidade celular (%) dos esferoides com 1 000 células LNCaP, medida através do ensaio CellTiter-Glo® 3D 7 dias após a remoção da atividade volúmica inicial de rádio-223 (55, 3 520 e 7 040 Bq/mL) administrada (irradiação de 24h). Os resultados são apresentados como a média \pm erro-padrão, normalizados ao controlo, de 1 experiência independente realizada em duplicado.....	98
Figura 32: Esferoides de 5 000 células PC3 sujeitos à irradiação com rádio-223 com as atividades volúmicas de 0, de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio ótico invertido, com uma ampliação de 40X, no início da realização dos ensaios de migração e de invasão (0h). A escala apresentada corresponde a 600 μ m.	99
Figura 33: Painel temporal representativo da migração das células dos esferoides com 5 000 células PC3 quando sujeitos à irradiação com rádio-223, durante 24h, com as atividades volúmicas iniciais de 0, de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio ótico invertido, com uma ampliação de 100X, 24, 48 e 72 horas após a adição da matrigel (10 μ L). A escala apresentada corresponde a 600 μ m.....	100
Figura 34: Painel temporal representativo da invasão das células dos esferoides com 5 000 células PC3 quando sujeitos à irradiação com rádio-223, durante 24h, com as atividades volúmicas iniciais de 0, de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio ótico invertido, com uma ampliação de 100X, 24, 48 e 72 horas após a adição da matrigel (50 μ L). A escala apresentada corresponde a 600 μ m.....	101
Figura 35: Imagens representativas da morfologia das células PC3 (esquerda) e LNCaP (direita) em cultura aderente. As células foram marcadas durante 24h com CytoPainter #ab176735 (Abcam) e as imagens foram obtidas por microscopia confocal com ampliação de 20X. A escala corresponde a 200 μ m.	102
Figura 36: Medição das distâncias internucleares das células PC3 em diferentes condições de cultura: maior (esquerda) e menor (direita) densidade celular. As imagens foram obtidas através de um microscópio ótico invertido com uma ampliação de 100X.....	103
Figura 37: Análise do conteúdo proteico de células PC3, 7 dias após a exposição ao rádio-223 durante 24 horas, em função dos valores de dose absorvida, obtidos a partir da irradiação com atividades iniciais entre 0 e 7 040 Bq/mL. Os resultados foram normalizados ao grupo de controlo, não sujeito a irradiação, e são apresentados como a média \pm erro-padrão da percentagem de conteúdo proteico de, pelo menos, 5 experiências independentes realizadas em triplicado. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA de dois fatores e do teste de Dunnett para as comparações múltiplas (** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).....	107
Figura 38: Análise do conteúdo proteico de células LNCaP, 7 dias após a exposição ao rádio-223 durante 24 horas, em função dos valores de dose absorvida, obtidos a partir da irradiação com atividades iniciais entre 0 e 7 040 Bq/mL. Os resultados foram normalizados ao grupo de controlo, não sujeito a irradiação, e são apresentados como a média \pm erro-padrão da percentagem de conteúdo proteico de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em sextuplicado. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA de dois fatores e do teste de Dunnett para as comparações múltiplas (**** $p < 0,0001$).....	109
Figura 39: Curva de sobrevivência obtida para a linha celular PC3 em resposta à irradiação com rádio-223 durante 4 horas (esquerda) ou 24 horas (direita), seguidas de um período temporal de 8 dias de exposição ao radiofármaco. Os resultados experimentais correspondem à média \pm erro-padrão de 5 experiências independentes realizadas em duplicado.	111
Figura 40: Curva de sobrevivência para uma cultura 3D de células PC3 sujeita a uma atividade volúmica de 55 Bq/mL.....	113

Figura 41: Curva de sobrevivência para uma cultura 2D de células PC3 sujeita a uma atividade volúmica de 55 Bq/mL..... 113

Índice de Tabelas

Tabela 1: Dosimetria do rádio-223. Adaptado de (Pandit-Taskar et al., 2014).	52
Tabela 2: Captação, retenção celular e frações de internalização nuclear, citoplasmática e de adsorção na membrana celular das células PC3 e LNCaP. Retirado de (Marques et al., 2021).	75
Tabela 3: Análise estatística dos parâmetros representados na Figura 25 através do teste ANOVA de 2 fatores e do teste de <i>Dunnnett</i> . Os valores-p correspondem à comparação entre a condição controlo e as condições de irradiação com as várias atividades volúmicas no dia 9 (*p<0,05, ****p<0,0001). ..	88
Tabela 4: Análise estatística dos parâmetros representados na Figura 26 através do teste ANOVA de 2 fatores e do teste de <i>Dunnnett</i> . Os valores-p correspondem à comparação entre a condição controlo e as condições de irradiação com as várias atividades volúmicas no dia 9 (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).	90
Tabela 5: Análise estatística dos parâmetros representados na Figura 28 através do teste ANOVA de 2 fatores e do teste de <i>Dunnnett</i> . Os valores-p correspondem à comparação entre a condição controlo e as condições de irradiação com as várias atividades volúmicas no dia 6 (*p<0,05, ****p<0,0001). ..	94
Tabela 6: Análise estatística da Figura 29 através do teste ANOVA de 2 fatores e do teste de <i>Dunnnett</i> . Os valores-p correspondem à comparação entre a condição controlo e as condições de irradiação com as várias atividades volúmicas no dia 6 (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).	96
Tabela 7: Média e desvio-padrão do raio da célula e do raio do núcleo das células PC3 e LNCaP (N = 10 células).	102
Tabela 8: Média e desvio-padrão da distância internuclear das células PC3 e LNCaP cultivadas em diferentes condições.	103
Tabela 9: Valores dos S-values obtidos para as linhas celulares PC3 e LNCaP.	104
Tabela 10: Valores de dose absorvida por célula, para a linha celular PC3, quando avaliada 5 ou 7 dias após a exposição das células a atividades iniciais de rádio-223 entre 55 e 7 040 Bq/mL, durante 4h, para posterior avaliação do conteúdo proteico celular.....	105
Tabela 11: Valores de dose absorvida por célula, para a linha celular PC3, quando avaliada 5 ou 7 dias após a exposição das células a atividades iniciais de rádio-223 entre 55 e 7 040 Bq/mL, durante 24h, para posterior avaliação do conteúdo proteico celular.....	105
Tabela 12: Valores de dose absorvida por célula, para a linha celular PC3, quando avaliada 5 ou 7 dias após a exposição das células a atividades iniciais de rádio-223 entre 55 e 7 040 Bq/mL, durante 48h, para posterior avaliação do conteúdo proteico celular.....	106
Tabela 13: Valores de dose absorvida por célula, para a linha celular LNCaP, quando avaliada 5 ou 7 dias após a exposição das células a atividades iniciais de rádio-223 entre 55 e 7 040 Bq/mL, durante 4h, para posterior avaliação do conteúdo proteico celular.....	108
Tabela 14: Valores de dose absorvida por célula, para a linha celular LNCaP, quando avaliada 5 ou 7 dias após a exposição das células a atividades iniciais de rádio-223 entre 55 e 7 040 Bq/mL, durante 24h, para posterior avaliação do conteúdo proteico celular.....	108
Tabela 15: Valores de dose absorvida por célula, para a linha celular PC3, quando avaliada 8 dias após a exposição das células a atividades iniciais de rádio-223 entre 55 e 7 040 Bq/mL, durante 4h, para posterior análise da sobrevivência celular.....	110

Tabela 16: Valores de dose absorvida por célula, para a linha celular PC3, quando avaliada 8 dias após a exposição das células a atividades iniciais de rádio-223 entre 55 e 7 040 Bq/mL, durante 24h, para posterior análise da sobrevivência celular.....	110
Tabela 17: Parâmetros de ajuste obtidos para o modelo linear quadrático, para cada uma das situações de exposição da linha celular PC3 à irradiação com rádio-223.	111
Tabela 18: Valores de dose absorvida por célula, para a linha celular LNCaP, quando avaliada 8 dias após a exposição das células a atividades iniciais de rádio-223 entre 55 e 7 040 Bq/mL, durante 24h, para posterior análise da sobrevivência celular.	112

Índice de Equações

Equação 1: Cálculo da concentração celular através do método de exclusão de azul de tripano.	67
Equação 2: Cálculo da circularidade do esferoide, em que A é a área e P o perímetro (Pinto et al., 2020a)	70
Equação 3: Cálculo da esfericidade do esferoide, em que A é a área e P o perímetro (Kelm et al., 2003).	70
Equação 4: Cálculo do fator S, o <i>S-value</i> (Gy/Bq.s), representante da dose média absorvida numa região alvo (r_T) por decaimento originada por uma região fonte (r_S) (Katugampola et al., 2022a).	76
Equação 5: Cálculo da atividade integrada no tempo entre os instantes t_1 e t_2 (Belchior et al., 2020).	76
Equação 6: Cálculo da atividade integrada no tempo, tendo em conta as diferentes condições de exposição celular à radiação.	77
Equação 7: Cálculo da dose absorvida numa célula (Gy).....	77
Equação 8: Cálculo da dose total absorvida numa célula (Gy).	77
Equação 9: Cálculo do coeficiente da atividade integrada no tempo (h) (Katugampola et al., 2022a).	78

Lista de Abreviaturas e Símbolos

^{11}C – Carbono-11

^{18}F – Flúor-18

^{153}Sm -EDTMP – Ácido etilenodiaminotetrametileno fosfórico marcado com samário-153

^{211}At – Ástato-211

^{212}Pb – Chumbo-212

^{213}Bi – Bismuto-213

^{223}Ra – Rádio-223

$^{223}\text{RaCl}_2$ – Dicloreto de rádio-223

^{225}Ac – Actínio-225

^{227}Ac – Actínio-227

^{227}Th – Tório-227

2D – Bidimensional

3D – Tridimensional

^{89}Sr – Estrôncio-89

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ – Tecnécio-99 metastável

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ADT – do inglês, *Androgen-deprivation therapy*

ARN – Ácido ribonucleico

ATCC – do inglês, *American type culture collection*

ATP – do inglês, *Adenosine triphosphate*

Bq – Becquerel

BRCA1 – do inglês, *Breast cancer 1*

BRCA2 – do inglês, *Breast cancer 2*

CaP – Cancro da próstata

CO_2 – Dióxido de carbono

CPMRC – Cancro da próstata metastático resistente à castração

CPRC – Cancro da próstata resistente à castração

d – Dias

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

DHT – 5 α -dihidrotestosterona

DL₅₀ – Dose letal média

EMA – do inglês, *European medicines agency*

eV – Eletrão-volt

FBS – do inglês, *Fetal bovine serum*

FDA – do inglês, *Food and drug administration*

g – Grama

GnRH – do inglês, *Gonadotropin-releasing hormone*

Gy – Gray

h – Hora

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

HOXB13 – do inglês, *Homeobox B13*

IDH – Índice de desenvolvimento humano

L – Litro

LET – do inglês, *Linear energy transfer*

LH – do inglês, *Luteinizing hormone*

LHRH – do inglês, *Luteinizing hormone-releasing hormone*

m – Metro

M – mole

MeV – Mega eletrão-volt

MIRD – do inglês, *Medical internal radiation dose*

mRNA – do inglês, *Messenger ribonucleic acid*

MRT – do inglês, *Molecular radionuclide therapy*

OH^{*} – Radical hidroxilo

OPG – Osteoprotegerina

PBS – do inglês, *Phosphate buffered saline*

PCA3 – *Gene 3 do cancro da próstata*

PET – do inglês, *Positron emission tomography*

pHEMA – Poli(2-hidroxietilmetacrilato)

PSA – do inglês, *Prostate-specific antigen*

PSMA – do inglês, *Prostate-specific membrane antigen*

RA – Recetores de androgénios

RANK – do inglês, *Receptor activator of nuclear factor- κ B*

RANKL – do inglês, *Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*

RM – Ressonância magnética

RPMI – do inglês, *Roswell park memorial institute*

ROI – do inglês, *Region of interest*

ROS – do inglês, *Reactive oxygen species*

SPECT – do inglês, *Single photon emission computerized tomography*

TC – Tomografia computadorizada

TNM – do inglês, *Tumour, nodes and metastasis*

$T_{1/2}$ – Tempo de meia-vida

u.a. – Unidade arbitrária

ULA – do inglês, *Ultra-Low Attachment*

1. Introdução

1.1. A radiação

De acordo com a física, a radiação é uma forma de energia que é emitida a partir de uma fonte na forma de ondas ou de partículas (Tonnessen et al., 2011). O ser humano, no seu quotidiano, está sujeito a várias fontes naturais emissoras de radiação, como os radionuclídeos presentes na crosta terrestre ou os raios cósmicos. No entanto, foi apenas a partir de 1895, com a descoberta dos raios-X por Roentgen, e de 1896, com a averiguação de uns raios invisíveis emitidos pelo urânio por Becquerel, que se despertou rapidamente um grande interesse pelas suas possíveis aplicações. Assim, a partir daí, verificou-se uma constante evolução deste campo, promovendo o desenvolvimento de fontes de radiação artificiais, como a produção de energia nuclear e as aplicações médicas, sendo exemplo disso a radiologia convencional, a radioterapia ou a medicina nuclear (Beyzadeoglu et al., 2010; Lenaerts E. & Coucke P., 2014).

1.1.1. Tipos de radiação

A radiação pode ser classificada como ionizante ou não ionizante, dependendo da sua capacidade de ionização. A radiação não ionizante, como as ondas de rádio, as microondas, a radiação infravermelha, a luz visível e a radiação ultravioleta, caracteriza-se por apresentar energia suficiente para promover o movimento ou a vibração dos átomos numa molécula, mas não suficiente para causar a ionização dos mesmos. Por sua vez, a energia da radiação ionizante é suficientemente elevada para remover eletrões de átomos ou moléculas, originando ionizações que promovem a ocorrência de efeitos determinantes em áreas como a saúde. A radiação ionizante pode apresentar-se na forma de ondas, denominada de radiação eletromagnética, ou na forma de partículas, também designada como radiação corpuscular. Na radiação eletromagnética ionizante incluem-se os raios-X e os raios gama, enquanto na particulada ou corpuscular se incluem os prótons, os neutrões, os positrões, os núcleos pesados, os deuterões, as partículas beta e as partículas alfa (Beyzadeoglu et al., 2010; Donya et al., 2014).

Os raios-X e os raios gama são ondas eletromagnéticas de elevada energia que se diferenciam em diversos aspetos. Relativamente à sua origem, os primeiros podem ser classificados em dois tipos: os raios-X de *Bremsstrahlung*, também chamados por radiação de frenagem, resultantes da interação de eletrões altamente acelerados com os núcleos de um alvo com número atómico elevado, e os raios-X característicos resultantes do reajustamento eletrónico consequente à interação de um eletrão com uma orbital atómica interna. Por sua vez, os raios gama são emitidos por processos decorrentes no interior do núcleo, surgindo frequentemente após emissão corpuscular e, comparativamente aos raios-X, devido à sua maior energia, possuem um maior poder de penetração. Assim, em termos de radioproteção, para atenuar e proteger os efeitos provenientes destas ondas eletromagnéticas são necessários vários centímetros de materiais densos e de elevado número atómico como, por exemplo, o chumbo ou o tungsténio (Beyzadeoglu et al., 2010; Donya et al., 2014).

Relativamente às partículas alfa, estas provêm do decaimento de elementos radioativos pesados e são estruturalmente idênticas a um núcleo de hélio, pois são compostas por dois prótons e por dois neutrões, pelo que apresentam uma dupla carga positiva. No entanto, ainda que se apresentem como muito energéticas (4-9 MeV), ao se caracterizarem como partículas pesadas, são dificilmente desviadas da sua trajetória e perdem rapidamente a sua energia podendo, por isso, ser facilmente travadas por uma folha de papel. Assim, dado o seu baixo poder de penetração,

tipicamente inferior a 100 μm , e à sua capacidade de deposição de uma alta quantidade de energia num curto percurso, pode-se considerar que este tipo de radiação particulada evidencia uma elevada transferência linear de energia (LET, do inglês *linear energy transfer*), na ordem dos 60-230 $\text{keV}/\mu\text{m}$, depositando uma energia por unidade de percurso cerca de 15 000 vezes superior às partículas beta (Beyzadeoglu et al., 2010; Guerra Liberal et al., 2020; Murray & Flux, 2021).

As partículas beta são partículas emitidas durante um decaimento radioativo que se deslocam a elevada velocidade. Caso um radionuclídeo seja instável devido ao excesso de neutrões no seu núcleo, ocorre um decaimento β^- verificando-se a conversão de um neutrão num próton com emissão de uma partícula β^- , com características semelhantes a um eletrão, e um antineutrino. No entanto, caso a instabilidade do núcleo se deva ao excesso de prótons, sucede-se um decaimento β^+ , em que um próton se converte num neutrão, num positrão (partícula β^+), uma partícula carregada positivamente, e num neutrino. Comparativamente às partículas alfa, as partículas beta apresentam menor LET e um maior poder de penetração (2-10 mm) necessitando, por isso, de um material mais espesso do que uma folha de papel para a sua atenuação, como certos plásticos ou o alumínio (Ku et al., 2019). No entanto, a proteção e a atenuação destas partículas nunca deve ser realizada por materiais de elevados números atômicos, dada a possibilidade de ocorrência de emissão de raios-X (Welsh, 2006; Beyzadeoglu et al., 2010; Jones et al., 2010).

Além destas desintegrações, por vezes, ocorre também outro tipo de decaimento, a captura eletrónica, que se verifica quando um dos eletrões mais próximos do núcleo atómico, nomeadamente da orbital K ou L, é capturado pelo núcleo. Este, ao combinar-se com um próton, origina um neutrão e um neutrino e, devido ao preenchimento da lacuna formada anteriormente por um eletrão de uma camada mais externa, há libertação de energia sob a forma de raios-X característicos. Os raios-X emitidos podem abandonar o átomo ou interagir com outro eletrão e, caso apresentem energia suficiente para a sua ejeção, originar o eletrão de *Auger*, de elevada LET e de baixo poder de penetração (0,02-10 μm) (Ku et al., 2019). Na Figura 1 é possível observar a distinção entre a capacidade de penetração dos tipos de radiação anteriormente referidos.

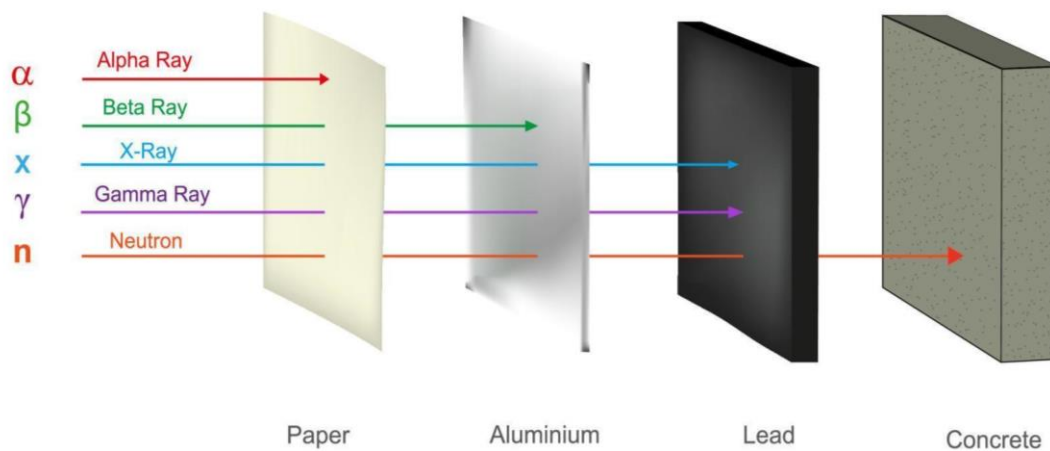


Figura 1: Comparação entre o alcance dos diferentes tipos de radiação. Retirado de (Energy Education, 2023).

1.1.2. A radiação ionizante na medicina

A radiação ionizante apresenta uma natureza amplamente versátil, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento de aplicações médicas, nomeadamente no diagnóstico e no tratamento de diversas doenças, contribuindo para a maior eficácia dos cuidados de saúde. No entanto, ao constituir a principal fonte de exposição à radiação ionizante da população em geral, a radiação ionizante na medicina está associada ao risco de aparecimento de diversas doenças, particularmente, o cancro. Desta forma, torna-se essencial uma avaliação prévia da relação risco/benefício de forma a minimizar os riscos para a saúde (Thierry-Chef et al., 2022).

A implementação das técnicas de diagnóstico médico pode ser realizada através de dois métodos distintos. A radiologia convencional, a mamografia, a tomografia computadorizada (TC) e a fluoroscopia englobam um conjunto de técnicas que se baseiam na transmissão da radiação. Nestes casos, o doente é posicionado entre a fonte de emissão e o detetor, permitindo a obtenção de uma imagem que resulta da interação da radiação ionizante com o meio atravessado. Por outro lado, a medicina nuclear assenta no uso de fontes não seladas, dado que a fonte de radiação provém do decaimento do radiofármaco administrado. A PET (do inglês, *positron emission tomography*), a SPECT (do inglês, *single-photon emission computerized tomography*) e a cintigrafia planar são exemplos de técnicas de diagnóstico da medicina nuclear e, contrariamente às técnicas anteriormente descritas, nesta tipologia de exames de diagnóstico é comum proceder-se ao isolamento do doente após a realização do exame (Chatal & Hoefnagel, 1999; Chalkia et al., 2022).

A nível terapêutico, a utilização de radiação ionizante tem manifestado resultados altamente promissores, sobretudo em doenças oncológicas, devido ao seu poder indutor de lesões na molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) e conseqüente bloqueio da capacidade de divisão e de proliferação celular. Esta modalidade, combinada ou não com outra terapia, é caracterizada por apresentar uma elevada especificidade para o volume-alvo, através da realização prévia de um planeamento terapêutico ou da escolha do radionuclídeo e do marcador molecular apropriado, permitindo o tratamento oncológico. Além disso, para neoplasias em estádios mais avançados, o tratamento com radiação ionizante pode ainda ser realizado com intuito paliativo de forma a aliviar os sintomas. Todavia, durante a exposição à radiação ionizante ocorre também interação com as células não tumorais, pelo que o objetivo desta terapia assenta na maximização da dose de radiação entregue às células tumorais e na minimização da exposição das células normais, localizadas na periferia do tumor ou no trajeto percorrido pela radiação, de forma a reduzir ao máximo possível os efeitos adversos (Baskar et al., 2012).

A terapêutica com radiação ionizante pode ser realizada por três métodos: na forma de radioterapia por fonte externa, na forma de braquiterapia ou através da administração de radionuclídeos. A radioterapia por fonte externa recorre a uma fonte de radiação externa ao doente, normalmente produzida por aceleradores lineares ou ciclotrões, permitindo a deposição do feixe de radiação altamente energética (fotões, prótons, elétrons, iões pesados ou neutrões) sobretudo na região do corpo onde o volume tumoral se situa. Esta técnica tem sido alvo de modificações tecnológicas ao longo do tempo de forma a minimizar a dose de radiação depositada nos tecidos saudáveis adjacentes ao tecido tumoral em tratamento. Assim, surgiram diversas formas de radioterapia externa, de entre as quais se destacam a radioterapia conformacional tridimensional e a

radioterapia de intensidade modulada (Baskar et al., 2012; Pugh et al., 2013). A braquiterapia, ou radioterapia por fonte interna, é realizada através da inserção da fonte de radiação no interior ou na periferia do órgão a ser tratado, sendo recomendada para neoplasias localizadas, de baixo risco ou que se encontrem adjacentes a tecidos saudáveis com elevada radiosensibilidade (Abshire & Lang, 2018; Pugh et al., 2013). Por outro lado, a terapia com radionuclídeos, mais recentemente designada por terapia molecular de radionuclídeos (MRT, do inglês *molecular radionuclide therapy*), consiste na administração de radiofármacos com afinidade para uma região de interesse ou, em situações em que isso não se verifica, recorre à conjugação de radionuclídeos com uma molécula dirigida, tal como anticorpos, péptidos ou hormonas que, dependendo da sua natureza, direcionam o radiofármaco a um local específico onde emitirá radiação por decaimento radioativo. Geralmente, os radiofármacos com maior uso terapêutico são emissores de partículas alfa, beta e elétrons de Auger que, por apresentarem um percurso livre nos tecidos inferior ao da radiação eletromagnética, permitem a deposição da dose de forma localizada assegurando a redução dos efeitos secundários (Z. S. Morris et al., 2021).

1.1.2.1. Terapia com radionuclídeos

A terapia com radionuclídeos é um procedimento médico amplamente utilizado em terapias antitumorais, apresentando diversas vantagens quando comparada com outras modalidades. Esta opção terapêutica, ao recorrer a radionuclídeos com afinidade a uma via metabólica de interesse ou ao proceder à sua conjugação com uma molécula dirigida, permite o direcionamento da radiação para as células alvo, resultando num tratamento mais preciso e eficaz acoplado à minimização da toxicidade. Comparativamente à radioterapia, a fonte de radiação não é administrada externamente, mas sim de forma sistémica, por via oral ou endovenosa, dependendo do tipo de neoplasia, da localização do tumor e do radiofármaco. Após administração, o radiofármaco é direcionado para os órgãos ou tecidos alvo, onde emite radiação que se deposita nas células tumorais e promove efeitos citotóxicos indutores de morte celular. De maneira diferente do que acontece nos procedimentos de radioterapia externa e de quimioterapia, a terapia com radionuclídeos está associada a uma libertação da radiação por um período prolongado pelo que, na maioria das vezes, não requer uma elevada periodicidade de administração, sendo frequentemente realizada em poucos ciclos. No entanto, torna-se necessário a adoção de medidas de radioproteção rigorosas verificando-se, por vezes, o isolamento dos doentes, dada a emissão radioativa durante um certo intervalo de tempo após o tratamento. Além disso, ainda que de forma menos abrupta, mas tal como em qualquer outra metodologia, a terapêutica com radiofármacos está associada à ocorrência de efeitos secundários, nomeadamente a fadiga, náuseas ou a uma redução do número de células sanguíneas (Sgouros et al., 2019).

Após vários anos de estudos clínicos e pré-clínicos com a terapia com radionuclídeos, diversos resultados demonstraram a sua potencialidade, conferindo-lhe importância e reconhecimento que, conseqüentemente, promoveram o investimento substancial por parte da indústria farmacêutica no desenvolvimento de moléculas capazes de transportar o átomo radioativo e levá-lo ao alvo. Até ao momento, a aprovação de radiofármacos emissores de partículas β^- , que atuam no tratamento de linfomas, carcinomas tiroideus, ou tumores neuroendócrinos, como o feocromocitoma, e emissores de partículas α , utilizados no tratamento de metástases ósseas do cancro da próstata, têm demonstrado resultados clínicos altamente promissores, estimulando um crescente interesse na

terapia com radionuclídeos. Além destes, destacam-se também os radiofármacos emissores de elétrons de *Auger* que, por apresentarem um percurso livre na ordem dos nanómetros e micrómetros, acoplado a uma elevada LET, têm vindo a ser alvo de diversos estudos, nomeadamente no tratamento de tumores da tiroide, do cérebro e melanomas (Ku et al., 2019; Sgouros & Hobbs, 2014).

1.1.2.1.1. Terapia alfa dirigida

A terapia alfa dirigida é um tipo de MRT que recorre a radiofármacos emissores de partículas alfa permitindo o tratamento de doenças oncológicas ou, mais recentemente e com menor frequência, de infeções virais, bacterianas ou fúngicas (Helal & Dadachova, 2018). A sua eficácia pode ser explicada através das propriedades das partículas alfa que, comparativamente à radiação particulada de menor LET, apresentam maior deposição de energia por unidade de comprimento percorrido conferindo-lhes, por isso, uma citotoxicidade superior e um percurso livre nos tecidos mais reduzido (Marcu et al., 2018). Consequentemente, e do ponto de vista radiobiológico, as partículas alfa manifestam uma grande letalidade para as células, permitindo ainda a limitação de efeitos tóxicos em tecidos saudáveis na periferia do volume sob tratamento. Assim, a elevada eficácia biológica e a citotoxicidade localizada destas partículas é traduzida, maioritariamente, na indução de danos celulares diretos, como a quebra da cadeia dupla de ADN, os quais, quando não reparados, conduzem à morte celular. Desta forma, a terapia alfa dirigida torna-se menos suscetível ao desenvolvimento de mecanismos de resistência, nomeadamente em condições de hipoxia, contrastando com a dependência aeróbica subjacente à radioterapia com radiação de baixo LET (Parker et al., 2018; M. J. Morris et al., 2019; Suominen et al., 2019; Guerra Liberal et al., 2020).

Em 2013, e pelos motivos anteriormente referidos, foi aprovado o primeiro radionuclídeo emissor de partículas alfa, o rádio-223, para o tratamento de doentes com cancro da próstata metastático resistente à castração (CPMRC), tendo vindo a apresentar resultados promissores essencialmente no tratamento paliativo de metástases ósseas. Mais recentemente, foi também aprovado o actínio-225 (^{225}Ac), direcionado para tumores que apresentam uma proteína sobre-expressa na superfície das células tumorais da próstata, o antigénio prostático específico da membrana (PSMA, do inglês *prostate-specific membrane antigen*) (Agrawal, 2020).

No entanto, além da considerável quantidade de emissores alfa existentes, apenas uma pequena fração se torna adequada para a realização desta opção terapêutica devido, fundamentalmente, aos desadequados tempos de meia vida, à complexidade dos processos de decaimento ou à sua disponibilidade. O ástato-211 (^{211}At), o chumbo-212 (^{212}Pb) e o bismuto-213 (^{213}Bi) são exemplos de radionuclídeos que ultrapassam as limitações mencionadas, sendo, por isso, utilizados na realização de ensaios clínicos que, combinados ou não com outras terapias, têm vindo a demonstrar uma possível arma no controlo antitumoral e na resposta imunitária. Atualmente, apesar do crescente interesse no potencial da MRT e ainda que se tenha verificado um aumento da produção de radiofármacos e do número de ensaios clínicos realizados, fatores como a dosimetria, o mecanismo de ação dos emissores alfa, a informação biológica a nível molecular, nomeadamente a radiosensibilidade das células tumorais e dos restantes elementos do microambiente tumoral, não estão completamente esclarecidos. Assim, torna-se imperativo o estudo destes parâmetros para obter uma melhor compreensão radiobiológica e dosimétrica entre as células alvo e as características dos emissores considerados, permitindo a limitação da toxicidade indesejada e a majoração do efeito

biológico pretendido que, em simultâneo, possibilitarão o aperfeiçoamento da terapia alfa dirigida (Guerra Liberal et al., 2020; Y. S. Kim & Brechbiel, 2012).

1.1.2.1.2. Efeitos radiobiológicos

A interação da radiação ionizante com o material biológico manifesta efeitos físico-químicos e biológicos, dependentes de fatores associados ao tipo e energia de radiação e às características intrínsecas das células irradiadas. Deste modo, aquando da interação da radiação com a matéria, verifica-se a ocorrência da excitação e ionização dos átomos e moléculas, a fase físico-química, cuja probabilidade de ocorrência varia com a energia transferida por unidade de comprimento de percurso, a LET. Analisando os diversos tipos de radiação, a radiação alfa é detentora de uma LET mais elevada e, devido à sua carga e massa atômica, de uma trajetória menos sinuosa. Consequentemente, originar-se-á uma deposição de energia de forma mais localizada e uma maior ionização específica, verificando-se a produção de milhares de pares de iões por micrómetro (Baskar et al., 2012; Z. S. Morris et al., 2021; Paunesku et al., 2021).

Seguidamente, com o início da interação entre a radiação ionizante e as moléculas, sucedem-se modificações celulares responsáveis por inúmeras consequências a nível funcional. No entanto, a evidência dos danos biológicos está sujeita a um período de latência, variável de minutos a anos, e cuja agressividade apresenta dependência a fatores como a dose total, o fracionamento, a sensibilidade à radiação por parte das células alvo e a disponibilidade de oxigénio. De acordo com a Lei de *Bergonie e Tribondeau*, é possível afirmar que a radiosensibilidade de uma célula, tecido ou órgão aumenta com a sua capacidade replicativa e diminui com o seu grau de diferenciação, pressupondo uma maior radiosensibilidade para células cuja atividade mitótica é superior, como é o caso das células tumorais (Vogin & Foray, 2013).

A ocorrência dos efeitos biológicos pode-se suceder de forma direta ou indireta, originando lesões em diversos compartimentos celulares, sobretudo no ADN (Figura 2). Os efeitos diretos são responsáveis por cerca de 30-40% das lesões provocadas pela interação da radiação ionizante com o material biológico e ocorrem quando macromoléculas, como o ADN, o ácido ribonucleico (ARN), proteínas, fosfolípidos membranares, entre outras, sofrem ionizações, excitações ou quebras de ligações químicas induzidas diretamente por partículas ionizantes ou fotões. Estas reações são responsáveis por alterações a nível estrutural e funcional que, quando ineficazmente reparadas, promovem o aparecimento de mutações, aberrações cromossómicas ou morte celular (Tuieng et al., 2021). Os efeitos indiretos têm uma probabilidade de ocorrência superior (60-70%) e surgem em situações de transferência de energia para uma molécula intermediária que, por sua vez, provoca a formação de produtos altamente reativos. A radiólise da água é um exemplo tradutor do mecanismo de ação indireta, uma vez que explica a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) a partir da interação da radiação com as moléculas de água. Assim, a deposição de energia nas moléculas de água é responsável pela formação de radicais livres, como o radical hidroxilo (OH^{*}), que devido à presença de um eletrão desemparelhado na sua camada de valência, se torna instável e reage com outras moléculas. Estes radicais livres, ao reagirem entre si, podem ainda originar o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), responsável pela indução de fenómenos como stresse oxidativo e lesões a nível do ADN, tais como a despolimerização, a perda ou alteração de uma base e a quebra da cadeia (simples ou dupla) que, consequentemente, podem conduzir à morte celular. Além disso, a partir do conjunto de reações subjacentes à radiólise da água, verifica-se ainda

que um aumento na saturação em oxigénio nos tecidos influi a formação de uma maior quantidade de radicais livres e iões altamente reativos, justificando o acréscimo da probabilidade de ocorrência da fase biológica em situações aeróbicas e, por conseguinte, das lesões moleculares (Santivasi & Xia, 2014; Tuieng et al., 2021).

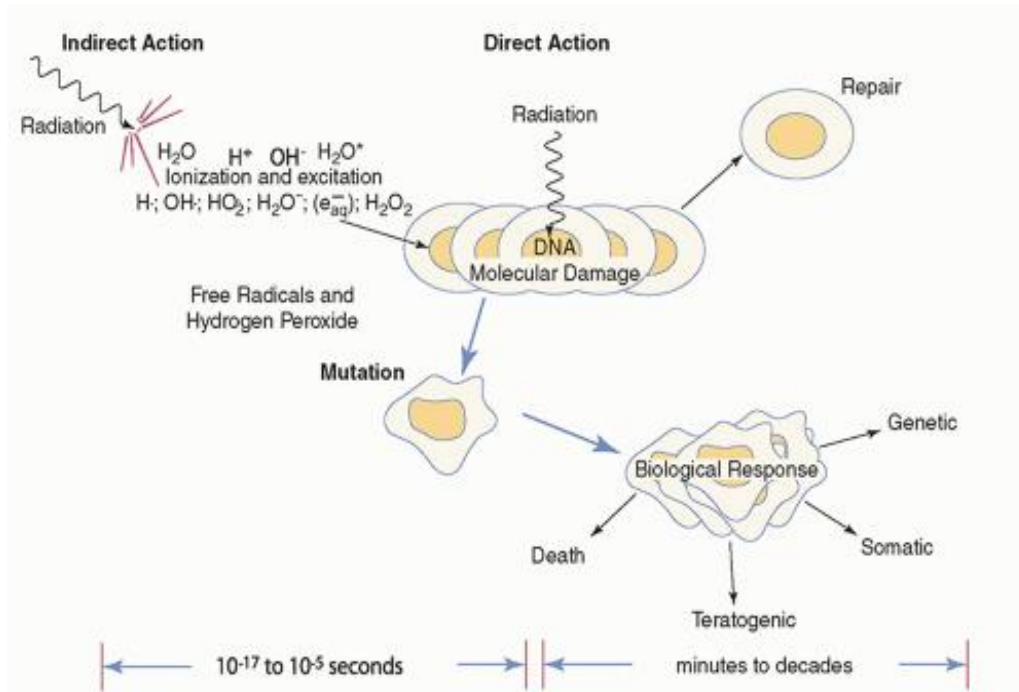


Figura 2: Efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante. Retirado de (Radiology Key, 2023).

1.1.2.1.3. Dosimetria de radiofármacos

A percepção da elevada potencialidade da terapia com radionuclídeos estimulou o desenvolvimento de estudos dosimétricos, ou seja, um conjunto de etapas que permitem a medição, o cálculo e a avaliação do efeito radiobiológico da dose de radiação ionizante absorvida por uma região alvo, de forma ajustada às propriedades do tipo de radiação emitida. Por exemplo, analisando os métodos subjacentes ao estabelecimento da dosagem usada na quimioterapia, verifica-se que a massa de fármaco administrada é determinada de acordo com a massa ou a área de superfície corporal do doente e com os resultados de estudos prévios e limitados a um baixo número de indivíduos que permitiram a determinação da dose máxima tolerada. No entanto, essa metodologia é restrita a esses aspetos, não considerando fatores cruciais, como diferenças metabólicas ou farmacocinéticas entre o grupo de doentes em tratamento, podendo, por vezes, originar casos de subdosagem ou sobredosagem e, conseqüentemente, o desenvolvimento de efeitos tóxicos. Em contrapartida, a terapia com radionuclídeos, ao recorrer a dados farmacocinéticos, imagiológicos e a noções das doses máximas de radiação absorvida pelos órgãos durante a radioterapia, permite a realização de cálculos dosimétricos e a obtenção de um valor adequado da dose absorvida pelo tumor e pelos restantes tecidos e órgãos possibilitando o ajuste da atividade administrada para cada doente de modo a garantir a maximização da dose absorvida pelo tumor sem comprometer as células não-alvo (Loke et al., 2011; Sgouros & Hobbs, 2014).

O processo do cálculo dosimétrico para radiofármacos envolve um conjunto de etapas (Figura 3) que requer informações sobre as propriedades do radionuclídeo (ex. tempo de meia-vida física, tempo de meia-vida biológica e tipo e energia de radiação emitida), a anatomia, a fisiologia, o volume, a composição e a radiosensibilidade do tecido alvo. O paradigma associado à determinação da dosimetria de cada doente principia-se com a administração de uma atividade “teste” do radiofármaco ou de uma substância substituta de composição semelhante, seguindo-se com a medição da sua biodistribuição e eliminação ao longo do tempo através da aquisição de imagens em série e, posteriormente, com a definição da anatomia desejada, normalmente por TC ou por ressonância magnética (RM). Seguidamente, é determinada a atividade integrada no tempo, correspondente ao número de decaimentos ocorridos na região de interesse, assim como os coeficientes de dose absorvida no tumor ou no órgão de risco, que traduzem a dose absorvida por unidade de atividade administrada. Por fim, é então realizada a prescrição da atividade terapêutica equivalente à dose absorvida pretendida para o tumor ou órgão em risco. É importante notar que, caso se verifique uma disparidade considerável entre a substância substituta e o radiofármaco em estudo, esta abordagem apresentará, como consequência, menor confiabilidade (Loke et al., 2011; Sgouros & Hobbs, 2014; Capala et al., 2021; O’donoghue et al., 2022).

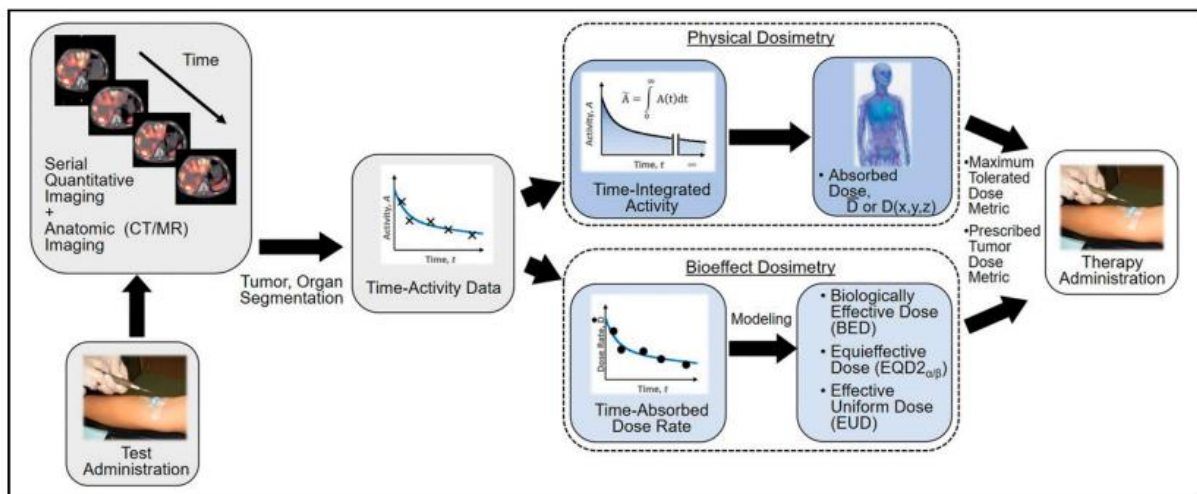


Figura 3: Conjunto de etapas do procedimento dosimétrico realizado na terapia com radionuclídeos. Retirado de (O’donoghue et al., 2022).

A dosimetria à microescala pode ser realizada recorrendo a diferentes ferramentas, incluindo técnicas de cálculo baseadas em modelos matemáticos, simulações computacionais e medições *in vivo* e *in vitro*. O formalismo MIRD, desenvolvido pelo *Committee on Medical Internal Radiation Dose*, é uma metodologia frequentemente utilizada na conversão dos valores da atividade acumulada em doses absorvidas tendo em conta um fator ‘S’, usualmente conhecido por *S-value*, expressivo da dose média absorvida numa região alvo por decaimento. Como tal, este formalismo permite uma melhor perceção da ação da radiação ionizante no material biológico, possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias mais eficazes no tratamento com radionuclídeos (Sciuto et al., 2021; Tamborino et al., 2020).

Assim, qualquer que seja a modalidade terapêutica, a realização de um plano dosimétrico individual e a determinação adequada da atividade a administrar para cada doente, permite estabelecer a dose absorvida em tecidos normais e tumorais e, por conseguinte, antecipar os efeitos

biológicos da radiação, garantindo a maximização da dose de radiação depositada no tecido alvo e a minimização dos efeitos colaterais nos tecidos saudáveis circundantes. Além disso, a previsão da resposta tumoral e da toxicidade após a administração da atividade é também essencial no estabelecimento de qualquer programa terapêutico antitumoral com radionuclídeos (Loke et al., 2011).

1.1.2.1.4. Dosimetria de radiofármacos emissores de partículas alfa

Os radiofármacos emissores de partículas alfa são uma das escolhas na terapia com radionuclídeos devido à sua elevada LET ao longo de um percurso relativamente curto, permitindo assim a deposição de energia de uma forma localizada e o aumento da morte celular desejada. No entanto, quando administrada de forma incorreta, verifica-se a evidente possibilidade de lesão das células saudáveis, tornando-se essencial o estabelecimento da dosimetria para este tipo de radiação (Sgouros & Hobbs, 2014).

O procedimento dosimétrico para radiofármacos emissores de partículas alfa segue o princípio descrito anteriormente, desencadeando-se com a medição da microdistribuição da atividade do radiofármaco num determinado órgão ao longo do tempo. De seguida, é determinada a atividade integrada no tempo, através do cálculo da área abaixo da curva, correspondente à atividade em função do tempo na região alvo após a administração do radionuclídeo, sucedendo-se a conversão do valor previamente obtido em dose absorvida para as diferentes subestruturas do órgão, que tem como base simulações de Monte Carlo (ex. formalismo MIRD). A energia absorvida por unidade de tempo no órgão em estudo, usualmente conhecida por taxa de dose, é proporcional à concentração de atividade quer aí presente, a *self-dose*, quer noutros tecidos dentro do alcance das emissões do radionuclídeo, a *cross-dose*. No entanto, para os radionuclídeos utilizados a nível terapêutico, com destaque para os emissores alfa, a maioria da energia emitida manifesta um curto alcance pelo que a *self-dose* é a contribuição dominante na quantidade de energia absorvida. Na Figura 4 é possível observar a variação do alcance da deposição da dose de radionuclídeos com diferentes modos de decaimento, verificando-se um menor alcance para os emissores alfa o que torna, por conseguinte, a sua dosimetria um desafio a nível imagiológico e a captação não uniforme para casos de doença macroscópica. Desta forma, e para ultrapassar as limitações associadas à aquisição de imagens, têm sido desenvolvidas câmaras-gama com diferentes detetores tecnológicos que permitem obter imagens com uma melhor resolução em energia possibilitando assim, uma melhor determinação dosimétrica (Capala et al., 2021; O'donoghue et al., 2022).

Atualmente, tem-se verificado um crescente aumento na precisão da realização do procedimento dosimétrico tridimensional sendo, no entanto, necessário um *software* e capacidades técnicas especializadas, assim como um período temporal significativo por parte da instituição de tratamento e do doente na realização desta metodologia. Os dados disponíveis sobre a dose-resposta, embora escassos, sugerem que a dosimetria específica do doente ajuda a melhorar a eficácia da terapia com radionuclídeos, quer através da minimização da toxicidade ou da maximização da eficácia. Contudo, são ainda necessários dados adicionais sobre a dose-resposta uma vez que a construção de

uma prescrição baseada na dose no tumor se mantém um desafio, seja pela sua diversidade fenotípica ou pela sua dimensão reduzida perturbadora do seguimento imagiológico (O'donoghue et al., 2022).

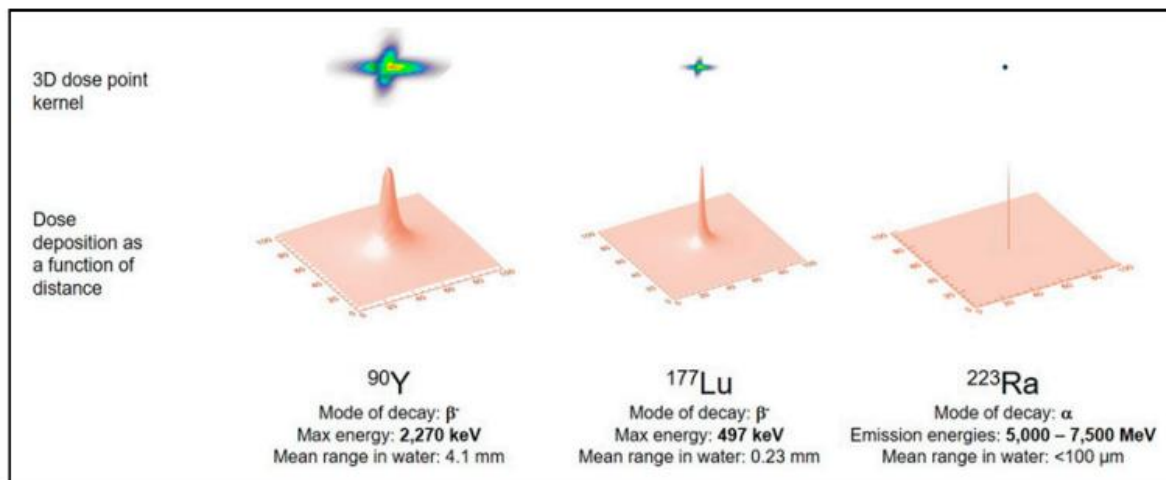


Figura 4: Representação gráfica do alcance da deposição da dose de radionuclídeos com diferentes modos de decaimento. Retirado de (O'donoghue et al., 2022).

1.2. Cancro da próstata metastático resistente à castração

1.2.1. Epidemiologia

O cancro da próstata (CaP) afeta milhões de homens em todo o mundo e ocupa a segunda posição, após o cancro do pulmão, na lista das neoplasias mais frequentemente diagnosticadas em homens (Ferlay et al., 2021). Anualmente, são registados mais de 1 300 000 novos casos desta patologia em todo o mundo, o que corresponde a cerca de 7% dos diagnósticos totais de cancro realizados e a 14% dos diagnósticos correspondentes a cancro no sexo masculino (Figura 5). Além disso, o número total de indivíduos que morre devido a cancro da próstata excede os 350 000, tornando-o assim na quinta neoplasia com maior taxa de mortalidade oncológica nos homens (Rebello et al., 2021).

A nível nacional, e de acordo com os dados disponibilizados pelo *Global Cancer Observatory* em 2020, foram registados cerca de 6 759 novos casos e 1 917 mortes por cancro da próstata, posicionando este tumor maligno como o cancro de maior incidência e o terceiro com maior taxa de mortalidade oncológica no sexo masculino (GLOBOCAN, 2020).

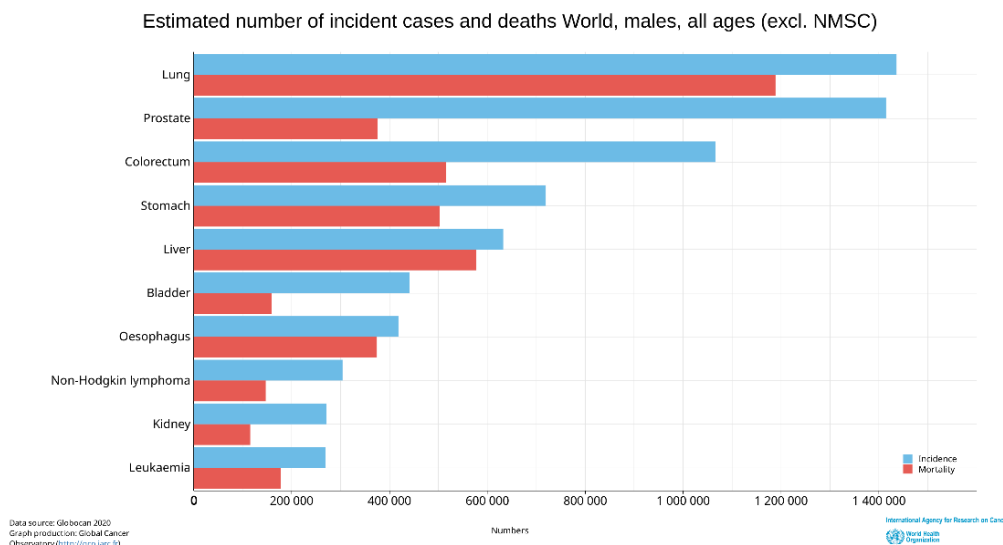


Figura 5: Comparação entre as taxas de incidência e mortalidade, em 2020, por tipo de cancro a nível mundial, no sexo masculino, para todas as idades (Ferlay et al., 2021).

Tanto a taxa de incidência como a de mortalidade associadas ao cancro da próstata são caracterizadas por notáveis variações geográficas (Pernar et al., 2018). De acordo com os dados disponibilizados pela GLOBOCAN no ano de 2020, verifica-se que o risco associado ao desenvolvimento do cancro da próstata aumenta drasticamente com a idade, sendo que mais de 85% dos novos indivíduos diagnosticados têm uma idade superior a 60 anos. Consequentemente, a incidência de cancro da próstata apresenta uma correlação com o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) e com as técnicas de diagnóstico utilizadas, o que se traduz numa maior incidência em países desenvolvidos, como na Europa, nos Estados Unidos da América e no Canadá e uma menor incidência nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como na Ásia Central e na África Subsariana (Rebello et al., 2021). Atualmente, o cancro da próstata é uma das neoplasias com mais casos de mortes associadas e, contrariamente à incidência, apresenta uma taxa de mortalidade superior em regiões com menor grau de desenvolvimento quando comparadas a países desenvolvidos. Contudo, de um modo geral, tem-se verificado uma diminuição da mortalidade associada ao cancro da próstata em diversos países, sobretudo na América do Norte e na Europa Ocidental o que se deve, principalmente, a melhorias e a avanços no rastreio, através de medições dos níveis de antigénio prostático específico (PSA, do inglês *prostate-specific antigen*), no diagnóstico, no estadiamento e no tratamento desta neoplasia (Pernar et al., 2018).

1.2.2. Fatores de risco

O cancro da próstata é classificado clinicamente como uma doença heterogénea, o que significa que tanto se pode estar perante casos de elevada agressividade, como formas de doença com um crescimento mais lento e indolente. Deste modo, a realização de estudos epidemiológicos do cancro da próstata revelou diversos fatores associados à biologia individual de cada ser humano e ao seu estilo de vida que mostram interferir com o risco de desenvolvimento e a sobrevivência a esta doença (Pernar et al., 2018).

Ainda que não sejam totalmente conhecidos, fatores como a idade avançada, a etnia, a história familiar positiva, a presença de mutações genéticas e alterações epigenéticas influenciam

positivamente o desenvolvimento de novos casos de cancro da próstata. Entre estes, o envelhecimento é a principal causa responsável pelo aumento da taxa de incidência, verificando-se um crescimento drástico dos diagnósticos de cancro da próstata em idades superiores a 55 anos e sendo raro o registo de novos casos em indivíduos com idade inferior a 40 anos (Dunn & Kazer, 2011; Pernar et al., 2018). A etnia, mesmo demonstrando uma menor significância, é a segunda causa responsável pela variação da taxa de incidência do cancro da próstata. Desta forma, homens de etnia afro-americana são os que apresentam o maior risco de metastização e maior mortalidade quando comparados com indivíduos caucasianos. Apesar de não estar completamente esclarecido, esta disparidade é pressuposta tendo em conta o aumento dos níveis de testosterona em circulação para populações africanas devendo-se a modificações na expressão de genes associados à manutenção dos níveis da mesma (Zeigler-Johnson et al., 2008 ; Marques, 2016).

Por sua vez, uma história familiar positiva é também responsável pelo aumento significativo do risco de desenvolvimento de cancro da próstata, sendo que cerca de 9% dos homens diagnosticados são familiares de indivíduos que têm ou já tiveram cancro da próstata. Caso o parente seja direto, o risco de incidência aumenta para o dobro e, caso o diagnóstico do mesmo seja realizado antes dos 60 anos, o risco altera-se para o quádruplo (Rebello et al., 2021). Esta condição hereditária pode dever-se sobretudo à possibilidade de ocorrência de mutações em genes envolvidos na reparação do ADN e na supressão tumoral, tais como os genes *BRCA1* (do inglês, *breast cancer 1*) e *BRCA2* (do inglês, *breast cancer 2*) ou em genes envolvidos na sinalização de recetores de androgénios, como o gene *HOXB13* (do inglês, *homeobox B13*) (Rebello et al., 2021). Contudo, tem-se verificado que as mutações em genes envolvidos na reparação do ADN são as que demonstram originar comportamentos clínicos mais agressivos, assim como grande parte dos casos de cancro da próstata que evoluem para estados metastáticos (Mateo et al., 2017). Desta forma, os estudos genéticos tornam-se fulcrais uma vez que a associação de mutações genéticas ao risco de desenvolvimento de cancro poderá ser preponderante para um diagnóstico precoce, originando um tratamento adequado à condição clínica do doente.

A epidemiologia do cancro da próstata é complexa, sobretudo devido à heterogeneidade da patologia. Assim, a prevenção torna-se um desafio dado que os fatores de risco, incluindo a idade, a etnia, a predisposição familiar e as variações genéticas são, basicamente, fatores não modificáveis. Contudo, a adoção de um estilo de vida saudável, evitando hábitos tabágicos e mantendo uma alimentação rica e equilibrada com prática de exercício físico regular, torna-se um comportamento importante não só para diminuir o risco de desenvolvimento de uma neoplasia mais agressiva como também para obter melhores condições de sobrevivência em doentes com cancro da próstata (Pernar et al., 2018).

1.2.3. Diagnóstico e estadiamento

O cancro da próstata é um tumor que, tipicamente, se começa a desenvolver em homens jovens. Contudo, a sintomatologia inicial indicadora da patologia, como a dificuldade ou a demora em começar a urinar, a intermitência da micção, a sensação de bexiga cheia, a poliúria, a noctúria, a hematuria, a incontinência e a dor urinária, apenas surge a partir dos 40-50 anos. Assim, a manifestação tardia dos sintomas, ao provocar um diagnóstico da neoplasia num estado mais avançado, aumenta consequentemente o risco de progressão e metastização da doença, diminuindo

as opções e a eficácia terapêutica, bem como a qualidade de vida dos doentes (Schatten, 2018; Bernardino et al., 2021; Rebello et al., 2021).

Os métodos de rastreio mais frequentemente disponíveis para a deteção precoce de neoplasia prostática são a medição dos níveis de PSA sérico e o toque retal. O PSA é uma protéase produzida essencialmente pelas células epiteliais da próstata que assegura a liquefação do esperma, encontrando-se presente não só nestas células, como também nas restantes células prostáticas e no sangue periférico. Deste modo, a medição dos níveis de PSA é considerada o principal exame de rastreio de cancro da próstata e pode ser realizada através de uma simples análise sanguínea. Através do valor obtido é possível detetar alterações prostáticas uma vez que um valor de PSA superior a 4 ng/mL é considerado anormal. No entanto, o diagnóstico de cancro da próstata não pode ser despistado através da execução deste exame, uma vez que tanto células prostáticas benignas como malignas têm a capacidade de produção deste biomarcador. Assim, um aumento dos níveis de PSA pode também estar associado a outras condições, incluindo a prostatite, a hiperplasia benigna da próstata, o aumento do volume prostático associado à idade e outras condições urológicas ou efeitos provocados por certos medicamentos. Desta forma, ainda que a medição dos níveis de PSA seja um procedimento indiscutível, esta não pode ser considerada isoladamente para afirmar o diagnóstico de cancro da próstata uma vez que cerca de 65-70% dos indivíduos cujos níveis séricos de PSA ultrapassem o valor de referência apresentam um diagnóstico negativo após realização de biopsia. Além do mais, dado que cerca de 15% dos homens afetados manifestam valores de PSA inferiores a 4 ng/mL, tornou-se imperativo o desenvolvimento de exames de diagnóstico adicionais que demonstrem maior precisão e especificidade na deteção do neoplasia da próstata (Dunn & Kazer, 2011; Daniyal et al., 2014; Bernardino et al., 2021; Rebello et al., 2021).

Adicionalmente à determinação dos níveis de PSA, o toque retal é um exame de rastreio que consiste na palpação física da próstata através do reto, permitindo avaliar a dimensão da glândula, a textura, a rigidez e a sua sensibilidade. Estes dois exames são as principais técnicas de rastreio do cancro da próstata, devendo ser realizados anualmente em homens a partir dos 45 anos, caso sejam considerados como indivíduos de risco, ou, para homens não pertencentes a esse grupo, uma avaliação anual iniciada aos 50 anos. Caso se verifique alguma anomalia ou suspeita nos resultados de qualquer um dos exames referidos anteriormente, procede-se com a realização de outras técnicas, como a biopsia prostática, ou exames imagiológicos, como a imagem por RM. A biopsia prostática é um procedimento guiado por ecografia em que, após a inserção de uma agulha através do reto, se remove uma amostra de tecido da próstata que permitirá não só a confirmação do diagnóstico, mas também a identificação histológica do tumor e a determinação do grau de agressividade do mesmo. Após este procedimento, se o resultado da biopsia não confirmar a presença de cancro da próstata e os níveis séricos de PSA permanecerem elevados, pode-se ainda proceder à deteção do mRNA (do inglês, *messenger ribonucleic acid*) do *gene 3 do cancro da próstata (PCA3)*. Este ensaio é realizado na primeira urina logo após o toque retal e, caso apresente um valor significativo, é aconselhada a realização de uma nova biopsia (Dunn & Kazer, 2011; Rebello et al., 2021).

A avaliação da extensão do tumor é realizada com o auxílio de métodos não invasivos, como as técnicas de imagem, nomeadamente a RM, a TC e a medicina nuclear, quer de fotão único, quer de positrões. Cada um destes métodos é indicado em condições diferentes sendo que, por norma, a RM é realizada para avaliar localmente o tumor, assim como a sua extensão loco-regional (Reese, 2016).

Para doentes que manifestam concentrações elevadas de PSA é recomendada a TC, de forma a verificar a possibilidade de disseminação tumoral para os gânglios linfáticos proximais. Relativamente à cintigrafia óssea com derivados de fosfonatos marcados com tecnécio-99 metastável (^{99m}Tc), esta é aconselhada para deteção de metástases ósseas. Por último, a realização da PET tem demonstrado um importante papel no estadiamento do cancro da próstata, nomeadamente através da utilização de radiotraçadores com afinidade para as células do cancro da próstata. De entre eles, destacam-se os derivados de colina marcados com flúor-18 (^{18}F) ou, de forma mais limitada, com carbono-11 (^{11}C), e ainda o fluoreto de sódio, utilizado na deteção de metástases ósseas (Weidner et al., 2009; Marques, 2016; Schatten, 2018).

Ainda que seja expectável que cada patologia apresente comportamentos particulares, o ser humano é detentor de características próprias que podem condicionar o aparecimento de novas variáveis influenciadoras de todo o processo evolutivo da doença. Desta forma, o estadiamento tumoral é frequentemente realizado com o objetivo de caracterizar a extensão do tumor, assim como o seu nível de agressividade, permitindo uma melhor definição do prognóstico do doente e possibilitando o ajuste de um tratamento individualizado (Siegel et al., 2020).

De acordo com o sistema de classificação TNM (do inglês, *tumour, nodes and metastasis*), desenvolvido pela *American Joint Committee on Cancer* e pela *International Union Against Cancer*, é possível proceder à classificação dos cancros pela dimensão e extensão do tumor primário *in situ* ou para tecidos vizinhos (T), pela propagação para gânglios linfáticos proximais (N) e pela ocorrência de metastização à distância (M). No diagnóstico de cancro da próstata, estima-se que cerca de 80% dos casos correspondam a neoplasias confinadas ao órgão, isto é, totalmente localizadas na próstata, 15% dos casos revelam metástases nos gânglios linfáticos proximais e os 5% restantes apresentam metastizações à distância (Figura 6) (Reese, 2016; Mayor de Castro et al., 2018; Rebello et al., 2021).

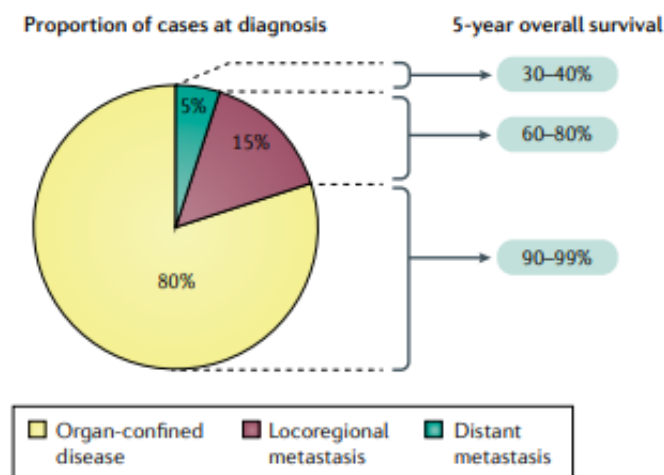


Figura 6: Distribuição do estágio da neoplasia quando diagnosticada e relação do mesmo com a sobrevivência em 5 anos. Retirado de (Rebello et al., 2021).

1.2.4. Evolução do cancro da próstata

Ainda que se tenha vindo a verificar um aumento da taxa de sobrevivência a longo prazo para casos de cancro da próstata localizado, a evolução da doença para estádios avançados permanece um desafio devido à sua resistência terapêutica e elevada letalidade (G. Wang et al., 2018; He et al., 2020). A progressão do cancro da próstata é variável de doente para doente e existem diferentes cenários associados ao seu desenvolvimento. No entanto, em termos gerais, a resistência à castração e o processo de metastização correspondem a estádios avançados do cancro da próstata podendo ocorrer de forma simultânea ou sequencialmente, dependendo das características do tumor e da resposta ao tratamento (Dunn & Kazer, 2011; Rebello et al., 2021).

1.2.4.1. A influência dos recetores de androgénios

Os androgénios representam um conjunto de hormonas esteroides e desempenham um papel fundamental a nível fisiológico, sendo responsáveis por diversas respostas biológicas associadas à diferenciação e ao crescimento das células da próstata. Contudo, como a sua biossíntese é um processo extremamente complexo que envolve um elevado número de enzimas, erros nesta etapa podem originar níveis anormais destas hormonas no sangue e ativar os recetores de androgénios (RA) de forma inadequada. Assim, esta condição pode interferir indiretamente no desenvolvimento do epitélio prostático através da indução de fatores de crescimento no estroma adjacente, estimulando a proliferação celular epitelial e, por conseguinte, originar casos de hiperplasia ou cancro (Heinlein & Chang, 2004; Lee et al., 2011; Zhang et al., 2022).

A testosterona é o androgénio circulante em maior abundância no homem e é produzida maioritariamente pelas células de *Leydig*, nos testículos e, em menor quantidade, pelo córtex da glândula suprarrenal. A sua síntese é regulada através de mecanismos de *feedback* negativo pela hormona luteinizante (LH, do inglês *luteinizing hormone*), produzida na hipófise anterior, que, por sua vez é dependente dos níveis da hormona libertadora de gonadotropinas (GnRH, do inglês *gonadotropin-releasing hormone*). Devido às propriedades hidrofóbicas dos androgénios, cerca de 98% da testosterona circulante no sangue encontra-se ligada a globulinas transportadoras de hormonas sexuais, a albuminas ou a globulinas ligantes de corticoides, enquanto a restante circula de forma livre. No entanto, apenas a testosterona livre tem a capacidade de penetração das células da próstata sendo, posteriormente, convertida em 5 α -dihidrotestosterona (DHT) através de um processo que envolve a enzima 5 α -redutase. Por sua vez, a DHT é uma hormona detentora de um elevado potencial agonista pelos recetores de androgénios (cerca de 5 vezes superior à testosterona) e, ao associar-se aos RA, tem a capacidade de induzir alterações conformacionais responsáveis pela fosforilação e pela translocação dos mesmos do citoplasma para o núcleo. Assim, esta interação permite estabelecer uma ligação entre a região promotora dos genes regulados por androgénios e os RA, favorecendo não só o crescimento, a proliferação e a diferenciação das células da próstata, mas também a produção de PSA (Stuchbery et al., 2017; Fernandes, 2022; Zhang et al., 2022).

Deste modo, uma vez que os androgénios são ligandos para os RA que permitem ativar a sua função transcricional, a sua interação torna-se fundamental para o normal funcionamento da próstata. Todavia, em situações anormais, são também responsáveis pela transformação maligna, sobrevivência e proliferação das células de cancro da próstata, tornando-as, por isso, hormonodependentes. Dada esta dependência androgénica do cancro da próstata, a terapia

hormonal ou a terapia de privação androgénica (ADT, do inglês *androgen-deprivation therapy*) são considerados os métodos terapêuticos mais aconselhados para esta patologia. Ambas as terapias se baseiam na castração química ou cirúrgica, com foco no decréscimo da proliferação celular tumoral e subsequente indução de apoptose através da eliminação dos níveis de androgénios testiculares (Mansinho et al., 2018; Rebello et al., 2021; Zhang et al., 2022).

1.2.4.2. Resistência à castração

Embora a terapia de privação androgénica, ao reduzir os níveis de testosterona sérica para valores inferiores a 50 ng/dL, seja considerada como um dos pilares no tratamento do cancro da próstata, nem sempre manifesta efeitos terapêuticos de longa duração. Assim, ainda que nos primeiros meses de hormonoterapia se verifique um decréscimo dos níveis de PSA, sensivelmente 2 anos após o início dos tratamentos, cerca de 70% dos doentes manifestam evidências de evolução do cancro para um estágio avançado, passando o mesmo a designar-se por cancro da próstata resistente à castração (CPRC). Para estes casos, a resposta dos doentes à ADT deixa de ser eficaz e, além do aparecimento de metástases ou do aumento dos níveis séricos de PSA, verificam-se também alterações na síntese e no metabolismo dos androgénios (Stuchbery et al., 2017; Zhang et al., 2022).

A resistência à castração, mesmo não estando esclarecida na totalidade nem associada a um único mecanismo, pode estar intimamente relacionada com o aumento da atividade dos RA (Sharifi, 2013). Deste modo, a evolução do cancro da próstata para o cancro da próstata resistente à castração apresenta diversas justificações, como é o caso da ocorrência de mutações genéticas dos RA, predominantemente caracterizadas pela substituição dos aminoácidos no domínio de ligação, originando RA mutados com menor seletividade e especificidade e que, como consequência, se tornam mais sensíveis a outros tipos de ligandos de natureza não androgénica, incluindo estrogénios e glicocorticoides. O desenvolvimento da resistência pode também dever-se a eventos de *splicing* alternativo e a modificações pós translacionais dos RA, processos responsáveis pela ativação dos recetores com níveis reduzidos de testosterona restantes da castração. Além disso, o aumento da expressão dos recetores nas células tumorais integra também o conjunto de fatores associados à resistência à castração, sendo responsável pelo desenvolvimento de uma maior sensibilidade dos RA aos androgénios e pelo aumento da síntese intratumoral da DHT para níveis convenientes à reativação dos RA (Desai et al., 2021; Fernandes, 2022; Rebello et al., 2021).

1.2.4.3. Processo de metastização

A evolução do cancro da próstata para um estágio metastático verifica-se em cerca de 20-30% dos doentes com cancro da próstata localizado e, ainda que por vezes não existam tratamentos eficazes para esta patologia, diversas opções terapêuticas são realizadas com os objetivos principais de minorar a progressão do tumor, assim como prolongar e melhorar a qualidade de vida do doente (Reese, 2016).

Cerca de 90% dos casos de cancro da próstata resistente à castração progredem para estádios metastáticos, ocorrendo essencialmente a partir das células resistentes à castração. Em termos de sobrevida e, enquanto indivíduos com cancro da próstata resistente à castração apresentam uma sobrevida média entre os 9 e os 30 meses, os doentes com cancro da próstata metastático resistente à castração reduzem-na para apenas 9 a 13 meses (Schatten, 2018; G. Wang et al., 2018). Nestes casos de progressão, a resistência à ADT torna-se evidente verificando-se, simultaneamente, uma progressão patológica para outras zonas do organismo. Frequentemente, os gânglios linfáticos adjacentes ao tumor principal são os primeiros locais de metastização, seguindo-se o fígado, os pulmões e, principalmente, os ossos (Figura 7) (G. Wang et al., 2018; Fernandes, 222).

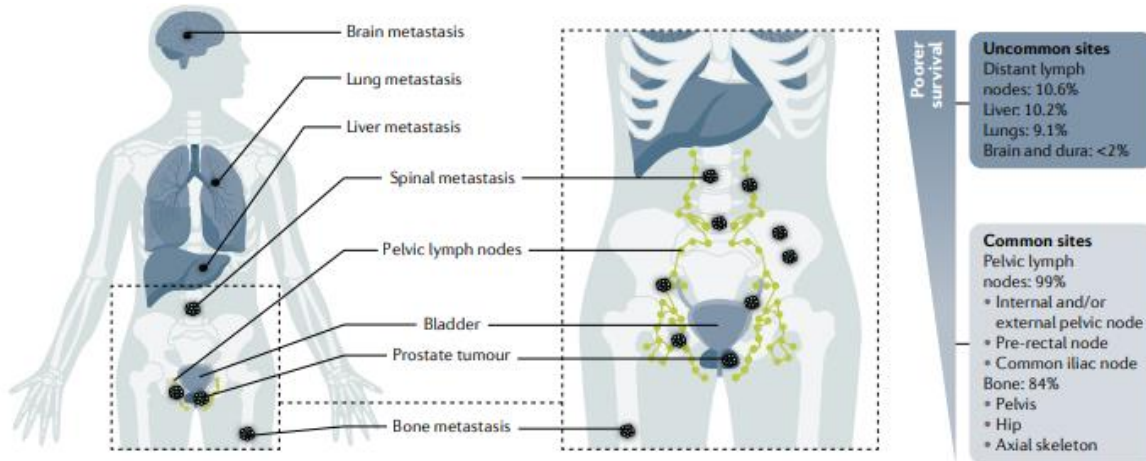


Figura 7: Locais comuns de disseminação metastática para casos de cancro da próstata avançado. Retirado de (Rebello et al., 2021).

A metastização é um processo envolvente de uma série de etapas simultâneas parcialmente sobrepostas que, apesar de ocorrer rapidamente em estádios iniciais da doença, pode requerer algum tempo até à sua manifestação clínica (Figura 8) (Valastyan & Weinberg, 2011). Desta forma, a propagação celular a partir do tumor primário inicia-se com a migração das células tumorais através do estroma do tumor principal, seguindo-se da sua disseminação para a corrente sanguínea. Uma vez presentes no sistema circulatório, as células tumorais estarão sujeitas a ataques imunológicos e, apenas as resistentes a esse mecanismo de defesa, terão a capacidade de extravasar da barreira endotelial e de colonizar nos locais de desenvolvimento tumoral secundário. Este último processo pode ocorrer imediatamente ou estar sujeito a um período de dormência, o que significa que, em certos intervalos de tempo, as células tumorais podem manifestar uma baixa atividade proliferativa enquanto noutros períodos podem retomar o seu crescimento com uma velocidade superior (Marques, 2016; Suhail et al., 2019; Coleman et al., 2020; Klein, 2020; Fernandes, 2022; Fu et al., 2023).

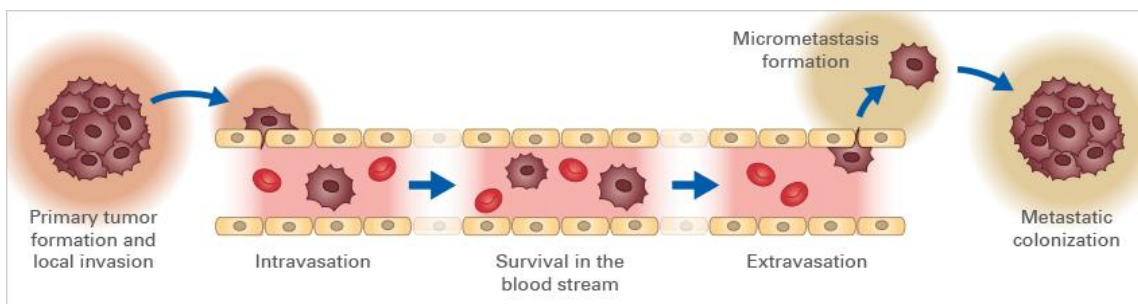


Figura 8: Conjunto de etapas representativas do processo de metastização. Retirado de (Valastyan & Weinberg, 2011).

As metástases ósseas do cancro da próstata afetam mais de 80% dos doentes com cancro da próstata metastático resistente à castração ocorrendo principalmente em ossos ricos em medula vermelha, um tecido altamente vascular com um microambiente promotor do crescimento celular, e em ossos trabeculares, nomeadamente nas costelas, nas vértebras, na pélvis e nas extremidades de ossos longos. Estas lesões comprometem a qualidade de vida dos doentes, uma vez que são responsáveis pelo aparecimento de várias complicações, incluindo dor intensa, compressão da medula espinhal, hipercalcemia e fraturas frequentes (Fornetti et al., 2018; Coleman et al., 2020; Rebello et al., 2021).

O mecanismo de metastização óssea é um processo complexo que envolve interações entre as células tumorais e as células ósseas. O osso é um tecido conjuntivo altamente vascularizado e inervado, constituído por diversos tipos de células que desempenham um conjunto de funções fundamentais no suporte estrutural e no movimento humano reservando minerais e a medula óssea, o principal local da hematopoiese pós-natal. O tecido ósseo é composto por uma parte orgânica, que inclui o colagénio do tipo I, proteínas não colagénicas e lípidos, e por uma parte inorgânica, em maior quantidade, constituída essencialmente por cristais de hidroxiapatite, compostos por sais minerais como cálcio e fósforo, que conferem maior resistência aos ossos. Cada um destes constituintes é passível de variações com a idade, género e estado de saúde, pelo que alterações significativas dos mesmos podem ser indicadoras de patologias associadas (Fornetti et al., 2018; Pereira, 2010).

A formação e a regeneração óssea são asseguradas pelos osteoblastos, células responsáveis pela síntese do colagénio do tipo I, da matriz óssea e de diversas proteínas não colagénicas como a osteopontina, a osteocalcina e a sialoproteína. Por sua vez, os osteoclastos caracterizam-se por serem células gigantes multinucleadas altamente especializadas nos processos de reabsorção da matriz óssea. No entanto, o processo de diferenciação osteoclástica pressupõe a necessidade da interação entre fatores de diferenciação e de ativação, nomeadamente uma proteína e um recetor transmembranares, a RANKL (do inglês, *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*) e o RANK (do inglês, *receptor activator of nuclear factor- κ B*), respetivamente. Assim, a interação da RANKL com o RANK originará a maturação dos osteoclastos sendo um fator crucial no processo da osteoclastogénese. Os osteoblastos, além da RANKL, sintetizam ainda uma outra proteína, a osteoprotegerina (OPG), cuja síntese bloqueará a ligação da RANKL ao seu recetor, reduzindo, conseqüentemente, a reabsorção óssea. Esta relação permite então verificar que os osteoclastos, conjuntamente com os osteoblastos, apresentam um papel fundamental na manutenção da integridade normal do osso (Pereira, 2010; Fornetti et al., 2018; Furesi et al., 2021).

O processo de metastização óssea pode originar lesões osteoclásticas ou osteoblásticas, estando as segundas predominantemente associadas ao cancro da próstata (Figura 9). Desta forma, ao colonizarem o tecido ósseo, as células do cancro da próstata induzem a produção de fatores de crescimento osteoblástico que, por sua vez, estimulam a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos. Conseqüentemente, o aumento da atividade osteoblástica, ao induzir a secreção de RANKL, promove a osteoclastogénese. No entanto, o aumento da atividade osteoclástica, ao estimular a expressão de fatores de crescimento, assegurará a proliferação e a sobrevivência tumoral, estabelecendo um mecanismo de *feedback* positivo entre células tumorais, osteoblastos e osteoclastos. Assim, todo este conjunto de interações promoverá a desregulação do equilíbrio de

regeneração e reabsorção óssea, impactando no processo de metastização (Coleman et al., 2020; Fernandes, 2022; Fornetti et al., 2018).

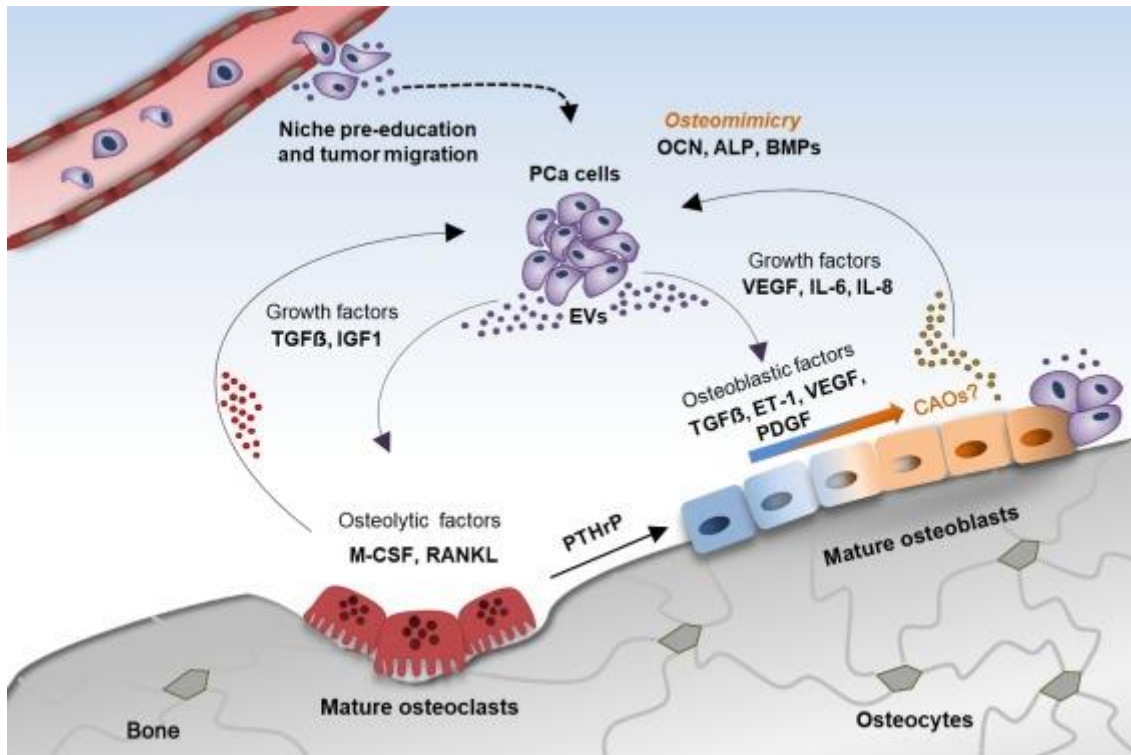


Figura 9: Representação do processo de metastização óssea. O “ciclo vicioso” gerado pelo mecanismo de feedback positivo entre as células tumorais, os osteoblastos e os osteoclastos permite a progressão metastática. Retirado de (Furesi. Et al, 2021).

1.2.5. Terapêutica

A escolha do método terapêutico a adotar é um processo dependente de fatores como o estadiamento, a idade, o estado de saúde, as opções do doente, os efeitos secundários de cada tratamento e a probabilidade de cura. Desta forma, não é possível afirmar a existência de uma terapia ideal para o cancro da próstata sendo que, para certos casos, se verifica a combinação de várias abordagens terapêuticas com o objetivo de potenciar os resultados de várias técnicas (Dunn & Kazer, 2011).

Em doentes com cancro da próstata metastático resistente à castração grande parte das alternativas terapêuticas são de carácter paliativo e recorrem a fármacos antitumorais administrados por via oral ou endovenosa. O docetaxel é o agente quimioterapêutico *standard* para estes casos e, ao estabelecer uma ligação com as subunidades da tubulina, impede a ligação destas aos microtúbulos, afetando a mitose e promovendo a morte celular. Quando se verifica a resistência ao docetaxel e o tumor progride, é indicado o tratamento com outro taxano, o cabazitaxel. No entanto, o recurso a estes compostos é frequentemente associado a eventos tóxicos, nomeadamente à toxicidade hematológica (anemia e neutropenia), gastrointestinal (náuseas e diarreia) e neuropatia, limitando o seu uso terapêutico em doentes com um estado de saúde mais vulnerável. Além da quimioterapia, a imunoterapia apresenta-se como uma alternativa para doentes com cancro da

próstata metastático resistente à castração sendo um tipo de tratamento que auxilia o sistema imunológico a aumentar a sua eficácia para detetar ou atrasar o crescimento das células de cancro da próstata (Brito & Etchebehere, 2020; Rebello et al., 2021).

Os ossos são um dos maiores alvos de metastização nos doentes com cancro da próstata metastático resistente à castração. Assim, e dada a agressividade das metástases ósseas, prevenir e diminuir a velocidade de progressão celular maligna para este tecido torna-se um fator de elevada importância. Ainda que não impeçam totalmente a progressão do cancro da próstata, os bifosfonatos são uma opção terapêutica e demonstram um efeito paliativo no cancro da próstata avançado. O ácido zoledrónico é um desses bifosfonatos e, dada a sua semelhança estrutural com o pirofosfato, permite a inibição da atividade osteoclástica, induzindo a sua apoptose (Yuen et al., 2006).

Atualmente, os radiofármacos dirigidos ao osso têm-se também manifestado como uma possível opção terapêutica devido à sua capacidade de deposição de radiação nas metástases ósseas sem comprometimento dos tecidos vizinhos. No entanto, mesmo que associados a um decréscimo do número de células sanguíneas, provocando o aumento do risco de infeções e hemorragias, apresentam uma boa eficácia no tratamento paliativo, aliviando a dor e melhorando a qualidade e o tempo de sobrevivência dos doentes. Entre estes radiofármacos, destacam-se os emissores beta (β), como o estrôncio-89 (^{89}Sr) na forma de dicloreto ($^{89}\text{SrCl}_2$) e o ácido etilenodiaminotetrametileno fosfórico marcado com samário-153 ($^{153}\text{Sm-EDTMP}$), e o emissor alfa (α) rádio-223 (^{223}Ra) na forma de dicloreto ($^{223}\text{RaCl}_2$), que tem vindo a ser alvo de diversos estudos devido ao seu potencial terapêutico no tratamento de doentes com cancro da próstata metastizado resistente à castração. Mais recentemente, surgiram os radiofármacos $^{225}\text{Ac-PSMA}$ (emissor α) e o $^{177}\text{Lu-PSMA}$ (emissor β), dirigidos ao recetor PSMA (Sekhoacha et al., 2022).

1.3. O rádio-223 no CPMRC

Desde 2013, após aprovação pela FDA (*Food and Drug Administration*) e pela EMA (*European Medicines Agency*), o radiofármaco dicloreto de rádio-223 ($^{223}\text{RaCl}_2$, Xofigo®), é uma opção terapêutica para doentes com cancro da próstata metastático resistente à castração que apresentam metástases ósseas, mas não evidenciam metástases viscerais. Este radiofármaco, ao manifestar propriedades mímicas do ião cálcio e ao emitir predominantemente partículas alfa, apresenta efeitos radiobiológicos baseados sobretudo no dano direto na molécula de ADN de células tumorais, em específico a quebra da sua cadeia dupla (Figura 10). Consequentemente, verificar-se-á a indução de efeitos citotóxicos independentes da concentração de oxigénio, o que se torna particularmente vantajoso em condições hipóxicas, tal como acontece nas células ósseas (Deshayes et al., 2017; Parker et al., 2013). Desta forma, ao ser incorporado na matriz óssea, um local de mineralização ativa, o rádio-223 tornou-se no primeiro agente terapêutico emissor alfa a demonstrar um impacto significativo no aumento da sobrevivência dos doentes, através da melhoria da qualidade de vida, do alívio da dor e do atraso do aparecimento de eventos esqueléticos, tais como a fratura ou a compressão da medula espinhal (Parker et al., 2013; Sciuto et al., 2021).

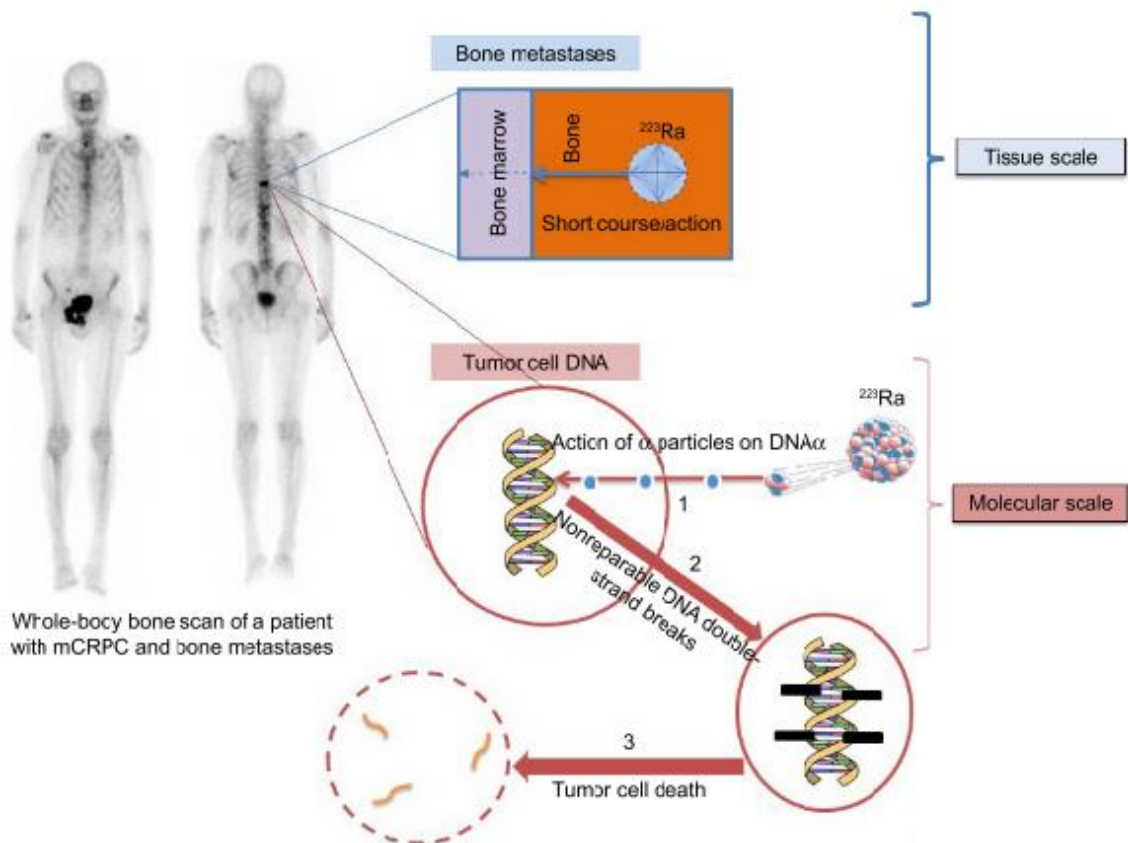


Figura 10: Efeitos radiobiológicos do rádio-223 em doentes com CPMRC com metástases ósseas ocorridas ao nível do tecido e a nível molecular. Retirado de (Deshayes et al., 2017).

1.3.1. Características do rádio-223

O rádio-223 é um radioisótopo presente em pequena quantidade na natureza que, ao longo das suas seis fases de decaimento, liberta cerca de 95,3% da sua energia sob a forma de partículas alfa com uma energia média de 5,87 MeV e com um poder de penetração de, aproximadamente, 70 μm (O'Donoghue et al., 2022). Além disso, durante o processo de decaimento até atingir o isótopo estável chumbo-207, ocorre também a emissão de uma pequena percentagem da sua energia através de partículas beta (3,6%) e de radiação gama (1,1%), adequada em termos de radioproteção e útil na obtenção de imagens cintigráficas (Figura 11) (Abou et al., 2016). No entanto, ainda que seja possível obter este radioisótopo de forma natural a partir do decaimento do urânio-235, devido à sua limitada abundância, é comum o recurso ao sistema de gerador de actínio-227 – tório-227 ($^{227}\text{Ac} - ^{227}\text{Th}$) para a sua produção numa maior quantidade (Deshayes et al., 2017; Guerra Liberal et al., 2020).

Atualmente, este elemento químico tem demonstrado elevado interesse a nível terapêutico, não só graças ao seu período de semidesintegração de 11,4 dias, que assegura o tempo suficiente para realizar toda a logística inerente à sua preparação, distribuição e administração, mas também devido às suas propriedades químicas. Além disso, por ser um elemento alcalinoterroso, o rádio-223 demonstra particularidades similares a outros metais do mesmo grupo, nomeadamente o magnésio e o cálcio, sendo facilmente absorvido pelas células ósseas e, por isso, um grande promissor no tratamento de metástases ósseas (Parker et al., 2018; Guerra Liberal et al., 2020).

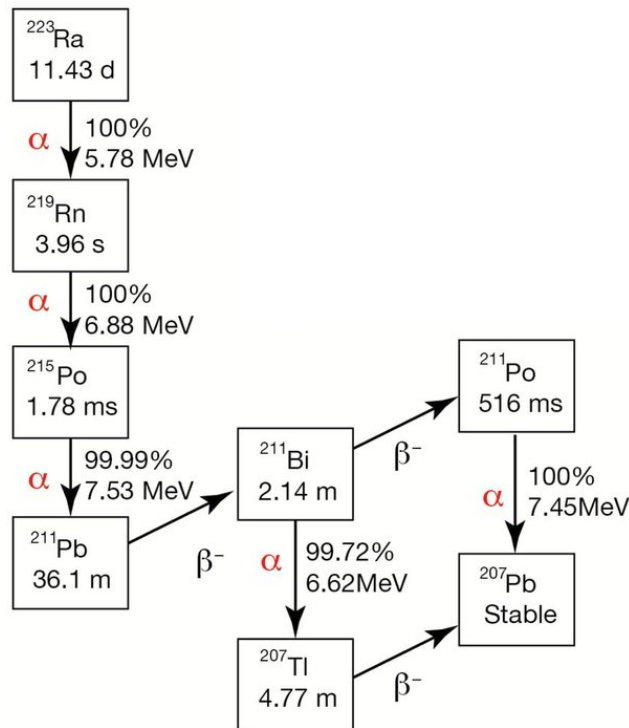


Figura 11: Representação esquemática do decaimento do rádio-223. Retirado de (Abou et al., 2016).

1.3.2. Administração, farmacocinética e mecanismo de ação

O dicloreto de rádio-223 é uma solução injetável isotônica límpida e incolor, cujo pH varia entre 6,0 e 8,0. Após a sua produção é distribuído em frascos-ampola de 6 mL, conservados em potes de chumbo e plástico, e apresenta uma atividade específica inicial de 1 100 kBq/mL, correspondendo a 0,58 ng de rádio-223 na data de referência. O procedimento terapêutico, efetuado em ambientes clínicos específicos de modo a assegurar todas as condições de radioproteção, é realizado através de uma injeção intravenosa lenta, com a duração de cerca de 1 minuto, a cada 4 semanas num total de 6 injeções, cada uma com atividade de 55 kBq/kg (European Medicines Agency, 2013).

Após o processo de administração, o rádio-223 atua como um análogo do cálcio verificando-se a sua incorporação em regiões de mineralização ativa com uma elevada atividade osteoblástica, ou seja, no osso e nas metástases ósseas de cancro da próstata. Além disso, dado o baixo poder de penetração das partículas alfa, apenas um volume reduzido da medula vermelha e do trato gastrointestinal estão sujeitos à absorção de uma dose significativa de radiação. O pico de absorção do rádio-223 é dependente da intensidade do metabolismo ósseo e ocorre cerca de 1 hora após a injeção, sem redistribuição subsequente. A excreção do radiofármaco realiza-se maioritariamente por via fecal ou, ainda que em menor percentagem (cerca de 5%), por via urinária. Desta forma, verifica-se uma rápida excreção sanguínea, pelo que 24 horas depois do início do tratamento apenas 1% da atividade injetada permanece em circulação. A eliminação e a metabolização do rádio-223 são processos que não dependem das funções renal e hepática não se verificando, por isso, eventos nefrotóxicos nem hepatotóxicos. No entanto, ainda que a ocorrência de efeitos secundários seja

mínima, em certas situações, podem surgir casos de anemia, trombocitopenia, neutropenia, dor óssea, náuseas, fadiga e diarreia (Deshayes et al., 2017; Brito & Etchebehere, 2020).

A ligação do radiofármaco à superfície óssea ocorre através da sua incorporação ativa por osteoblastos e da substituição do cálcio pelo rádio-223 nos complexos de hidroxiapatite, preferencialmente em áreas de renovação óssea. Seguidamente à sua deposição nestes locais, verifica-se a libertação de partículas alfa altamente energéticas indutoras de dois modos de ação, a morte das células tumorais e a supressão do desenvolvimento de metástases ósseas, responsáveis pelo efeito terapêutico do rádio-223. Assim, se por um lado, a emissão de energia de elevada LET é responsável por um efeito citotóxico no ADN, através da quebra da cadeia dupla que levam a lesões e morte celular, por outro, verifica-se que a interação das partículas emitidas com as células ósseas é responsável pela modificação do mecanismo de *feedback* positivo, interferindo no processo de formação óssea. Além disso, verifica-se ainda que a diferenciação dos osteoclastos é inibida de acordo com a atividade administrada. Este efeito provém diretamente do efeito das partículas alfa emitidas, indiretamente da inibição da secreção de RANKL por osteoblastos ou, por vezes, pelos dois mecanismos em simultâneo. Como consequência, este conjunto de alterações promoverá a supressão do crescimento tumoral e do processo de metastização, permitindo a reversão da progressão do cancro da próstata e, desta forma, a estabilização do ciclo celular e do equilíbrio de regeneração e reabsorção óssea. O mecanismo de ação do rádio-223 nas metástases ósseas encontra-se esquematizado na Figura 12 (M. J. Morris et al., 2019; Suominen et al., 2019; Brito & Etchebehere, 2020).

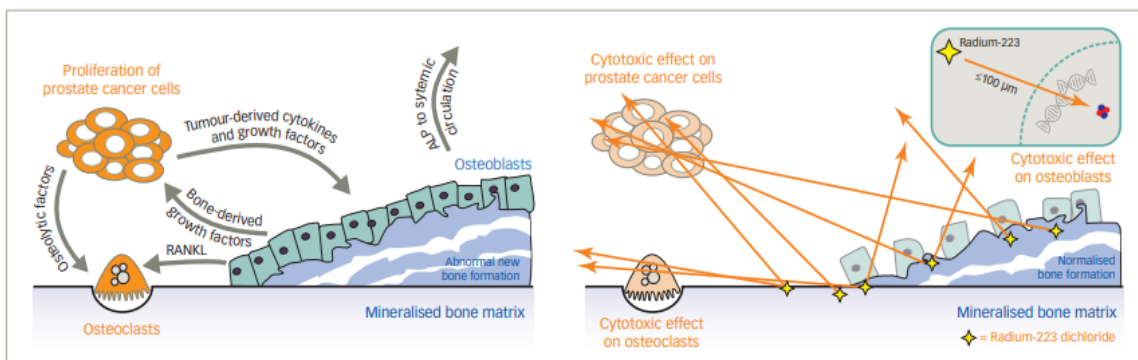


Figura 12: Mecanismo de ação do rádio-223 nas metástases ósseas – efeito citotóxico nas células de CaP, nos osteoclastos e nos osteoblasto. Retirado de (O’Sullivan, 2017).

Atualmente, tem-se verificado o desenvolvimento de diversos estudos clínicos para avaliar e melhorar a eficácia do rádio-223 no tratamento de doentes com cancro da próstata metastático resistente à castração, denotando-se que a combinação do tratamento com rádio-223 e outras terapias antitumorais, assim como a inibição dos mecanismos reparadores de erros no ADN, dos pontos de controlo do ciclo celular ou da administração de ácido zoledrónico, apresentam resultados promissores no alcance desta finalidade (O’Sullivan, 2017; Suominen et al., 2019; Chen et al., 2023; Deshayes et al., 2023).

1.3.3. Dosimetria

Na atualidade, a dose de radiofármaco administrada apenas é ajustada de acordo com a massa do doente, um parâmetro que, por vezes, pode não ser o mais adequado devido à diferente massa

óssea que indivíduos com a mesma massa corporal possam apresentar (Brito & Etchebehere, 2020). Desta forma, o número de metástases ósseas e a idade poderão ser fatores preponderantes no cálculo dosimétrico devido à maior taxa de toxicidade demonstrada por doentes mais jovens. Possivelmente, esta condição pode ter origem pelo recurso prévio aos tratamentos com taxanos que, ao perturbarem o sistema imunitário, provocam um decréscimo da eficácia terapêutica comparativamente a doentes pertencentes a uma faixa etária superior, não sujeitos a terapias com este tipo de fármacos (Brito & Etchebehere, 2020).

Relativamente à dosimetria do rádio-223, a superfície óssea é a região que apresenta maior dose recebida após a injeção do radiofármaco em dose terapêutica, seguindo-se a medula óssea vermelha e a parede inferior do intestino (Tabela 1) (Deshayes et al., 2017; Jadvar & Quinn, 2013; Pandit-Taskar et al., 2014; Deshayes et al., 2017).

Tabela 1: Dosimetria do rádio-223. Adaptado de (Pandit-Taskar et al., 2014).

Órgão	cGy/37 MBq
Superfície óssea	4 262,60
Medula óssea vermelha	513,51
Parede inferior do intestino	171,88
Parede da bexiga	14,9
Rim	11,86
Ovários	1,8
Parede uterina	0,94
Testículos	0,31

Devido à variação anatomofisiológica das diferentes subestruturas do corpo humano, das propriedades bioquímicas dos radiofármacos e do tipo de radiação que emitem, a distribuição dos radionuclídeos e a deposição da sua energia dentro de um órgão ou tecido podem estar sujeitas a uma grande heterogeneidade. Assim, a dosimetria de radiofármacos, e em particular do rádio-223, manifesta elevada importância na otimização do planeamento da terapia com radionuclídeos, permitindo obter uma relação dose-resposta no organismo e, deste modo, avaliar a eficácia e a toxicidade do tratamento. No entanto, os efeitos radiobiológicos *in vitro* são usualmente expressos em função das atividades volúmicas administradas (em Bq/mL), tornando-se, por isso, necessário proceder à sua conversão para valores de dose absorvida. Por sua vez, a dose absorvida por cada órgão (expressa em Gy) é definida como a energia depositada por unidade de massa e é dependente da farmacocinética do radiofármaco e do órgão em estudo, sendo conveniente o recurso a ferramentas adequadas à modelação da distribuição do radiofármaco em estruturas tridimensionais para obter os seus valores representativos (Tamborino et al., 2020; Sciuto et al., 2021).

No caso da terapia realizada com o rádio-223, o curto alcance das partículas alfa emitidas é responsável por uma distribuição de dose não uniforme no tecido ósseo, verificando-se que apenas células deste tecido localizadas num intervalo de cerca de 70-80 µm a partir da superfície óssea são

irradiadas. Assim, é expectável um maior valor de dose local absorvida nesta região do que a dose média absorvida não sendo, por isso, este último valor uma boa predição dos efeitos biológicos. Por este motivo, o estudo do efeito da dose no tecido ósseo requer a consideração da heterogeneidade da distribuição de dose em microescala. Além disso, devido à elevada emissão de partículas alfa (95,3%) e à insignificante emissão gama, a obtenção de imagens para a determinação da distribuição e da cinética do rádio-223 torna-se um obstáculo, comprometendo a determinação das regiões de interesse para quantificar a atividade de rádio-223 presente numa determinada região e, conseqüentemente, o cálculo da atividade integrada no tempo (Flux, 2017; W. B. Li et al., 2022).

Até ao momento, foram realizados diversos estudos com o objetivo de avaliar os efeitos radiobiológicos das partículas alfa em diferentes linhas celulares, sendo exemplo disso o ensaio clonogénico, o ensaio cometa, o cálculo da dose absorvida através das simulações de Monte-Carlo ou diversas técnicas microscópicas (Schumann et al., 2018; Bannik et al., 2019; Diniz Filho et al., 2023). No entanto, e apesar do crescente número de estudos desenvolvidos, ainda permanecem dúvidas associadas ao esclarecimento dos processos de localização intratumoral e da sua interação a nível molecular. Por estes motivos, a compreensão mais detalhada da farmacocinética do rádio-223 e das doses de radiação absorvidas nos tecidos saudáveis e tumorais torna-se essencial para uma melhor perceção dos efeitos radiobiológicos do radiofármaco, possibilitando a otimização dos planos de tratamento e a combinação com outros agentes. Atualmente, e na tentativa de ultrapassar estas limitações, tem-se realizado diversos estudos *in vitro*, destacando-se o estabelecimento de culturas celulares tridimensionais de cancro da próstata que, ao permitir uma representação mais realística do microambiente tumoral, se torna num método notável para a desmistificação das questões que ainda permanecem relativamente a esta temática (Sapienza & Willegaignon, 2019; Raitanen et al., 2023).

1.3.4. Estudos pré-clínicos

Os estudos pré-clínicos desempenham um papel essencial no desenvolvimento de novos tratamentos médicos sendo fundamental a sua realização previamente à execução de ensaios clínicos em seres humanos. Assim, quer através de metodologias *in vitro* ou *in vivo*, torna-se possível avaliar um conjunto de fatores que, em simultâneo, permitirão a minimização dos riscos e o aumento da taxa de sucesso. De entre eles destacam-se a avaliação da segurança do novo composto ou tratamento, nomeadamente a possível identificação de efeitos colaterais, a toxicidade, a atividade e a dose e frequência adequadas para uso clínico. Ademais, estudos com foco na análise da resposta à terapia, em particular na eficácia da redução tumoral, na inibição da metastização ou no aumento da sobrevida, nos mecanismos de ação, revelando o método de interação com as células, na modificação das vias de sinalização celular, na modulação da resposta imunitária e na indução da morte celular são efetuados com a mesma finalidade. Além disso, a identificação de alvos terapêuticos caso, por exemplo, se verifique a ocorrência de mutações genéticas, a expressão de proteínas específicas ou a disfuncionalidade de certas vias de sinalização e a otimização da forma de administração terapêutica são comuns no desenvolvimento de novas terapias (Polson et al., 2012; Mohs & Greig, 2017).

1.3.4.1. Culturas celulares tridimensionais

Os sistemas de cultura celular, aplicados em diversas áreas da biologia, têm demonstrado um papel crucial no auxílio da progressão da investigação biomédica e na evolução da medicina. Deste modo, a cultura celular num ambiente controlado possibilita a obtenção de informações biológicas

pertinentes, incluindo noções de crescimento, diferenciação, metabolismo, interação e toxicidade celular que, em simultâneo, permitem o desenvolvimento de novas terapias e a redução dos estudos com animais. Ainda que a realização de estudos *in vivo* demonstre uma importância fundamental na monitorização da eficácia e da toxicidade terapêutica, está associada a múltiplas adversidades, incluindo elevados custos económicos, diferentes espécies, disponibilidade limitada e controvérsias éticas (Fontana et al., 2020; Habanjar et al., 2021).

A cultura celular bidimensional (2D) é a técnica predominante na cultura celular e, desde o início de 1900, tem possibilitado o crescimento de células em monocamada no interior de frascos apropriados ou em placas de *Petri*. Esta metodologia é relativamente simples e de baixo custo, permitindo também uma fácil análise e visualização das células ao microscópio e uma simplicidade de execução de técnicas como ensaios de viabilidade, *Western Blot* e análise de imunofluorescência. No entanto, apresenta algumas limitações uma vez que, ao garantir níveis de oxigénio e nutrientes de igual forma para todas as células, mimetiza inadequadamente as condições fisiológicas e o ambiente celular *in vivo*, restringindo a replicação eficaz da arquitetura tumoral. Por estes motivos, a cultura 2D é responsável pela indução de diferenças fundamentais na morfologia, proliferação, diferenciação e metabolismo celular, assim como na transdução do sinal e na representação correta das interações célula-célula e célula-matriz extracelular (Rolver et al., 2019; Habanjar et al., 2021; H. Wang et al., 2021).

A evolução para tecnologias de cultura celular tridimensional (3D), uma técnica *in vitro* associada ao crescimento e ao desenvolvimento de células num ambiente tridimensional, surge na tentativa de colmatar estes obstáculos, revelando-se como um mecanismo altamente promissor no estudo da biologia e da resposta do cancro a diferentes terapias. Assim, esta metodologia, ao ultrapassar as lacunas existentes entre as culturas convencionais a 2D e os estudos *in vivo*, revela ainda resultados eficazes num curto espaço de tempo, de valor monetário menos elevado do que os estudos animais e de alto rendimento (Fontana et al., 2020). Desta forma, em relação às culturas 2D, verifica-se a ocorrência de um conjunto de alterações que, conjuntamente, promovem uma representação mais realista do microambiente celular *in vivo* (Figura 13). De entre elas destacam-se modificações a nível morfológico, denotando-se uma maior capacidade de preservação da morfologia natural celular e a criação de diversas camadas, expostas a diferentes níveis de oxigénio e de nutrientes; uma maior interação célula-célula e célula-matriz e também uma aproximação mais precisa da expressão genética, diferenciação e sinalização celular do tecido em estudo. Comparando o microambiente de desenvolvimento dos tecidos saudáveis com o dos tecidos tumorais correspondentes, denotam-se diversas alterações, nomeadamente a nível físico-químico, como diferenças de pH, de gradientes de concentração de oxigénio e nutrientes, de pressão intersticial, de fatores de crescimento e de produtos residuais. Todas estas condições específicas de desenvolvimento celular afetam fortemente o perfil de expressão genética evidenciando, assim, a maior capacidade representativa do fenótipo tumoral *in vivo* alcançada através do cultivo celular tridimensional. Por estes motivos, as células cultivadas a três dimensões demonstram uma taxa proliferativa, um metabolismo e uma resistência terapêutica mais próximos da realidade que, em simultâneo, asseguram uma melhor mimetização do ambiente fisiológico. Consequentemente, é possível alcançar uma melhor compreensão do comportamento e dos mecanismos de transformação celular, permitindo o estudo de diversas patologias e o desenvolvimento de novas terapias (Rolver et al., 2019; Fontana et al., 2020; Jensen & Teng, 2020; Habanjar et al., 2021).

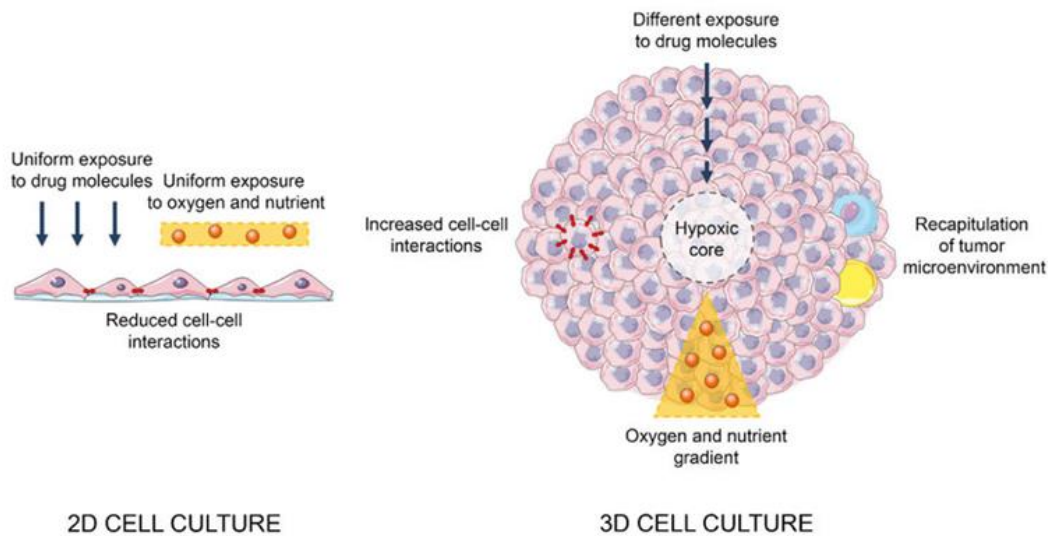


Figura 13: Diferenças entre as culturas celulares a 2D e 3D. Retirado de (Fontana et al., 2020).

De forma a recriar a organização tumoral *in vivo*, o processo de cultivo celular a 3D pode ser realizado recorrendo a técnicas que permitem obter diferentes modelos, nomeadamente, esferoides e organoides.

Os esferoides representam aglomerados celulares resultantes da elevada tendência de agregação demonstrada por células aderentes, frequentemente, de forma esférica, podendo ser classificados de acordo com a sua composição. Assim, são denominados de esferoides homotípicos quando compostos por apenas um único tipo de células ou heterotípicos, caso apresentem mais do que um tipo celular na sua constituição. O tamanho dos esferoides é dependente da linha celular em estudo e do número de células cultivadas, verificando-se um aumento exponencial do seu volume em estados mais iniciais, seguido de um período de estabilização (Zanoni et al., 2020; Marques et al., 2022).

A cultura a 3D é amplamente utilizada na área da oncologia, sobretudo no estudo de tumores sólidos. Desta forma, os esferoides tumorais permitem a representação de uma ampla variedade de tecidos tumorais reproduzindo características específicas do ambiente tumoral complexo, essencialmente microrregiões de massa tumoral avascular, micrometástases e camadas com diversas células especializadas de diferentes comportamentos fenotípicos, funcionais e metabólicos. Em particular, os esferoides demonstram uma arquitetura espacial bem organizada com uma camada celular externa do tipo proliferativo, uma zona intermédia composta por células quiescentes e senescentes e, no interior, um core necrótico e apoptótico resultante da menor concentração de nutrientes e de oxigénio nesta área. A presença de um core hipóxico é responsável por alterações metabólicas, sobretudo devido à substituição da fosforilação oxidativa pela glicólise anaeróbica, com o consequente aumento dos níveis de lactato. Por conseguinte, verificar-se-á uma acidificação da zona mais interna dos esferoides que, conjuntamente com o decréscimo do gradiente de oxigénio e nutrientes disponíveis nessa região, provoca uma redução da absorção intracelular de substâncias químicas, afetando a eficácia de algumas terapias antitumorais. Contudo, a existência de uma zona

com uma pressão parcial de oxigênio diminuída nos modelos 3D torna-se de extrema relevância uma vez que, diferentemente das culturas a 2D, permite a simulação do ambiente hipóxico *in vivo*, uma das principais características dos tecidos tumorais (Rolver et al., 2019; Zanoni et al., 2020).

Os organoides representam um modelo de culturas 3D complexo que permite o desenvolvimento de estruturas funcionais semelhantes a tecidos ou órgãos em miniatura. Assim, a partir de células estaminais embrionárias ou adultas ou de células pluripotentes induzidas é possível obter uma estrutura organizada de forma idêntica à do órgão em estudo necessitando, no entanto, da ativação de várias vias de sinalização mediadas por componentes celulares intrínsecos ou ambientes extrínsecos, assim como a matriz extracelular e fatores de crescimento. A duração do processo de formação do complexo estrutural depende do tipo de órgão que se pretende mimetizar, sendo variável de entre 2 a 3 meses. Desta forma, ao possibilitar o desenvolvimento de diferentes camadas celulares numa única estrutura, este modelo permite uma reprodução eficaz da fisiologia do tecido em estudo, tornando-se numa ferramenta promissora para o desenvolvimento de novas terapias e na medicina regenerativa, sobretudo na reparação tecidual e no transplante de órgãos (Corrò et al., 2020; Gunti et al., 2021; W. Kim et al., 2023).

A escolha da metodologia para a obtenção das culturas celulares tridimensionais depende da linha celular em estudo e do objetivo que se pretende alcançar destacando-se, no entanto, a cultura por sobreposição líquida, a técnica de *hanging drop* e o recurso a dispositivos microfluídicos ou a *scaffolds* (Kunz-Schughart et al., 2004; Zanoni et al., 2020; Gunti et al., 2021). Atualmente, a cultura por sobreposição líquida é uma das metodologias mais utilizadas na obtenção de esferoides dada a sua simplicidade e elevada reprodutibilidade. Este procedimento, ao recorrer a superfícies de baixa aderência revestidas por biomateriais como a agarose ou o PHEMA [Poli(2-hidroxietilmetacrilato)], inibe a ligação entre as células e a superfície da placa, forçando a sua agregação entre si e, conseqüentemente, a formação de aglomerados celulares no centro de cada poço (Fontana et al., 2020; Zanoni et al., 2020; Habanjar et al., 2021). Por sua vez, a técnica de *hanging drop* é uma metodologia que permite a formação de estruturas tridimensionais em gotas suspensas através da ação da força gravitacional. No entanto, apesar dos desafios associados à substituição e à incorporação de substâncias no meio de cultura na gota e à dificuldade de transferência do esferoide para a realização dos ensaios, esta metodologia não acarreta custos elevados e permite a produção de esferoides em larga escala (W. Kim et al., 2023). A tecnologia de microfluidos permite a produção de esferoides de tamanho e forma desejada através de uma técnica complexa que engloba a suspensão das células numa solução (de agarose, por exemplo) e da sua posterior inserção em canais microfluídicos. A personalização do tamanho e a forma dos esferoides é controlada através da geometria dos canais, da concentração das células e da densidade do gel de agarose. Além disso, os dispositivos microfluídicos, constituídos por silicone ou elastómero, são projetados de forma a permitirem uma fácil incorporação de gradientes de nutrientes, substâncias químicas ou forças mecânicas e a eliminação de resíduos, promovendo uma perfusão contínua e a manutenção de um microambiente adequado ao crescimento celular. Atualmente, esta tecnologia encontra-se em constante desenvolvimento e, ainda que não se encontre à disposição de muitos laboratórios, tem demonstrado vantagens essencialmente na mimetização minuciosa das propriedades do meio, das interações célula-célula e dos sinais biológicos, simulando um perfil fisiológico representativo ao sistema circulatório e a injeções intravenosas. Porém, estas condições requerem a utilização de equipamentos complexos com um *design* adequado, mas que, apesar do elevado custo, permitem a

minimização da mão de obra necessária e do consumo de reagentes utilizados a longo prazo. Assim, através destes equipamentos torna-se possível uma análise mais precisa da resposta dos esferoides a diferentes condições, bem como a avaliação da influência desses fatores no desenvolvimento e na fisiologia celular, permitindo o estudo da progressão, invasão e da angiogênese tumoral (Habanjar et al., 2021; W. Kim et al., 2023). Dada a influência da matriz extracelular na organização e nas funções tecidulares, surgiu o desenvolvimento de modelos que incorporam a utilização de uma substância eficaz na replicação do microambiente celular. Por este motivo, o recurso a polímeros altamente hidrofílicos, como a matrigel, o alginato e o colagénio, tem sido amplamente estudado com a finalidade de promover a agregação e o crescimento das células de forma idêntica ao que acontece nos tecidos tumorais, garantindo uma maior preservação das interações célula-células e célula-matriz. O recurso a *scaffolds*, nomeadamente a materiais porosos como o colagénio, o quitosano ou a policaprolactona, é também um procedimento usual na produção de esferoides, permitindo a substituição da matriz celular e o suporte físico necessário à sua formação. No entanto, ainda que esta metodologia assegure uma maior aproximação à realidade *in vivo* e uma alta versatilidade, está associada a procedimentos de elevados custos económicos e de alta complexidade (Fontana et al., 2020).

1.3.4.2. Modelos celulares tridimensionais no estudo do CaP

Até ao momento, tem-se verificado um crescente número nos estudos realizados para avaliar os efeitos antitumorais de diversos compostos, incluindo o rádio-223, em culturas celulares 3D de cancro da próstata. De entre os diversos ensaios realizados, exemplifica-se o estabelecimento de esferoides de duas linhas celulares de cancro da próstata, a PC3 e a LNCaP, através de *scaffolds* de colagénio, com o objetivo de avaliar o efeito quimioterapêutico do docetaxel (Fitzgerald et al., 2015). Além disso, através da técnica de *hanging drop*, foram também desenvolvidos esferoides da linha celular PC3 para avaliação dos efeitos radiobiológicos da radioterapia fracionada (Camus et al., 2016) e, mais recentemente, *Abramenkovs* e colaboradores procederam ao estabelecimento de culturas 3D de três linhas celulares de cancro da próstata, nomeadamente PC3, 22RV1 e DU145, geradas a partir da técnica por sobreposição líquida, para determinar a influência do rádio-223 na indução de apoptose e consequente inibição do crescimento dos esferoides (Abramenkovs et al., 2022).

Atualmente, o recurso a esferoides para o desenvolvimento de estudos pré-clínicos do cancro da próstata é muito reduzido. No entanto, o desenvolvimento de metodologias apropriadas à cultura 3D, como a cultura de sobreposição líquida ou a técnica de *hanging drop* e o desenvolvimento de co-culturas constituídas por diversos tipos de células, tumorais, da matriz óssea, endoteliais, entre outras, têm demonstrado uma crescente aplicabilidade, derivado dos resultados altamente favoráveis na mimetização do nicho metastático. Neste contexto, e por todos os motivos referidos, a cultura tridimensional de células do cancro da próstata manifesta um alto potencial, não só na simulação do microambiente tumoral, como também na evolução terapêutica de agentes direcionados ao tumor, nomeadamente na avaliação do mecanismo de ação e dos efeitos radiobiológicos induzidos pelo uso do radiofármaco rádio-223 (Fontana et al., 2020).

2. Objetivos

O cancro da próstata afeta milhões de indivíduos em todo o mundo sendo a segunda neoplasia mais frequentemente diagnosticada e a quinta causa de morte oncológica no sexo masculino. Quando a doença evolui para estádios resistentes à castração e com presença de metástases é designada por cancro da próstata metastático resistente à castração, permanecendo um desafio devido à sua resistência terapêutica e elevada letalidade (He et al., 2020; Rebello et al., 2021). Entre as várias opções terapêuticas, destaca-se o rádio-223, o primeiro emissor de partículas alfa aprovado pela FDA e pela EMA, destinado ao tratamento de doentes com cancro da próstata metastático resistente à castração que apresentem metástases ósseas e sem metástases viscerais.

Ao longo dos anos, este radiofármaco tem demonstrado um aumento da sobrevida e uma melhoria da qualidade de vida dos doentes. No entanto, apesar de promissor, a sua eficácia clínica está aquém do expectável e ainda permanecem dúvidas acerca do seu mecanismo de ação, sobretudo os seus alvos moleculares e o seu modo de interação no nicho metastático devendo-se, em parte, à falta de estudos radiobiológicos e dosimétricos a nível molecular (Marques et al., 2021; Abramkovs et al., 2022; Guerra Liberal et al., 2022).

No seguimento das lacunas identificadas, o objetivo deste estudo, “Quantificação do dano biológico induzido pelo rádio-223 em culturas celulares de cancro da próstata metastático”, compreendeu a avaliação dos efeitos radiobiológicos em esferoides de células de cancro da próstata metastático e também o estudo dosimétrico do rádio-223 em modelos celulares bi- e tridimensionais de cancro da próstata metastático. Para atingir esta finalidade, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- Estabelecimento e caracterização de culturas 3D (esferoides) a partir de células LNCaP, derivadas de metástase linfática de cancro da próstata;
- Avaliação dos efeitos da exposição ao rádio-223 na morfologia, viabilidade, migração e invasão celulares em modelos celulares 3D constituídos pelas linhas celulares PC3 ou LNCaP;
- Análise da influência das características do esferoide na resposta radiobiológica;
- Dosimetria do rádio-223 em culturas celulares 2D e 3D de cancro da próstata, com determinação dos *S-values* para as células PC3 e LNCaP e posterior cálculo da dose absorvida.

3. Materiais e Métodos

3.1. Efeitos radiobiológicos do rádio-223

3.1.1. Cultura Celular

A cultura celular é um procedimento laboratorial que permite o crescimento de células procarióticas ou eucarióticas num ambiente artificial controlado. Desta forma, a partir de culturas primárias, que consistem na remoção de células de um animal ou planta e no estabelecimento de uma linha celular, ou através de culturas celulares imortalizadas, é possível uma análise detalhada da fisiologia e da estrutura celular. Em estudos *in vitro*, a utilização de culturas celulares possibilita a criação de sistemas modelo de ampla aplicabilidade, quer a nível do estudo da resposta das células quando sujeitas a diferentes condições, quer da análise da toxicidade de produtos químicos ou do desenvolvimento de novas terapias (Segeritz & Vallier, 2017; Capes-Davis & Freshney., 2021).

A extensa utilidade das técnicas de cultura celular na investigação biomédica pressupõe não só a gestão de potenciais riscos associados a agentes infecciosos, como também o controlo de reagentes que podem apresentar uma natureza tóxica, corrosiva ou mutagénica. Deste modo, a manutenção das condições de assepsia e de esterilidade tornam-se essenciais para prevenir o risco de contaminações da cultura celular, seja por microrganismos ou por outras linhas celulares, que podem afetar o crescimento celular ou alterar as características da cultura e, por conseguinte, comprometer a precisão, a fiabilidade e a qualidade dos resultados (Capes-Davis & Freshney., 2021). A adoção de práticas como a utilização de roupas e de equipamentos de proteção, o recurso a desinfetantes químicos ou a realização dos protocolos experimentais no interior de uma câmara de fluxo laminar são exemplos de cuidados que permitem a garantia da realização das culturas e experiências *in vitro* em ambiente apropriado. Para além disso, ainda que as condições de cultivo variem de acordo com o tipo de células em estudo, todas elas requerem um conjunto de fatores adequados ao seu crescimento. Assim, a utilização de um suporte adequado contendo um meio com os nutrientes essenciais, como aminoácidos, hidratos de carbono, vitaminas e minerais, fatores de crescimento, hormonas e um ambiente com a quantidade apropriada de oxigénio e dióxido de carbono, permitem a manutenção das condições físico-químicas, particularmente o pH e a pressão osmótica, estimulando, conseqüentemente, o crescimento celular (Phelan & May, 2017; Capes-Davis & Freshney., 2021).

Durante o desenvolvimento deste projeto foram utilizadas duas linhas celulares humanas (Figura 14) de cancro da próstata, a linha celular PC3 (ATCC® CRL-1435™) e a linha celular LNCaP (ATCC® CRL-1740™), ambas adquiridas à ATCC (do inglês, *American type culture collection*). A linha celular PC3 foi isolada em 1979 a partir de metástases ósseas de um adenocarcinoma prostático de grau IV de um indivíduo do sexo masculino, caucasiano, de 62 anos de idade. Este tipo de células caracteriza-se por apresentar uma morfologia epitelial, demonstrando um elevado potencial invasivo e a ausência de recetores hormonais não demonstrando, por isso, sensibilidade a androgénios (Kaighn et al., 1979; Tai et al., 2011). Por sua vez, a linha celular LNCaP foi estabelecida em 1977 através de uma biopsia de um gânglio linfático supraclavicular de um homem caucasiano, de 50 anos de idade, portador de cancro da próstata metastático. Comparativamente à linha celular PC3, a linha celular LNCaP apresenta o mesmo tipo de morfologia diferenciando-se, no entanto, a nível molecular e proliferativo. Assim, e contrariamente às células PC3, as células LNCaP caracterizam-se pela presença de recetores de hormonas e de PSA e por terem uma taxa proliferativa e metastática mais baixa

representando, conseqüentemente, uma forma menos agressiva do cancro da próstata (Gibas et al., 1984; Tai et al., 2011).

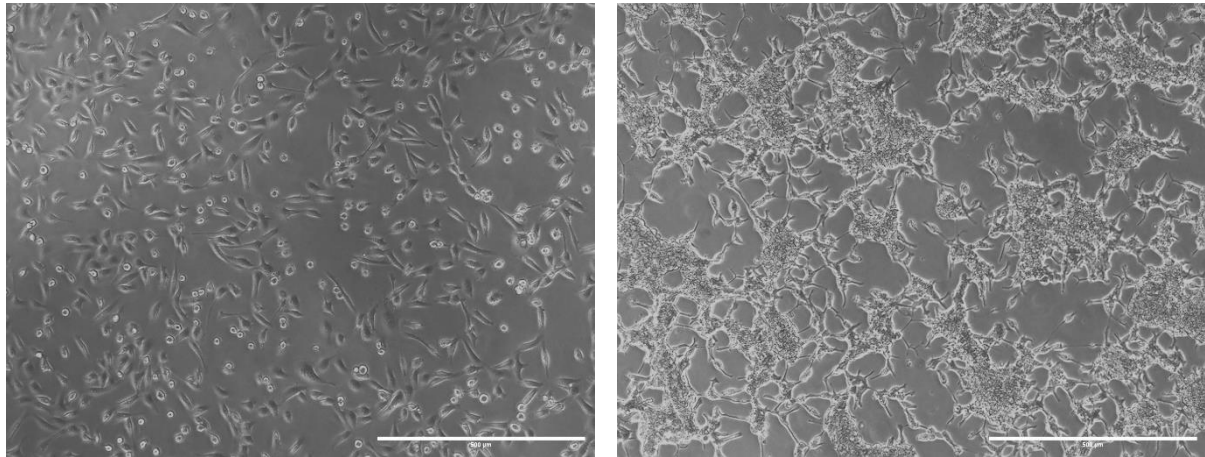


Figura 14: Imagem representativa de células PC3 (esquerda) e LNCaP (direita) adquiridas com um microscópio ótico invertido (Motic AE31), com uma ampliação de 100x. A escala corresponde a 600 μm .

A cultura de ambas as linhas celulares iniciou-se com o descongelamento das células criopreservadas, de acordo com as recomendações fornecidas pela ATCC, e a sua transferência para um frasco de cultura aderente com meio de cultura *Roswell park memorial institute* (RPMI-1640, R4130) a pH 7,4, suplementado com 2,5 g/L de glucose, 100 μM de piruvato de sódio (Sigma S8636), 5% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *fetal bovine serum*, Gibco 10270-106) e 1% de antibiótico (Sigma A5955) e mantidas na incubadora (Binder®, Alemanha) numa atmosfera à temperatura de 37°C, composta por 95% de ar e 5% de dióxido de carbono (CO_2) (Phelan & May, 2017). As células foram mantidas em cultura, sendo o meio renovado 2-3 vezes por semana, assegurando a manutenção dos níveis nutricionais para todas as células e uma baixa presença de substâncias tóxicas que, em simultâneo, permitiram um crescimento celular saudável e eficiente. Por este motivo, durante o período de cultura das células, foram realizados testes regulares para controlar a presença de *mycoplasma*, tendo sido o resultado sempre negativo. Quando os frascos atingiam a confluência de 80-90% procedeu-se à expansão da cultura celular ou à realização de experiências.

Tendo em conta que as linhas celulares PC3 e LNCaP se propagam em monocamada aderente, foi necessário proceder ao destacamento das células da superfície do frasco de cultura. Este processo iniciou-se com a remoção do meio de cultura, seguindo-se a lavagem das células com 5 mL de uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*), a pH 7,4, para remover quaisquer resíduos de meio e detritos celulares. Após remoção do PBS, sucedeu-se à incubação a uma temperatura de 37°C, durante 2-5 minutos, com 2 mL da solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco 25200-072) para as células PC3, ou de TrypLE™ Express (Gibco 12605-028) para as células LNCaP, de forma a promover o destacamento das células da superfície aderente do frasco de cultura. A escolha de diferentes soluções de dissociação é dependente do tipo de células em estudo, ocorrendo devido à maior sensibilidade demonstrada pela linha celular LNCaP que, por conseguinte, requer uma solução menos tóxica e mais eficiente, garantindo a minimização do dano celular provocado durante este processo. Após confirmação do destacamento das células ao microscópio ótico invertido (Motic AE31), procedeu-se à inativação das soluções previamente utilizadas com a adição de 5 mL de meio de cultura, seguindo-se da sua homogeneização e contagem do número de células. A concentração

de células viáveis foi determinada através do método de exclusão de azul de tripano, que permite contabilizar as células viáveis numa suspensão celular. Assim, devido à impermeabilidade da membrana celular das células viáveis ao azul de tripano, torna-se possível distinguir ao microscópio este tipo de células, com aspeto “brilhante”, de células não viáveis, com aparência azulada, que, por possuírem a membrana celular danificada, apresentam permeabilidade ao corante (Chan et al., 2020). A realização deste ensaio pressupõe a preparação de uma solução homogénea, contendo 20 µL de azul de tripano (Sigma 30,264-3), na diluição de 1:20 em água ultra-pura, e 20 µL da suspensão celular num hemocitómetro e, de seguida, o recurso a um microscópio ótico invertido, com ampliação de 100X, para a contagem do número de células viáveis em cada quadrante. Posteriormente, através da Equação 1, obtém-se a concentração celular, em que Q1, Q2, Q3 e Q4 correspondem ao número de células viáveis contadas em cada quadrante do hemocitómetro, 2 ao fator de diluição e 10 000 ao fator de conversão para a unidade pretendida (mL).

$$\text{Concentração} \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = \frac{(Q1 + Q2 + Q3 + Q4)}{4} \times 2 \times 10\,000$$

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

3.1.2. Estabelecimento de culturas celulares 3D

As culturas celulares 3D representam uma aproximação mais realística do nicho metastático do cancro da próstata e desempenham um papel essencial na mimetização da microarquitetura e do microambiente tumoral *in vivo*, permitindo ultrapassar as limitações demonstradas pelas culturas 2D (Raitanen et al., 2023). Ao longo dos anos foram desenvolvidas diversas metodologias para a formação de esferoides, no entanto, devido aos resultados previamente obtidos e testados no grupo de investigação (Marques, 2016; Fernandes, 2022), à sua simplicidade, reprodutibilidade, elevada homogeneidade morfológica, facilidade de manipulação e por questões de proteção radiológica, definiu-se a técnica da sobreposição líquida como o modelo a utilizar no decorrer da realização deste projeto.

Inicialmente, foram estabelecidos esferoides homotípicos, constituídos unicamente por células PC3 ou LNCaP, com diferente número inicial de células. Para tal, foram transferidos 200 µL de suspensões celulares com uma concentração inicial de 5 000 células/mL, 12 500 células/mL e 25 000 células/mL para cada poço de uma placa Corning® 96-well Black/Clear Round Bottom Ultra-Low Attachment (ULA) Spheroid Microplate (Corning 4515), de 96 poços, de modo a obter esferoides com 1 000, 2 500 e 5 000 células, respetivamente. Este tipo de placas apresenta poços de fundo redondo, de superfície não citotóxica, biologicamente inerte e não degradável, revestidos por um hidrogel que minimiza a adesão celular, promovendo a aglomeração das células no centro dos mesmos (Corning, 2023). Posteriormente, incubaram-se as placas à temperatura de 37°C para permitir a formação dos esferoides, durante 48 horas (esferoides de 5 000 e 2 500 células) ou 6 dias (esferoides de 1 000 células). No entanto, ainda que inicialmente não se observasse a formação de esferoides da linha celular LNCaP, verificou-se que a centrifugação da placa promoveria significativamente a sua adesão, permitindo o estabelecimento de esferoides mais compactos e mais bem definidos (Ivascu & Kubbies, 2006). Nesse sentido, realizou-se a centrifugação da placa, com uma aceleração de 100 xG, durante 10 minutos à temperatura de 21°C (Ivascu & Kubbies, 2006). A centrifugação da placa sucedeu-se imediatamente após a transferência da suspensão celular para os poços e 48 horas após

o início experiência (esferoides de 1 000 células), ou no dia seguinte à transferência da suspensão celular para os poços (esferoides de 2 500 células). Este procedimento foi implementado sempre que necessária a formação de novos agregados celulares 3D de células LNCaP.

3.1.3. Irradiação das culturas 3D de CaP com rádio-223

Após o estabelecimento das culturas 3D de cancro da próstata, procedeu-se à sua irradiação com diferentes atividades volúmicas iniciais, que variaram entre 55 e 7 040 Bq/mL de dicloreto de rádio-223 (Xofigo®, Bayer), garantindo-se sempre a existência de uma condição não sujeita a radiação (0 Bq/mL), a condição controlo. A disponibilização da fonte radioativa foi efetuada pelo Serviço de Medicina Nuclear do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, de acordo com o protocolo estabelecido entre ambas as instituições. Posteriormente, realizou-se a medição do volume e da atividade inicial do radiofármaco através de uma câmara de ionização (Capintec CRC-25W) utilizando, sempre que necessário, soro fisiológico para preparar as diluições da solução com as atividades iniciais pretendidas. Além disso, previamente à adição do radiofármaco, removeu-se o mesmo volume de meio de cultura a cada um dos poços para a manutenção de um volume constante. Ao longo da realização do procedimento de irradiação foram seguidas as normas de radioproteção adequadas, de modo a garantir a segurança do pessoal envolvido e a minimização da exposição à radiação.

A Figura 15 e a Figura 16 representam os processos otimizados do estabelecimento e da irradiação dos esferoides, cujos tempos entre procedimentos demonstram dependência da linha celular e da concentração celular. O dia 0 correspondeu à adição das suspensões celulares previamente preparadas. Nos dias 2, 5 ou 6 procedeu-se à irradiação das culturas com as três atividades volúmicas do radiofármaco, removendo-se a mesma nos dias seguintes, 3, 6 ou 7, respetivamente. No sétimo dia após a remoção da atividade dos poços, dias 10, 13 ou 14, realizaram-se os ensaios pretendidos para avaliar os efeitos radiobiológicos do rádio-223.

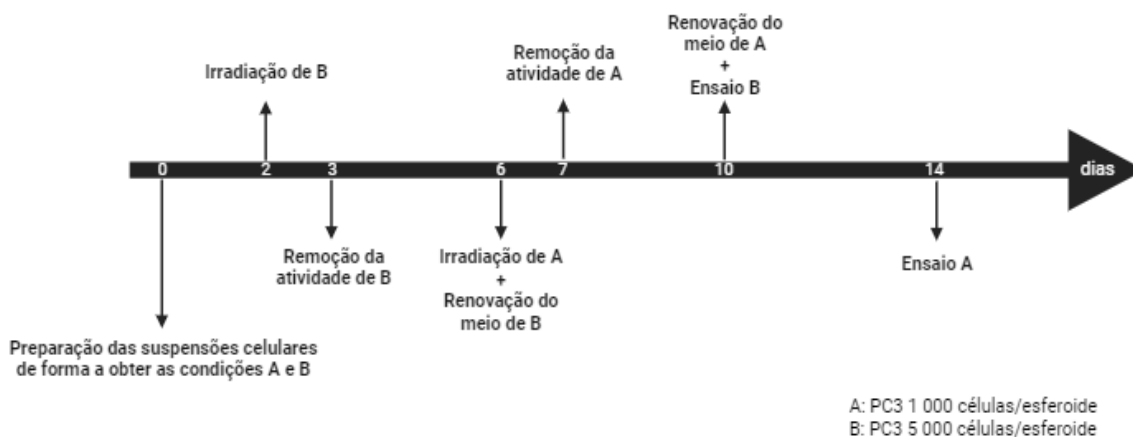


Figura 15: Processo de estabelecimento e de irradiação dos esferoides da linha celular PC3.

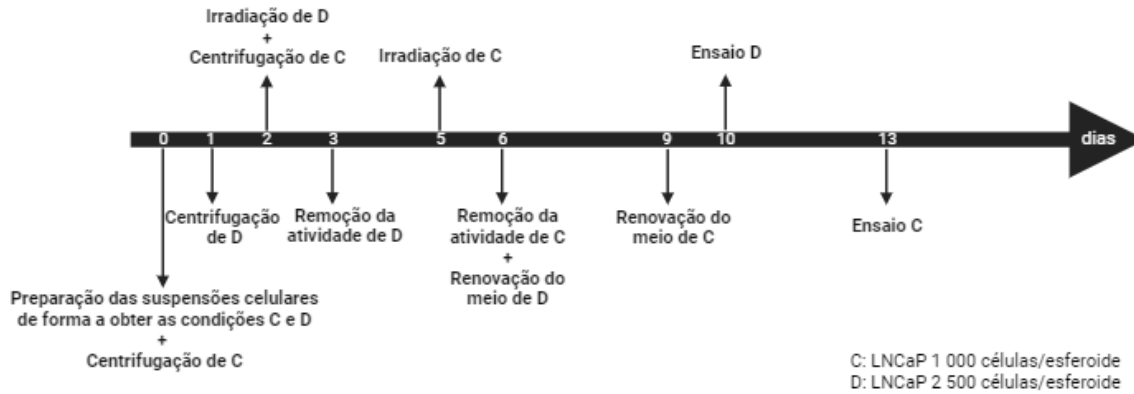


Figura 16: Processo de estabelecimento e de irradiação dos esferoides da linha celular LNCaP.

3.1.4. Análise da morfometria dos esferoides

O estudo dos efeitos do rádio-223 na morfometria dos esferoides fornece informações essenciais sobre a sua dimensão, forma, densidade, organização estrutural, complexidade e crescimento, manifestando uma elevada importância na compreensão dos efeitos radiobiológicos do radiofármaco em estudo (Browning et al., 2021). Para tal, procedeu-se à monitorização por microscopia ótica e captura de imagens das culturas 3D após irradiação, entre os dias 6 e 14 (para os esferoides PC3 com 1 000 células) e entre os dias 2 e 7 (para os esferoides LNCaP com 2 500 células), com uma ampliação de 40X e de 100X. Este processo foi efetuado recorrendo ao *software Motic Images Plus 2.0 ML*, incorporado no microscópio ótico invertido (Motic AE31) com uma câmara acoplada.

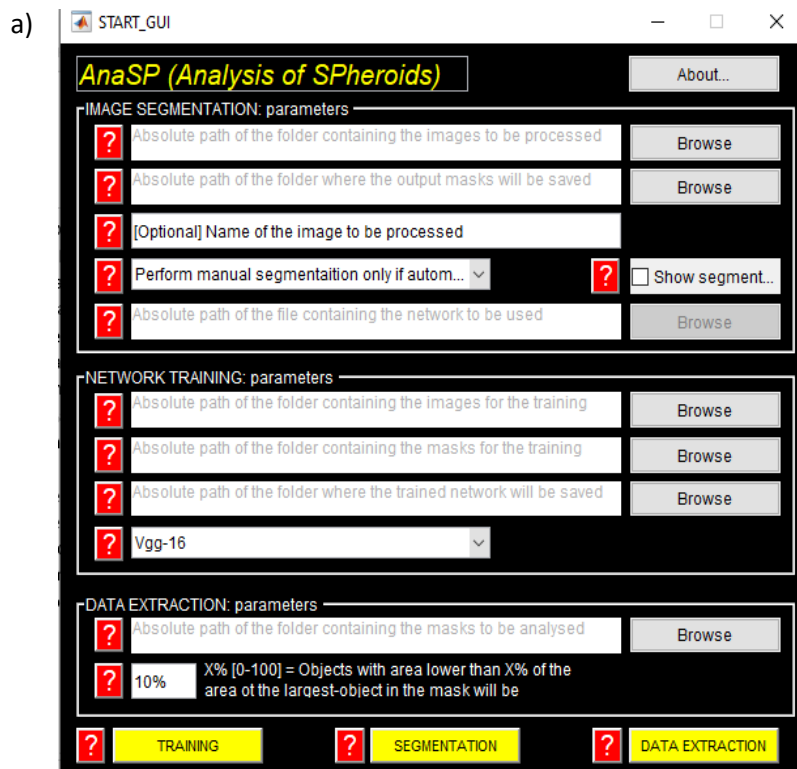
A análise das imagens obtidas foi realizada através do *software AnaSP*, um programa recentemente desenvolvido no MATLAB, que permite a extração automática de diferentes parâmetros morfológicos e a análise de imagens de esferoides num curto intervalo de tempo. Para isso, torna-se necessária a presença de um único esferoide por imagem, bem focado e com contraste adequado, obtido a partir do microscópio ótico. Após o processo de aquisição, segue-se a segmentação das imagens, uma etapa automática que se baseia na visualização da imagem numa escala de cinzento, na determinação da região de interesse (ROI, do inglês *region of interest*) e na aplicação de uma máscara binária, que atribui o valor 1 aos *pixels* pertencentes ao esferoide e o valor 0 aos restantes. Nos casos em que a segmentação automática falha, é necessário proceder à segmentação manual, que inclui a definição da ROI com o delineamento da periferia dos esferoides por parte do utilizador. Tal como representado na Figura 17, a partir de imagens binárias, o *software* determina um conjunto de parâmetros que incluem a área (A), a circularidade (Equação 2), a compactidade, relativa à compactação dos esferoides, o diâmetro equivalente, correspondente ao diâmetro do círculo com a mesma área da secção transversal, o perímetro (P), a esfericidade, de acordo com a Equação 3, e o volume do esferoide em análise (Piccinini, 2015).

$$Circularidade = \frac{4\pi A}{P^2}$$

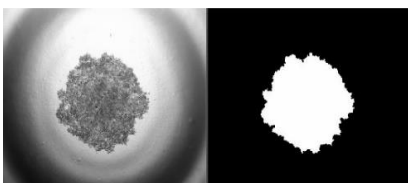
Equação 2: Cálculo da circularidade do esferoide, em que A é a área e P o perímetro (Pinto et al., 2020a)

$$Esfericidade = \frac{\pi \sqrt{4A/\pi}}{P}$$

Equação 3: Cálculo da esfericidade do esferoide, em que A é a área e P o perímetro (Kelm et al., 2003).



b)



c)

DATA EXTRACTED							
	MaskFolder	MaskName	Area	Circularity	Compactness	Convexity	EquivalentDiameter
1	Output Photos	B10 40X.tiff	240940	0.8728	0.3924	0.6705	553.872
	FeretAspectRatio	FeretDiameterMax	FeretDiameterMaxOrthogonalDistance	FeretDiameterMin	LengthM		
1	0.8668	631.5901		597.8087	547.4532		
	Centroid	LengthMinorDiameterThroughCentroid	Perimeter	Solidity	Sphericity	Volume	
1	8.6083		488.4441	2778	0.8965	0.6264	84428922

Figura 17: Interface do software AnaSP (a), exemplo do output da segmentação da imagem em imagem binária (b) e dos parâmetro extraídos, em pixels (c).

3.1.5. Avaliação da viabilidade celular

O estudo da viabilidade celular é um procedimento usualmente realizado para avaliar os efeitos citotóxicos ou radiotóxicos induzidos pela exposição a diversos fatores, nomeadamente agentes quimioterapêuticos ou radiação. De acordo com a condição em estudo, esta análise pode ser

efetuada através de diferentes metodologias, incluindo ensaios por exclusão de corantes, ensaios colorimétricos, fluorimétricos e luminométricos (Stoddart, 2011).

Comparativamente a outros ensaios utilizados como indicadores indiretos da viabilidade, como o método de exclusão de azul de tripano, o XTT, o MTT, ou o Alamar Blue, o CellTiter-Glo® 3D é o ensaio que tem demonstrado melhores resultados na avaliação dos efeitos radiobiológicos do rádio-223 através da análise da viabilidade celular de esferoides sendo, por isso, a metodologia recomendada para esta finalidade (Zanoni et al., 2015). Além disso, ao ser específico para a condição tridimensional e ao permitir a sua realização em diversos tipos de placas e culturas, demonstra uma alta flexibilidade, apresentando ainda outras características vantajosas, nomeadamente a sua elevada sensibilidade, reprodutibilidade, simplicidade de execução, rapidez de aquisição de dados e estabilidade do sinal de luminescência (Zanoni et al., 2015).

A análise da viabilidade celular através do ensaio CellTiter-Glo® 3D é uma metodologia que tem como princípio a determinação indireta do número de células viáveis em culturas celulares tridimensionais, como esferoides e organoides, através da quantificação de um biomarcador da presença de células metabolicamente ativas, a adenosina trifosfato (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*) (A. P. Li et al., 2004). Este ensaio baseia-se na adição de um substrato, a luciferina, que, ao reagir com a enzima luciferase, promoverá a sua conversão num produto emissor de luz. No entanto, esta reação pressupõe a presença de fatores fornecedores de energia necessários para a sua ocorrência, como o ATP e o oxigénio, evidenciando, por isso, uma proporcionalidade entre o sinal luminescente emitido e a quantidade de ATP existente que, por sua vez, é também diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na cultura 3D (Crouch et al., 1993; Nowak et al., 2018; Dominijanni et al., 2021;).

Esta técnica foi realizada 8 dias após a irradiação dos esferoides formados com 1 000 células/esferoide, de ambas as linhas celulares de cancro da próstata, e iniciou-se com a remoção de 100 µL de meio de cultura de cada poço e, de seguida, com a adição de 40 µL do reagente CellTiter-Glo® 3D (Promega G9681). Ao adicionar o reagente foi necessário homogeneizar várias vezes a suspensão, de modo a garantir uma extração eficaz do ATP presente nas células componentes do esferoide. Posteriormente, para permitir a estabilização do sinal luminescente, a placa foi protegida da luz e incubada à temperatura de 37°C durante 25 minutos. Após o período de incubação, transferiram-se 100 µL de cada poço para uma placa branca (Thermo Scientific 136101), procedendo-se à leitura da luminescência com o auxílio de um espectrofotómetro (Perkin Elmer Enspire 2300).

3.1.6. Estudo da migração e da invasão celulares

A invasão e a migração celular são eventos fundamentais associados à penetração da matriz extracelular e ao movimento das células de um local para outro no interior de um tecido ou entre tecidos adjacentes que ocorrem naturalmente em muitos processos fisiológicos, nomeadamente em processos de cicatrização, angiogénicos ou inflamatórios (Rommerswinkel et al., 2014; Vinci et al., 2013). No entanto, a sucessão destes mecanismos em células tumorais promove a sua capacidade de separação do tumor primário e o início da sua propagação para tecidos adjacentes, estando associada à progressão tumoral para uma fase maligna e ao início da disseminação metastática. Assim, o esclarecimento destes processos torna-se essencial para a compreensão da evolução do cancro e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes (Yamada et al., 2019; Novikov et al., 2021).

Para avaliar a capacidade migratória e invasiva das células constituintes dos esferoides é comum recorrer a diversas metodologias. De entre elas, destacam-se os ensaios em câmaras de *Boyden*, que possuem uma membrana porosa e permitem verificar a capacidade de propagação das células entre os poros, e os ensaios de microfluidos, que utilizam dispositivos microfluídicos para criar gradientes, permitindo a avaliação da migração das células tumorais direcionada a esses gradientes. Além disso, é também comum recorrer a ensaios realizados numa matriz tridimensional, onde se procede à incorporação dos esferoides em substâncias simuladoras da matriz extracelular, como a matrigel, o colagénio, a fibrina ou a agarose, e, posteriormente, à análise da capacidade das células em invadirem e migrarem ao longo dessa matriz, refletindo a capacidade de invadirem e migrarem para tecidos adjacentes (Rommerswinkel et al., 2014).

Assim, e aliando à possibilidade de realização da técnica na placa ULA (do inglês, *ultra-low attachment*) utilizada para cultivo dos esferoides, procedeu-se à análise da migração e da invasão celular através do ensaio em matrigel. A matrigel é composta por proteínas como o colagénio, a laminina e proteoglicanos sendo, por isso, semelhante à matriz extracelular presente nos tecidos. Deste modo, ao permitir o estudo das interações entre as células tumorais e o ambiente circundante, destaca-se dos outros ensaios, possibilitando uma melhor representação do ambiente fisiológico e uma mimetização mais realística das condições *in vivo*. Além disso, permite a contagem das células através de técnicas de microscopia e de citometria de fluxo, proporcionando dados quantitativos para a compreensão da capacidade de disseminação celular tumoral, apresentando ainda uma ampla versatilidade, devido à sua capacidade modulatória a nível de concentração e composição, o que permite o alcance das necessidades específicas do tipo de linha celular e do protocolo experimental em execução (Justus et al., 2014; Rommerswinkel et al., 2014; Goh et al., 2020).

Inicialmente, o ensaio de migração celular em matrigel, para os esferoides da linha celular PC3 estabelecidos a partir de uma solução com 5 000 células/poço, foi realizado no décimo dia após o início da experiência. No entanto, devido à estabilização do crescimento dos esferoides, o ensaio foi repetido oito dias após a inicialização de todo o procedimento experimental. Todo o processo e todos os materiais necessários à realização desta técnica foram mantidos no interior de um suporte com gelo, de forma a assegurar o estado líquido da matrigel. Para começar, e para garantir a conservação da integridade dos esferoides, procedeu-se de forma cuidadosa à remoção completa do volume de meio existente em cada poço, seguindo-se da adição de 10 μ L de matrigel. Para facilitar uma análise da evolução migratória, devem-se adotar um conjunto de medidas, nomeadamente a realização desta última etapa direcionando a ponta da micropipeta para a parede interna do poço, de forma a garantir a manutenção do esferoide no centro do mesmo, e a utilização de agulhas estéreis para a remoção de possíveis bolhas de ar formadas ao longo do processo. Posteriormente, para permitir a solidificação do gel, a placa foi incubada a uma temperatura de 37°C, durante 1 hora. Findado este período, adicionaram-se 150 μ L de meio de cultura sem FBS a cada poço, sendo este considerado o tempo zero do estudo. As placas foram mantidas na incubadora à temperatura de 37°C ao longo da experiência. A capacidade migratória das células foi monitorizada às 0, e 24, 48 e 72 horas após o tempo zero definido anteriormente, através da captura de imagens com uma ampliação de 40X e de 100X, usando o *software Motic Images Plus 2.0 ML*, associado ao microscópio ótico invertido (Motic AE31) com uma câmara acoplada.

Tal como a migração, a análise da invasão celular foi realizada através do ensaio em matrigel para esferoides de células PC3 cultivados e irradiados nas mesmas condições, garantindo-se também a manutenção de todo o material no interior de um suporte com gelo. Para tal, começou-se por remover cautelosamente 100 µL do meio de cultura de cada poço da placa ULA, procedendo-se à adição de 50 µL de matrigel por poço, de forma a permitir a penetração da matriz extracelular pelas células tumorais para o microambiente circundante (Vinci et al., 2015). As técnicas descritas anteriormente, referentes à manutenção do esferoide no centro do poço e à eliminação das bolhas de ar, devem ser também asseguradas nesta metodologia. No entanto, caso não se verifique a correta execução das mesmas, pode-se efetuar a centrifugação da placa durante 4 minutos com uma aceleração de 300 xG e à temperatura de 4°C. De seguida, para permitir a solidificação da matrigel, incubou-se a placa à temperatura de 37°C durante 1 hora e, após este período, adicionaram-se 100 µL de meio não suplementado com FBS. A avaliação da capacidade de invasão das células foi realizada nas mesmas condições e do mesmo modo que monitorização da migração celular.

3.2. Dosimetria *in vitro* do rádio-223: Formalismo MIRD

A eficácia da terapia com radiofármacos, neste caso com o rádio-223, depende da capacidade da realização de um planeamento que garanta a maximização do efeito terapêutico paralelamente com a minimização dos efeitos adversos nos tecidos saudáveis. No entanto, a chave para o sucesso a longo prazo desta modalidade terapêutica baseia-se na implementação de estratégias que permitam ultrapassar as limitações da captação não uniforme dos radiofármacos pelas células tumorais o que, muitas vezes, se apresenta como uma barreira na sua aplicabilidade. Assim, torna-se essencial proceder à determinação das doses resultantes da incorporação de radiofármacos. Ainda que se esteja perante uma disponibilidade limitada de ferramentas adequadas para a otimização e para o planeamento da terapia com radionuclídeos, o formalismo MIRD (do inglês, *Medical Internal Radiation Dose*) permite a conversão dos valores de atividade incorporada em doses absorvidas, tendo em consideração fatores sobre a cinética e a energia de radiação emitida pelo radionuclídeo e as características das células alvo (Katugampola et al., 2022b).

3.2.1. Determinação das dimensões celulares através de microscopia confocal

O formalismo MIRD pressupõe a determinação da estrutura celular, nomeadamente o raio da célula e do núcleo. Para tal, recorreu-se à microscopia confocal, uma técnica de imagem baseada na focalização de um feixe de laser numa pequena secção da amostra. Como resultado desta incidência, ocorre a emissão de luz por parte da amostra, cuja deteção exclusiva é garantida através da utilização de um sistema de *pinholes*, que permitem a eliminação de qualquer fonte de luz exterior ao foco. Após a obtenção dos diversos planos é realizada a sua reconstrução tridimensional, obtendo-se imagens nítidas e de alta resolução (Elliott, 2020).

A obtenção de imagens por microscopia confocal foi realizada em cultura 2D aderente e em suspensão, e em cultura 3D. Assim, para cada linha celular, foram semeadas 80 000 células por lamela, colocadas em cada poço de placas de 24 poços e, posteriormente, incubadas durante 24 horas para promover a sua aderência. No caso das culturas 3D, foram semeadas 1 000 e 5 000 células por poço da linha celular PC3 em placas ULA, já previamente mencionadas. Após o tempo de incubação, as

culturas celulares foram marcadas com 1 μL (2D) ou 0,4 μL (3D) de CytoPainter Green Fluorescence (Abcam, ab176735), um marcador emissor de fluorescência verde, com comprimento de emissão entre os 511-525 nm e de excitação de 488 nm, convencionalmente utilizado como corante de membranas celulares intactas. Posteriormente, as placas foram protegidas da luz e incubadas à temperatura de 37°C durante 30 minutos.

Após a realização deste conjunto de etapas, recorreu-se a um microscópio confocal de varrimento a laser LSM 710 Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss, Germany) e à utilização de objetivas de ampliação EC Plan-Neofluar 10X/0.3 M27 e Plan-Apochromat 20X/0.8 M27, garantindo a seleção cuidadosa dos lasers de acordo com as sondas em utilização e os seus comprimentos de onda de emissão e excitação. Seguidamente, através do programa *Zen 3.6 Blue Edition* (ZEISS Microscopy), procedeu-se à reconstrução tridimensional das imagens dos múltiplos planos dos esferoides de células de cancro da próstata, as *Z-stacks*, adquiridas com intervalos de 210 μm . Por fim, as dimensões celulares pretendidas foram obtidas através do *software ImageJ* (Rasband, W.S., U. S. National Institutes of Health), um programa amplamente utilizado na análise e processamento de imagens digitais.

3.2.2. Determinação da distância entre células

A avaliação da dose absorvida numa célula depende não só da dose de radiação em si depositada, mas também da dose recebida das células da sua vizinhança celular, pelo que a distância a que as células se encontram umas das outras é muito importante. Por este motivo, para obter os valores da dose absorvida em ensaios que requerem o estabelecimento de culturas celulares cultivadas com concentrações distintas, é também condição necessária a determinação da distância média entre os núcleos das células (Figura 18). Como tal, este procedimento foi realizado tendo em conta as diferentes condições que se pretenderam analisar através da captura fotográfica 24 horas após se terem semeado 30 000 ou 1 500 células por poço em placas de 24 ou de 6 poços, respetivamente. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 100X, através do *software Motic Images Plus 2.0 ML*, incorporado no microscópio ótico invertido (Motic AE31) com uma câmara fotográfica acoplada e, posteriormente analisadas, recorrendo ao *software ImageJ* (Rasband, W.S., U. S. National Institutes of Health).

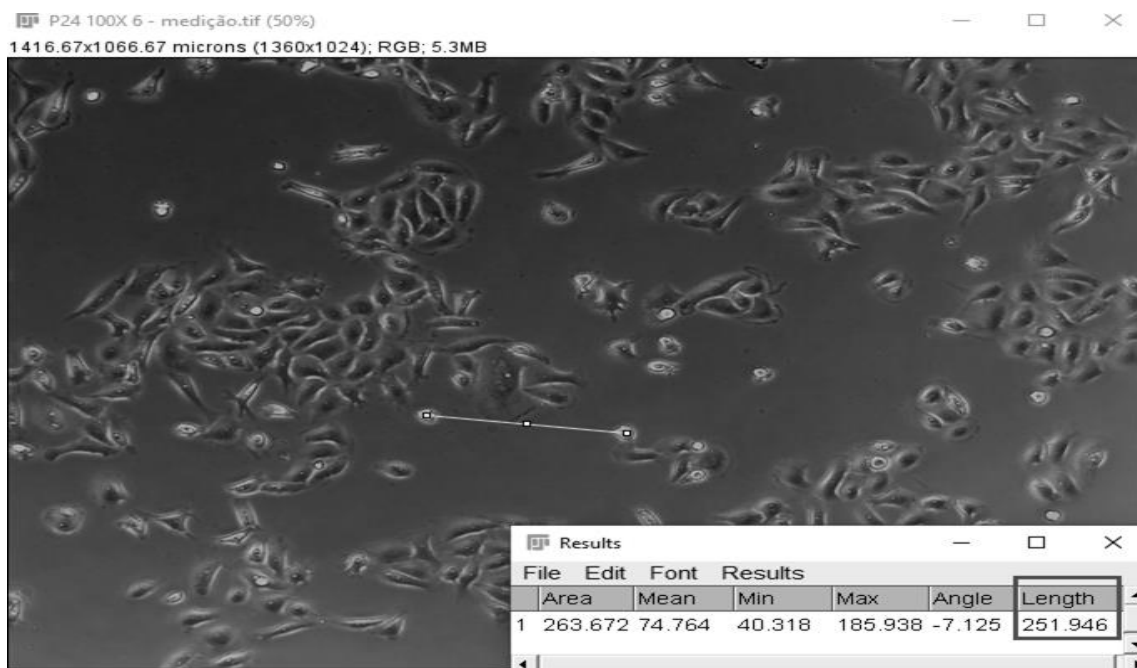


Figura 18: Exemplo da determinação da distância entre células (em μm) através do programa ImageJ.

3.2.3. Determinação dos *S-values*

De forma a assegurar corretamente o cálculo da dose absorvida e a avaliação dosimétrica a nível celular é necessário ter em conta a cinética celular do rádio-223, considerando-se os valores da sua captação, retenção e as frações de internalização no citoplasma e no núcleo, assim como a adsorção na membrana celular (Tabela 2).

Tabela 2: Captação, retenção celular e frações de internalização nuclear, citoplasmática e de adsorção na membrana celular das células PC3 e LNCaP. Retirado de (Marques et al., 2021).

Linha celular	Captação celular (%)	Retenção celular (%)	Internalização citoplasmática (%)	Internalização nuclear (%)	Adsorção superficial (%)
PC3	1,43	3,99	40,65	27,07	32,28
LNCaP	1,39	5,45	37,22	28,17	36,41

A determinação da dose absorvida exige também a definição prévia de um fator *S*, o *S-value*, que representa a dose média absorvida numa região alvo (r_T) por decaimento originada por uma região fonte (r_S). Para tal, recorreu-se ao *software MIRDcell V3.12* para obter este valor, tendo em conta a Equação 4, baseada em diversos parâmetros, nomeadamente a massa da região alvo, $m(r_T)$, a energia média (ou individual) da transição nuclear i , E_i , o número de transições nucleares por transformação nuclear, Y_i , e a fração de absorção específica, ϕ_i (Bolch et al., 2009; Katugampola et al., 2022a). Tal como representado na Figura 19, é possível observar a interface do software onde, através da inserção dos parâmetros previamente referidos, se obtém os valores dos *S-values*.

$$S(r_T \leftarrow r_S) = \sum_i \frac{E_i Y_i \phi_i(r_T \leftarrow r_S)}{m(r_T)}$$

Equação 4: Cálculo do fator S, o *S-value* (Gy/Bq.s), representante da dose média absorvida numa região alvo (r_T) por decaimento originada por uma região fonte (r_S) (Katugampola et al., 2022a).

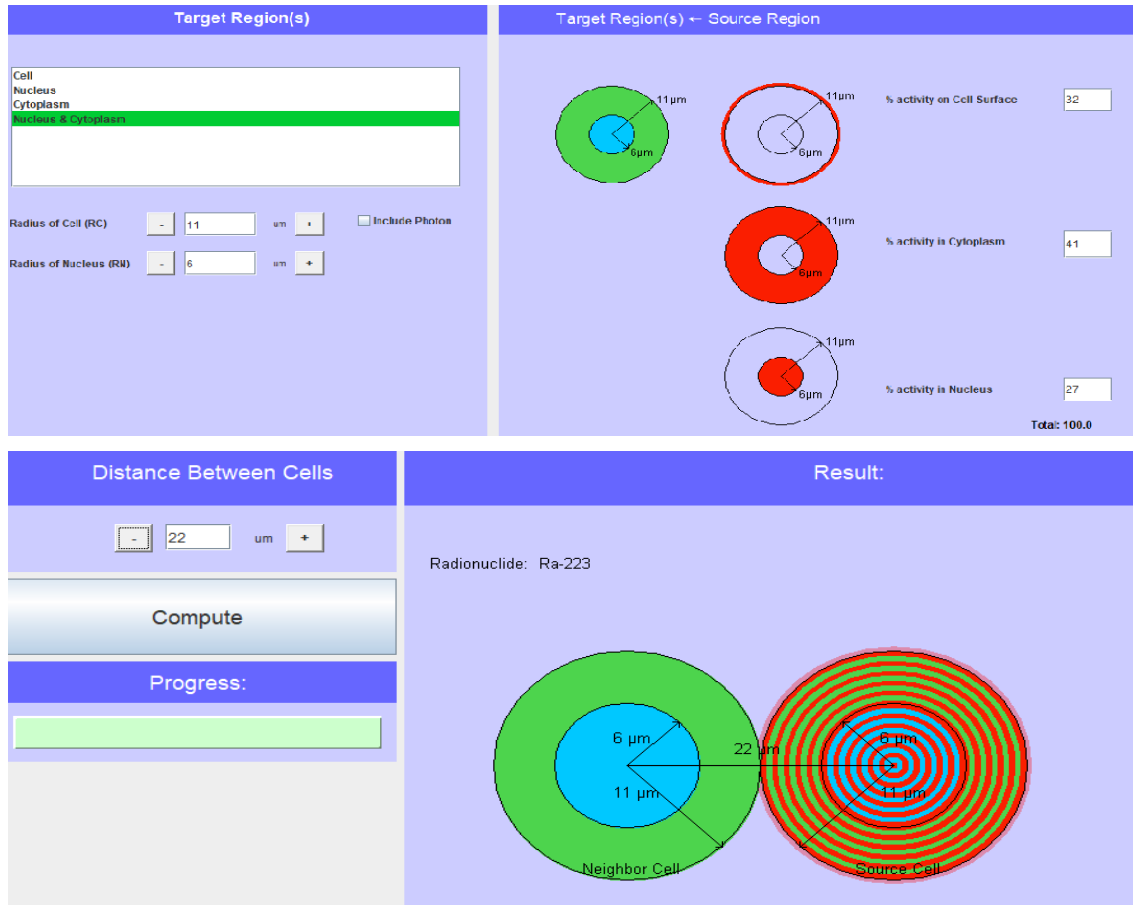


Figura 19: Interface do *software MIRDcell V3.12* para o cálculo dos *S-values*.

3.2.4. Cálculo da dose absorvida

A Equação 5 descreve a expressão geral do cálculo da atividade integrada no tempo, $\tilde{A}(t_1, t_2)$, correspondente ao número de desintegrações que ocorrem na região em estudo durante um intervalo de tempo considerado. Neste caso, $T_{1/2}$ (em segundos) representa o tempo de meia vida do rádio-223, A_0 (em Bq) a atividade inicial administrada e t_1 e t_2 (em segundos) os tempos de início e de fim da irradiação, respetivamente (Belchior et al., 2020; Hardiansyah et al., 2021).

$$\tilde{A} = \int_{t_1}^{t_2} A_0 e^{\frac{-0,693t}{T_{1/2}}} dt$$

Equação 5: Cálculo da atividade integrada no tempo entre os instantes t_1 e t_2 (Belchior et al., 2020).

Através da resolução do integral expresso na Equação 5, foi possível obter a Equação 6, representativa do valor da atividade integrada no tempo, tendo em conta as diferentes condições de exposição celular à radiação. Deste modo, C_c representa a captação celular, R_c a retenção celular e t_1 e t_2 (em segundos) os tempos decorrentes entre a remoção do radiofármaco e a realização do ensaio em estudo, respetivamente.

$$\tilde{A} = 1,44T_{1/2}A_0C_c \left(1 - e^{-\frac{0,693 \times t_1}{T_{1/2}}} \right) + 1,44T_{1/2}A_0C_cR_c \left(e^{-\frac{0,693 \times t_1}{T_{1/2}}} - e^{-\frac{0,693 \times t_2}{T_{1/2}}} \right)$$

Equação 6: Cálculo da atividade integrada no tempo, tendo em conta as diferentes condições de exposição celular à radiação.

Posteriormente, para obter o valor da dose absorvida numa célula, foi considerada a Equação 7, que relaciona a atividade integrada no tempo, \tilde{A} , a fração de internalização nuclear, Int_N , a fração de internalização citoplasmática, Int_{Cy} , a fração de adsorção na membrana celular, Int_{Cs} , e os *S-values* previamente calculados, sendo $S(r_T \leftarrow r_s)$, representante da dose média absorvida numa região alvo (r_T) por decaimento originada por uma região fonte (r_s). Como tal, $S(C \leftarrow C)$ corresponde ao *S-value* resultante da interação do radionuclídeo no interior da célula, 'N' ao núcleo, 'C_y' ao citoplasma, e 'C_s' à membrana celular. A determinação da contribuição da vizinhança celular na dose absorvida por uma célula pode ser realizada seguindo o mesmo princípio da Equação 7, mas substituindo os *S-values* para os valores dos *S-values* correspondentes à distância média a que as células vizinhas se encontram. Finalmente, a dose total absorvida numa célula é dada pela Equação 8.

$$Dose\ Absorvida = \frac{\tilde{A} \times \left[(Int_N + Int_{Cy}) * S(C \leftarrow C) + Int_{Cs} * (S(N \leftarrow C_s) + S(C_y \leftarrow C_s)) \right]}{N^o\ células\ semeadas}$$

Equação 7: Cálculo da dose absorvida numa célula (Gy).

$$\begin{aligned} Dose\ total\ absorvida \\ &= Dose\ (em\ que\ a\ fonte\ é\ a\ própria\ célula) \\ &+ Dose\ (em\ que\ a\ fonte\ são\ as\ células\ vizinhas) \end{aligned}$$

Equação 8: Cálculo da dose total absorvida numa célula (Gy).

É de notar que a realização dos cálculos dosimétricos foi baseada em experiências previamente realizadas em 2D, tendo em conta várias técnicas, como a análise do conteúdo proteico e avaliação do fator de sobrevivência, ambas efetuadas em diferentes condições de irradiação.

3.2.5. Simulação das curvas de sobrevivência

Além do cálculo da dose absorvida por célula, a metodologia em estudo permite também determinar as curvas de sobrevivência para culturas em monocamada e esferoides sujeitos a diferentes atividades volúmicas iniciais administradas. Para tal, como demonstrado na Figura 20, é necessário definir um conjunto de parâmetros. No caso tridimensional assumiu-se que a distância internuclear das células do esferoide era de 22 μm e que o mesmo apresentava forma esférica e um raio de 326 μm . Além disso, considerou-se também a presença de um volume de células não marcadas, a 'cold region', presente no centro do esferoide e definida através da especificação automática da profundidade de penetração do rádio-223 a partir da superfície do agregado que,

posteriormente, é analisada de acordo com algoritmos dependentes da geometria do *cluster* e do método de marcação escolhido (Howell et al., 2023). A atividade máxima média por célula corresponde ao rácio entre a atividade internalizada e o número de células do agregado 3D e o coeficiente da atividade integrada no tempo é determinado de acordo com a Equação 9, em horas (h) (Katugampola et al., 2022a).

$$\text{Coeficiente da atividade integrada no tempo} = \frac{\tilde{A}}{A_0}$$

Equação 9: Cálculo do coeficiente da atividade integrada no tempo (h) (Katugampola et al., 2022a).

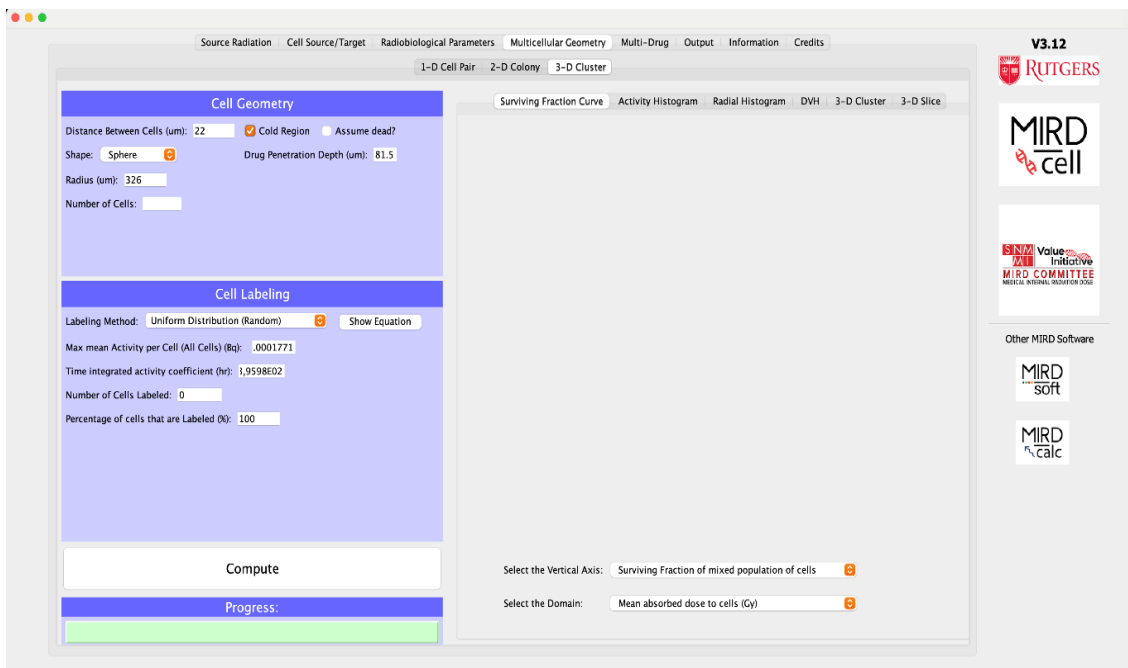


Figura 20: Interface do *software MIRDcell V3.12* para a determinação das curvas de sobrevivência.

Seguidamente, foi então possível obter as curvas de sobrevivência, que relacionam a dose de radiação com o fator de sobrevivência celular. Este procedimento foi realizado tendo em conta o método de Monte Carlo, descrito por Howell et al., 2012, que, de um modo simplificado, atribui uma probabilidade de sobrevivência a cada célula, calculada através da substituição dos S-values determinados previamente, nas equações descritas no capítulo 7 do MIRDcell User Manual (Howell et al., 2023). Todo este processo é repetido para vários valores da atividade média por célula, até ao valor máximo da mesma, atribuído pelo usuário. Finalmente, a fração de células sobreviventes é representada graficamente, em função da dose absorvida ou da atividade volúmica, quer para as células marcadas, células não marcadas, ou ambas, dependendo da seleção dos parâmetros das ordenadas e abcissas, efetuada pelo utilizador. Para ambos os casos, em 2D ou em 3D, a atividade máxima média inserida na simulação das curvas foi calculada tendo como base a atividade volúmica de 55 Bq/mL.

3.3. Análise Estatística

Os resultados obtidos ao longo da realização das metodologias previamente descritas foram processados com o auxílio do *software GraphPad Prism* (versão 9.5.0 para Windows, GraphPad Software), que permitiu a obtenção dos gráficos e a respetiva análise estatística, apresentados no capítulo seguinte. Primeiramente, para verificar se os dados seguiam uma distribuição normal, aplicou-se o teste de normalidade *Shapiro-Wilk*. Caso os dados seguissem uma distribuição normal, a sua análise seguia-se com a realização de testes paramétricos, enquanto para os dados que não seguissem esse tipo de distribuição, sucedia-se a utilização de testes não paramétricos. A avaliação dos efeitos radiobiológicos do rádio-223, em particular a análise da estrutura dos esferoides após irradiação, foi realizada através do teste ANOVA de 2 fatores e dos testes de *Dunnnett* e de *Tukey* para as comparações múltiplas, comparando as médias entre os diferentes grupos de variáveis. No ensaio *CellTiterGlo-3D*[®], recorreu-se ao teste ANOVA de 1 fator em simultâneo com o teste de *Tukey* para comparar as diferentes atividades administradas. Relativamente aos cálculos dosimétricos, estes foram estatisticamente analisados através do teste ANOVA de 1 fator e do teste de *Dunnnett* para as comparações múltiplas. Sempre que $p < 0,05$, considerou-se que as diferenças eram estatisticamente significativas.

4. Resultados¹

¹Os resultados foram obtidos em coautoria com a Mestre Inês Marques.

4.1. Efeitos radiobiológicos do rádio-223 em culturas 3D de CaP

De forma a avaliar os efeitos radiobiológicos do rádio-223 em culturas celulares de cancro da próstata e a determinar a dosimetria do radiofármaco, foi fundamental estabelecer e analisar a formação de estruturas celulares 3D, nomeadamente esféricas, a partir das células PC3 e LNCaP. Seguidamente, recorreu-se a um conjunto de metodologias que permitiu aferir os efeitos radiobiológicos da exposição destes esféricos ao rádio-223, em específico na morfologia e estrutura dos esféricos, na viabilidade, na migração e na invasão celulares.

4.1.1. Caracterização dos esféricos (PC3 e LNCaP)

Como descrito na secção anterior, recorreu-se à técnica de sobreposição líquida para obter esféricos de células PC3 e LNCaP, com diferente número inicial de células, sendo a evolução dos mesmos monitorizada microscopicamente durante, pelo menos, 8 dias. De acordo com o seguimento da evolução dos esféricos, verificou-se que o tempo necessário para a formação de esféricos compactos, coesos e uniformes foi variável, de acordo com a linha celular e com o número de células iniciais semeadas. Deste modo, esféricos de células PC3 com 5 000 e 1 000 células/esférico necessitaram de 2 e 6 dias, respetivamente, para se estabelecerem (Figura 21).

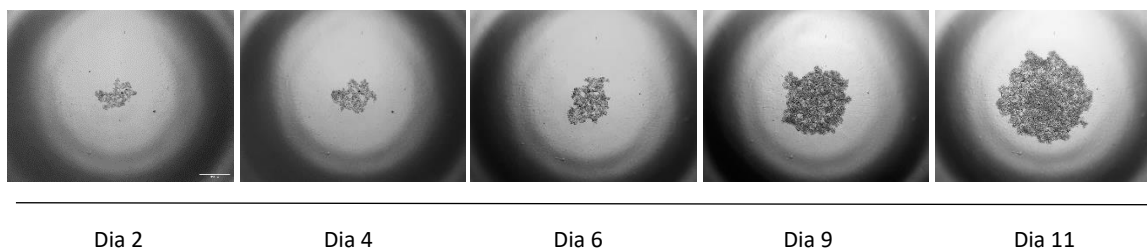


Figura 21: Esquema da evolução temporal dos esféricos de células PC3, estabelecidos a partir de 1 000 células iniciais, através da técnica de sobreposição líquida em placas ULA de 96 poços. O dia 2 corresponde a 48 horas após se semear as células nos poços. As imagens foram obtidas através de um microscópio ótico invertido com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 600 µm.

No caso dos esféricos de células LNCaP (Figura 22), verificou-se que o seu estabelecimento exibia uma evolução bastante distinta comparativamente à evolução dos esféricos de células PC3, tornando-se evidente que a realização da centrifugação era essencial para a agregação dos diversos aglomerados celulares espalhados pelo poço num único esférico. Deste modo, ao adotar esta metodologia, foi possível obter esféricos coesos e de forma aproximadamente uniforme, 6 dias depois de se semear 1 000 células LNCaP. Os esféricos de 2 500 células necessitaram de um período temporal menor para o seu estabelecimento, verificando-se a sua forma coesa e arredondada 48 horas após o semear das células.

Resultados

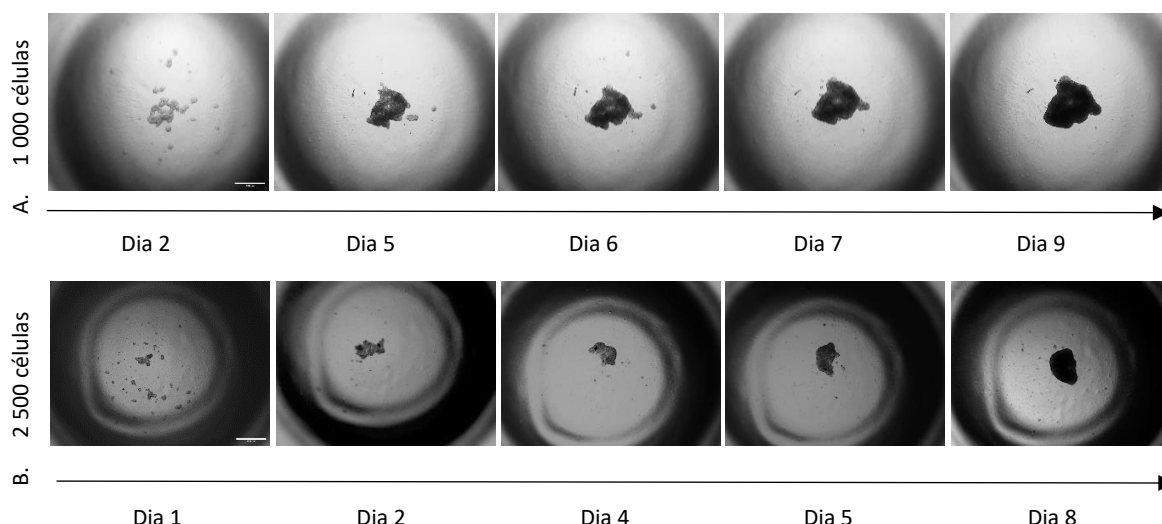


Figura 22: Esquema da evolução temporal dos esferoides de células LNCaP, estabelecidos a partir de 1 000 (A) ou 2 500 (B) células, através da técnica de sobreposição líquida em placas ULA de 96 poços. O dia 1 corresponde a 24 horas após se semear as células nos poços. As imagens foram obtidas através de um microscópio ótico invertido com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 600 μm .

A morfologia dos esferoides foi também observada por microscopia confocal, 10 dias após o início da experiência, utilizando, para isso, o marcador *CytoPainter* #ab176735 (Abcam), que se liga a membranas celulares intactas com emissão de fluorescência verde. As imagens obtidas (Figura 23) evidenciam as diferenças entre os esferoides de células PC3 constituídos inicialmente por 1 000 ou 5 000 células. É notável, através da análise qualitativa destas imagens, uma marcação membranar mais evidente na periferia dos esferoides comparativamente ao seu *core*, o que traduz a existência de um menor número de células com membrana intacta nesta zona. Além disso, verificou-se ainda que os esferoides constituídos a partir de 5 000 células apresentavam maior dimensão comparativamente aos esferoides compostos inicialmente por 1 000 células.

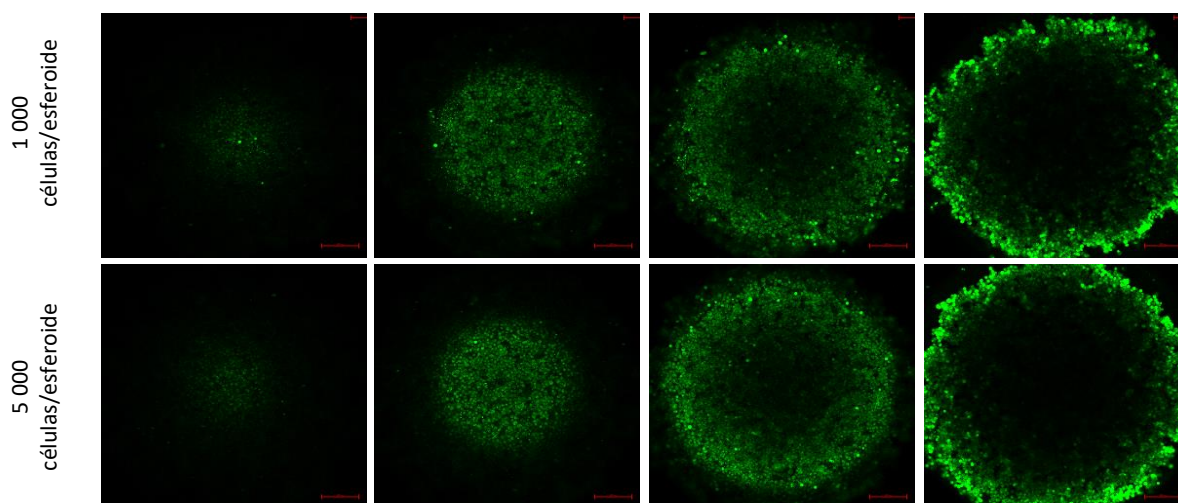


Figura 23: Imagens representativas da morfologia dos esferoides da linha celular PC3 em diversos planos de Z, 10 dias após o início da realização da experiência. A cor verde mostra a marcação da membrana celular após 24h de incubação com *CytoPainter* #ab176735 (Abcam). As imagens foram obtidas por microscopia confocal, com ampliação de 10X, em planos adquiridos com intervalos de 210 μm . A escala corresponde a 200 μm .

Nos resultados seguidamente apresentados, relativos à análise dos efeitos radiobiológicos do rádio-223, o dia 1 será considerado como o dia da irradiação, independentemente do tipo de esferoide estabelecido.

4.1.2. Morfometria dos esferoides

Esferoides de células PC3

O estudo da morfologia dos esferoides com 1 000 células PC3 foi realizado a nível qualitativo e quantitativo desde o momento da sua irradiação (dia 1), com diferentes atividades volúmicas iniciais, e durante os 8 dias que se sucederam.

A Figura 24 representa a evolução temporal da morfologia dos esferoides quando expostos à radiação emitida pelo rádio-223, sendo evidente a sua influência no crescimento e na integridade dos mesmos. Assim, através da análise das imagens obtidas, verificou-se qualitativamente que a progressão dimensional dos esferoides irradiados, comparativamente aos esferoides não irradiados, foi menor. Este efeito foi observável com todas as atividades volúmicas iniciais em estudo, mas principalmente a partir do quinto dia e para atividades iguais ou superiores a 3 520 Bq/mL. Assim, verificou-se que o aumento da atividade volúmica inicial parece induzir uma crescente desintegração dos esferoides, provocando um decréscimo na sua taxa de crescimento.

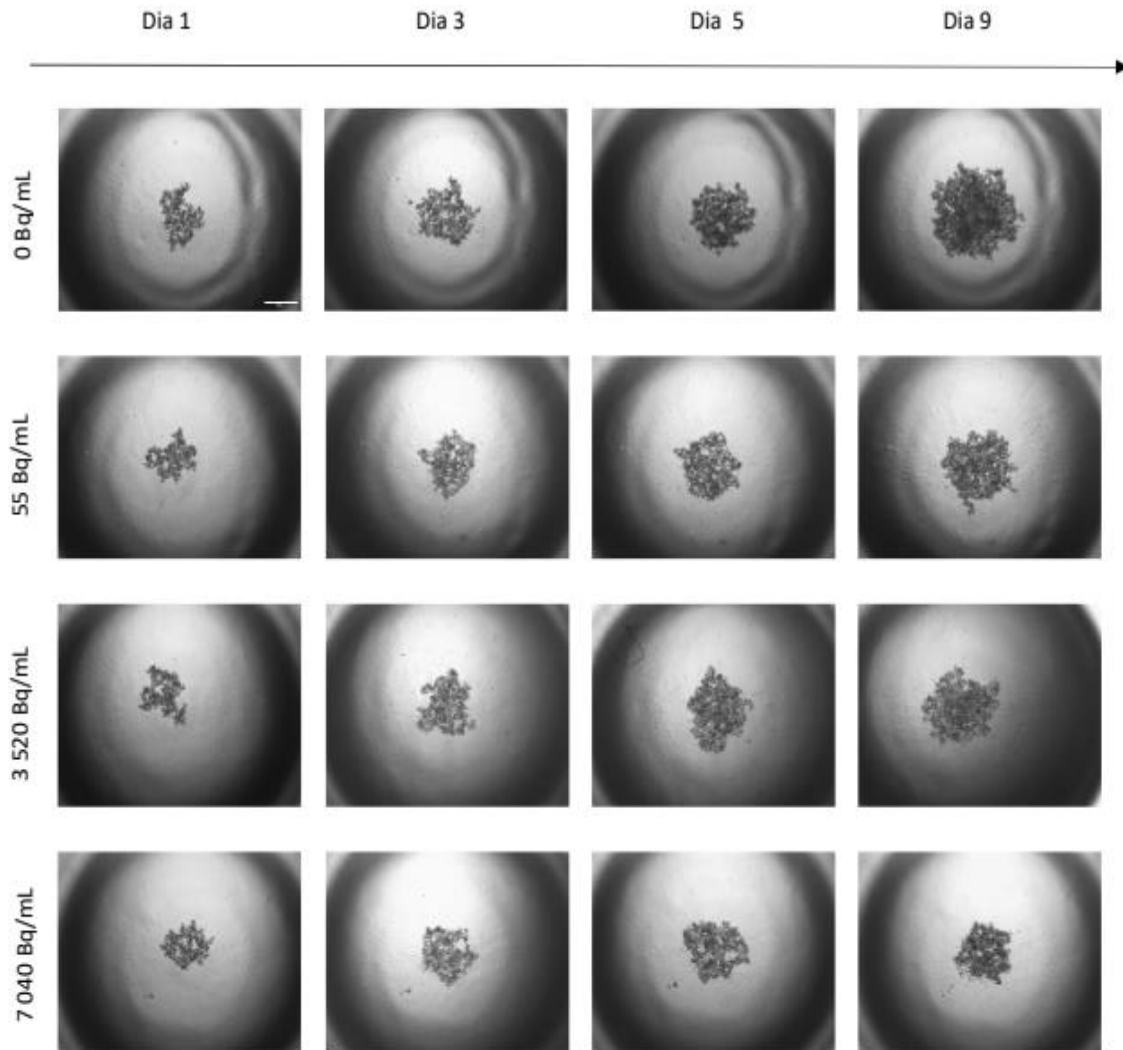


Figura 24: Pannel representativo da evolução temporal dos esfereoides com 1 000 células PC3 após irradiação, durante 24h, com uma atividade volúmica inicial de 0, de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL de rádio-223. As imagens foram adquiridas aos dias 1 (adição da atividade volúmica de rádio-223), 3, 5 e 9, recorrendo a um microscópio ótico invertido, com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 600 μm .

A análise quantitativa da evolução dos esfereoides realizou-se com recurso ao *software AnaSP* para avaliar a evolução da área (Figura 25a), do diâmetro equivalente (Figura 25b), do perímetro (Figura 25c), da circularidade (Figura 26a), do volume (Figura 26b), da compacidade (Figura 26c) e da esfericidade (Figura 26d) dos esfereoides. A análise estatística dos valores obtidos foi realizada através do teste ANOVA de 2 fatores e do teste de *Dunnett*, cujos valores-p se encontram nos gráficos (comparação entre os dias um e nove, para a mesma condição) e na Tabela 3 (comparação entre cada grupo irradiado e os esfereoides controlo, no nono dia de monitorização).

Resultados

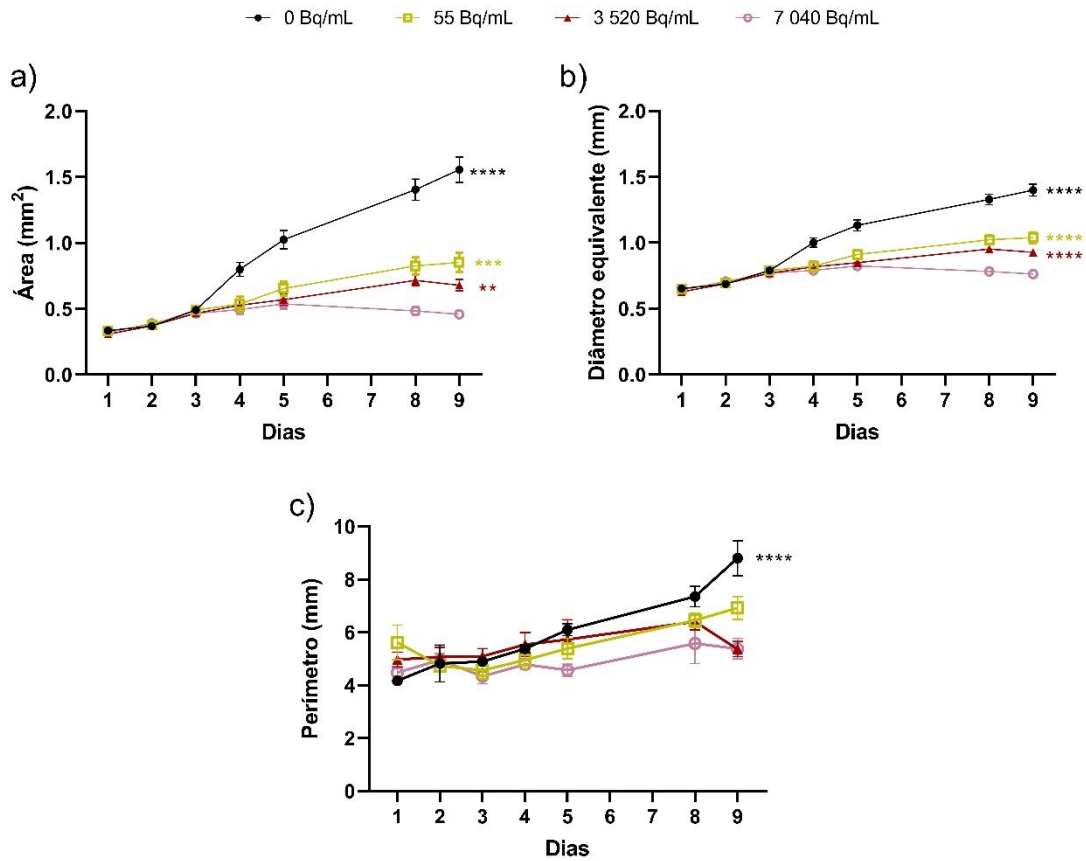


Figura 25: Representação gráfica da evolução da área (a), do diâmetro equivalente (b) e do perímetro (c) dos esferoides com 1 000 células PC3 quando sujeitos à irradiação com rádio-223. O dia 1 corresponde ao dia da irradiação com as atividades volúmicas de 0, de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL. Os resultados são apresentados como a média \pm erro-padrão de 2 experiências independentes, realizadas em triplicado, e analisados estatisticamente através da comparação entre os dias 1 e 9, para todas as condições, recorrendo ao teste ANOVA de 2 fatores e ao teste de *Dunnnett* (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Resultados

Tabela 3: Análise estatística dos parâmetros representados na Figura 25 através do teste ANOVA de 2 fatores e do teste de *Dunnnett*. Os valores-p correspondem à comparação entre a condição controlo e as condições de irradiação com as várias atividades volúmicas no dia 9 (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$).

		Comparações	Valor-p	Representação
Área	0 Bq/mL	55 Bq/mL	<0,0001	****
		3 520 Bq/mL	<0,0001	****
		7 040 Bq/mL	<0,0001	****
Diâmetro Equivalente	0 Bq/mL	55 Bq/mL	<0,0001	****
		3 520 Bq/mL	<0,0001	****
		7 040 Bq/mL	<0,0001	****
Perímetro	0 Bq/mL	55 Bq/mL	0,0150	*
		3 520 Bq/mL	<0,0001	****
		7 040 Bq/mL	<0,0001	****

De acordo com os gráficos apresentados na Figura 25 a) e b) e na Tabela 3, verifica-se que, em termos de área e do diâmetro equivalente, os esferoides apresentaram uma evolução semelhante ao longo dos nove dias. No primeiro dia, correspondente ao dia da irradiação, os esferoides irradiados apresentavam todos área e diâmetro equivalente médio semelhantes à área e ao diâmetro equivalente médio dos esferoides controlo, cujos valores foram $0,33 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ e $0,65 \pm 0,01 \text{ mm}$, respetivamente. Nos dias seguintes estes parâmetros foram aumentando de igual modo para todas as condições, evidenciando diferenças ao terceiro dia. Entre o quarto e o oitavo dia, a variação de ambos os parâmetros foi dependente da atividade inicial adicionada, apresentando diferenças estatisticamente significativas entre cada condição de irradiação e o grupo de controlo, para todos os dias correspondentes a esse intervalo. A estabilização do crescimento dos esferoides irradiados ocorreu a partir do oitavo dia. Assim, no último dia de monitorização (nono dia), quer a área, quer o diâmetro equivalente foram superiores aos valores iniciais em todos os grupos, apresentando diferenças significativas entre o grupo de controlo e todas as restantes condições. Mais especificamente, a área e o diâmetro equivalente médio dos esferoides controlo foram de $1,56 \pm 0,09 \text{ mm}^2$ e de $1,40 \pm 0,05 \text{ mm}$, enquanto para os esferoides irradiados com 55, 3 520 e 7 040 Bq/mL foram de $0,85 \pm 0,07 \text{ mm}^2$ ($p < 0,0001$) e de $1,04 \pm 0,05 \text{ mm}$ ($p < 0,0001$), de $0,68 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ ($p < 0,0001$) e de $0,93 \pm 0,03 \text{ mm}$ ($p < 0,0001$) e de $0,46 \pm 0,02 \text{ mm}^2$ ($p < 0,0001$) e de $0,76 \pm 0,02 \text{ mm}$ ($p < 0,0001$), respetivamente.

Relativamente ao perímetro, ainda que se esteja perante uma evolução irregular para todas os grupos irradiados, inicialmente o seu valor era semelhante em todas as condições, apresentando um valor médio para o grupo de controlo de $4,17 \pm 0,12 \text{ mm}$. No último dia de monitorização, apenas o grupo de controlo, demonstrava significância estatística comparativamente ao primeiro dia, apresentando um perímetro médio de $8,80 \pm 0,66 \text{ mm}$. No entanto, comparativamente aos esferoides

não irradiados, foi possível verificar que no nono dia este parâmetro apresentava uma diminuição do seu valor para todos os restantes grupos, manifestando uma diferença estatisticamente significativa entre todas as condições e o grupo de controlo. Assim, os esfereoides irradiados com uma atividade volúmica inicial de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL alcançaram um perímetro final de $6,92 \pm 0,43$ mm ($p=0,0150$), de $5,37 \pm 0,29$ mm ($p<0,0001$) e de $5,38 \pm 0,39$ mm ($p<0,0001$), respetivamente.

A Figura 26 mostra a evolução da circularidade (a), do volume (b), da compacidade (c) e da esfericidade (d) dos esfereoides ao longo dos nove dias. A análise estatística dos resultados foi realizada através do teste ANOVA de 2 fatores e do teste de *Dunnett*, cujos valores-p se encontram nos próprios gráficos (comparação entre os dias um e nove, para a mesma condição) e na Tabela 4 (comparação entre cada grupo irradiado e os esfereoides controlo, no nono dia de monitorização).

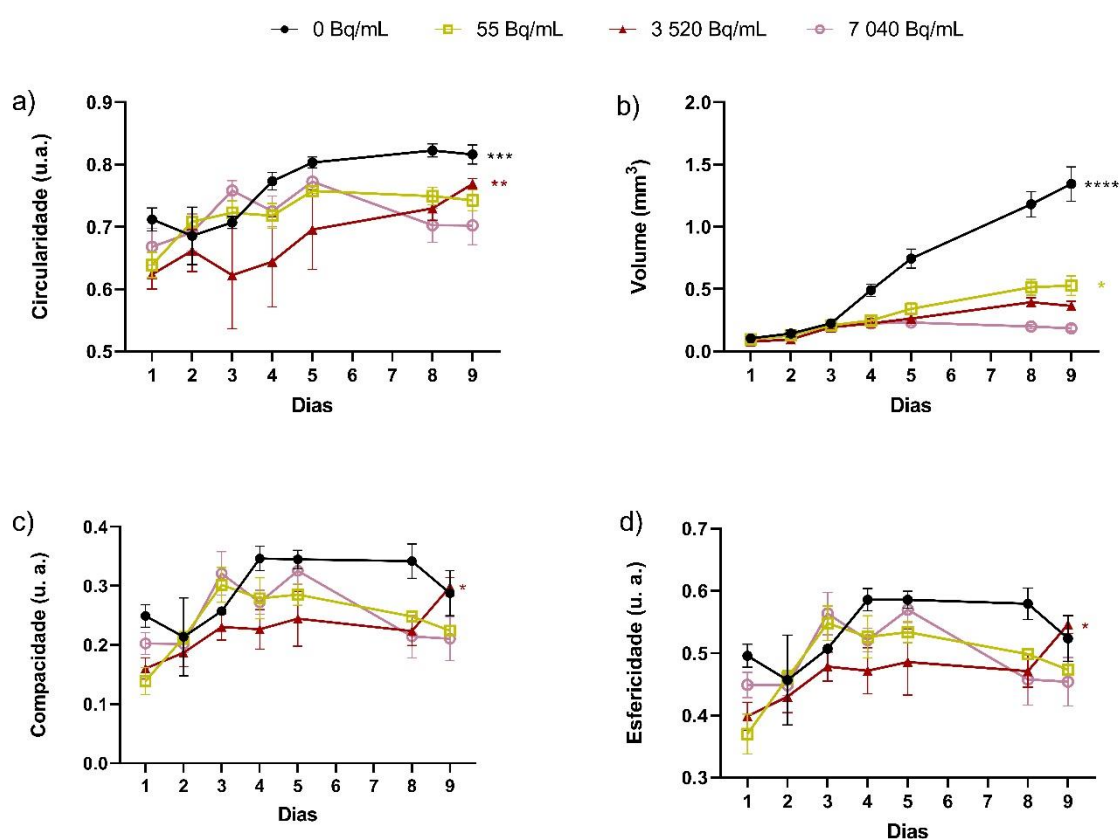


Figura 26: Representação gráfica da evolução da circularidade (a), do volume (b), da compacidade (c) e da esfericidade (d) dos esfereoides com 1 000 células PC3 quando sujeitos à irradiação com rádio-223. O dia 1 corresponde ao dia da irradiação com as atividades volúmicas de 0, de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL. Os resultados são apresentados como a média \pm erro-padrão de 2 experiências independentes, realizadas em triplicado, e analisados estatisticamente através da comparação entre os dias 1 e 9, para todas as condições, recorrendo ao teste ANOVA de 2 fatores e ao teste de *Dunnett* (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$).

Resultados

Tabela 4: Análise estatística dos parâmetros representados na Figura 26 através do teste ANOVA de 2 fatores e do teste de *Dunnnett*. Os valores-p correspondem à comparação entre a condição controlo e as condições de irradiação com as várias atividades volúmicas no dia 9 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

	Comparações		Valor- p	Representação
Circularidade	0 Bq/mL	7 040 Bq/mL	0,0055	*
Volume	0 Bq/mL	55 Bq/mL	<0,0001	****
		3 520 Bq/mL	<0,0001	****
		7 040 Bq/mL	<0,0001	****

No primeiro dia, a circularidade dos esferoides apresentou valores variáveis entre 0,58 u.a. (unidade arbitrária) e 0,80 u.a., com uma média de valores para o grupo de controlo de $0,71 \pm 0,01$ u.a.. Entre o primeiro e o último dia, a evolução deste parâmetro apenas se mostrou estatisticamente significativa para a condição controlo ($p=0,0007$) e para os esferoides irradiados com 3 520 Bq/mL ($p=0,0058$). No último dia, verificou-se diferença significativa entre os esferoides controlo e os esferoides sujeitos a 7 040 Bq/mL ($p=0,0055$), denotando-se uma diminuição deste valor de $0,82 \pm 0,02$ u.a. para $0,70 \pm 0,06$ u.a., respetivamente.

Relativamente ao volume, denotou-se que, no primeiro dia, os esferoides irradiados apresentavam um volume idêntico ao dos esferoides controlo, cujo volume médio foi de $0,10 \pm 0,008$ mm³, aumentando de forma idêntica para todas as condições até ao terceiro dia. Posteriormente, a sua variação foi dependente da atividade administrada mostrando, no entanto, um aumento estatisticamente significativo entre o terceiro e o nono dia apenas para a condição controlo ($p < 0,0001$). Durante todo o período de monitorização, ou seja, entre o primeiro e o nono dia, verificou-se um aumento do volume para todas as condições, mas estatisticamente significativo apenas para a condição controlo ($p < 0,0001$) e para os esferoides irradiados com 55 Bq/mL ($p=0,0357$). No nono dia, o volume médio dos esferoides não irradiados foi de $1,34 \pm 0,13$ mm³ e, relativamente a estes, todos os restantes demonstraram diferenças com significância estatística. Desta forma, os esferoides irradiados com 55, 3 520 e 7 040 Bq/mL atingiram um volume de $0,53 \pm 0,08$ mm³ ($p < 0,0001$), de $0,36 \pm 0,04$ mm³ ($p < 0,0001$) e de $0,18 \pm 0,02$ mm³ ($p < 0,0001$), respetivamente, verificando-se que o rádio-223 teve um efeito inibitório no crescimento dos esferoides.

Em termos da compacidade e da esfericidade dos esferoides, o comportamento foi semelhante. No primeiro dia, a média da compacidade e da esfericidade dos esferoides do grupo de controlo foram de $0,25 \pm 0,01$ u.a. e de $0,50 \pm 0,01$ u.a., respetivamente. Ainda que não tenha sido possível verificar uma evolução regular destes dois parâmetros, no geral, verificou-se um aumento de ambos entre o início e o fim do período em estudo, ainda que com maior variação com as atividades mais baixas. Deste modo, no nono dia, e comparativamente ao primeiro dia, apenas se verificou uma variação estatisticamente significativa para os esferoides irradiados com 3 520 Bq/mL, quer para a compacidade, $0,30 \pm 0,02$ u.a. ($p=0,0295$), quer para a esfericidade, $0,55 \pm 0,01$ u.a. ($p=0,0136$). No

nono dia, e relativamente ao controlo, nenhuma condição apresentou diferenças com significância estatística.

Esferoides de células LNCaP

O estudo da morfometria foi também realizado em esferoides de células LNCaP com 2 500 células, uma vez que se verificou um período de estabelecimento inferior comparativamente ao período requerido para o estabelecimento de esferoides desta linha celular, compostos por 1 000 células. Esta análise foi realizada a nível qualitativo e quantitativo, desde o momento da sua irradiação com diferentes atividades volúmicas iniciais, correspondente ao dia 1, e durante os cinco dias que se sucederam. Tal como no caso dos esferoides de células PC3, procedeu-se à sua monitorização e à determinação dos diversos parâmetros essenciais à avaliação da sua progressão morfométrica através do *software AnaSP*.

De acordo com a Figura 27 é possível observar a evolução temporal da morfologia dos esferoides quando expostos à radiação emitida pelo rádio-223 sendo, também para este caso, evidente a sua influência no crescimento e na integridade dos mesmos. Comparando a progressão morfológica dos esferoides irradiados com as imagens da condição controlo, este efeito foi observável para todas as atividades volúmicas em estudo, mas principalmente a partir do terceiro dia e para atividades iguais ou superiores a 3 520 Bq/mL. Deste modo, verificou-se que quanto maior a atividade volúmica administrada, maior é a desintegração dos esferoides e, consequentemente, maior a inibição do seu crescimento.

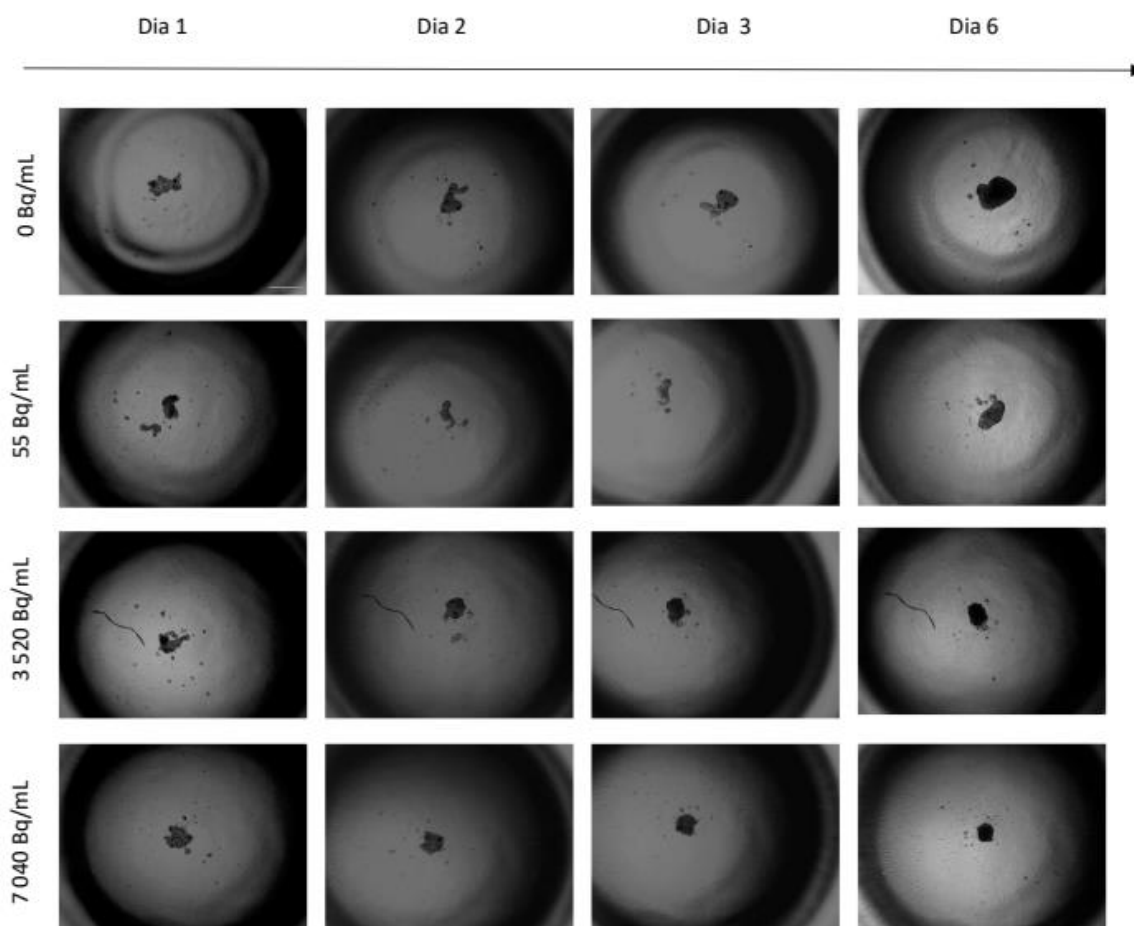


Figura 27: Painel representativo da evolução temporal dos esferoides com 2 500 células LNCaP após irradiação, durante 24h, com uma atividade volúmica inicial de 0, de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL de rádio-223. As imagens foram adquiridas ao dia 1 (adição da atividade volúmica de rádio-223), 2, 3 e 6, recorrendo a um microscópio ótico invertido, com uma ampliação de 40X. A escala apresentada corresponde a 600 μ m.

De acordo com a Figura 28 é possível observar a evolução da área (a), do diâmetro equivalente (b) e do perímetro (c) dos esferoides ao longo de seis dias. A análise estatística dos resultados foi realizada através do teste ANOVA de 2 fatores e do teste de *Dunnnett*, cujos valores-p se encontram nos gráficos (comparação entre os dias um e seis, para a mesma condição) e na Tabela 5 (comparação entre cada grupo irradiado e os esferoides controlo, no sexto dia de monitorização).

Resultados

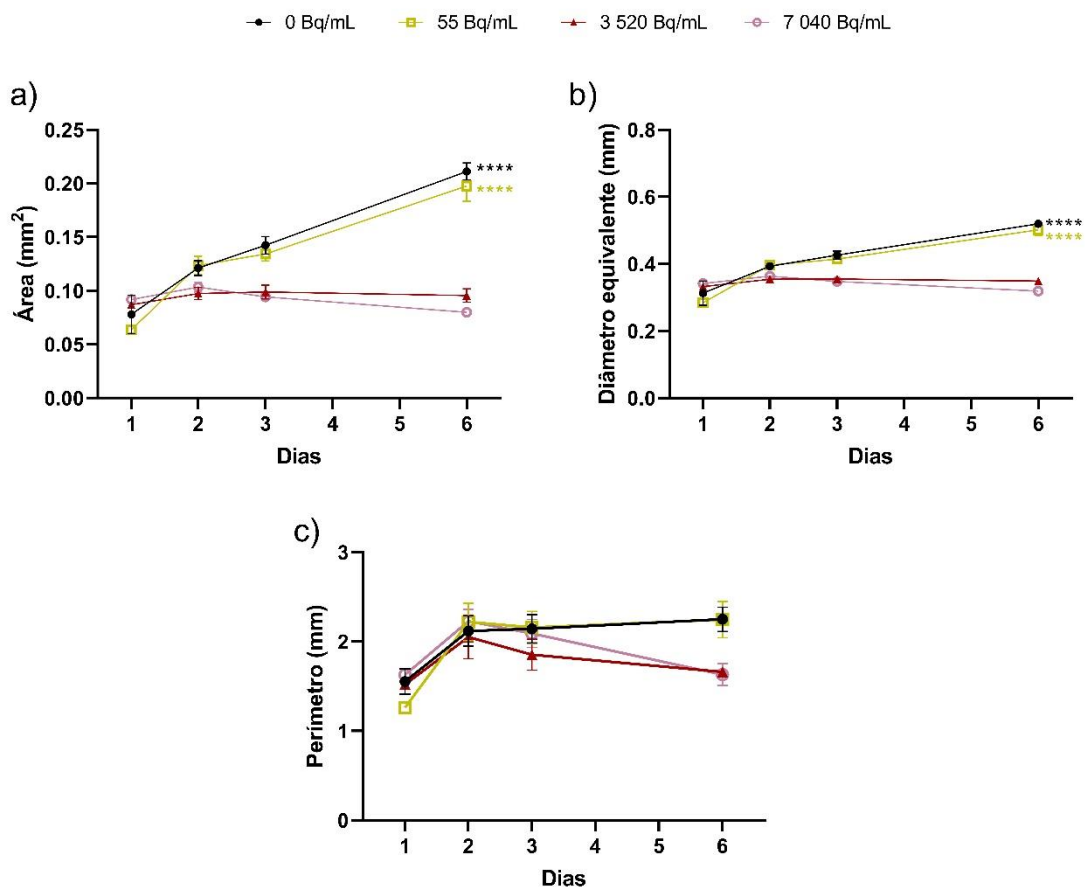


Figura 28: Representação gráfica da evolução da área (a), do diâmetro equivalente (b) e do perímetro (c) dos esferoides com 2 500 células LNCaP, quando sujeitos à irradiação com rádio-223. O dia 1 corresponde ao dia da irradiação com as atividades volúmicas de 0, de 55, de 3520 e de 7040 Bq/mL. Os resultados são apresentados como a média \pm erro-padrão de 1 experiência realizada em quintuplicado e analisados estatisticamente através da comparação entre os dias 1 e 6, para todas as condições, recorrendo ao teste ANOVA de 2 fatores e ao teste de *Dunnnett* (**** $p < 0,0001$).

Resultados

Tabela 5: Análise estatística dos parâmetros representados na Figura 28 através do teste ANOVA de 2 fatores e do teste de *Dunnnett*. Os valores-p correspondem à comparação entre a condição controlo e as condições de irradiação com as várias atividades volúmicas no dia 6 (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$).

		Comparações	Valor- p	Representação
Área	0 Bq/mL	3 520 Bq/mL	<0,0001	****
		7 040 Bq/mL	<0,0001	****
Diâmetro Equivalente	0 Bq/mL	55 Bq/mL	<0,0001	****
		3 520 Bq/mL	<0,0001	****
Perímetro	0 Bq/mL	3 520 Bq/mL	0,0388	*
		7 040 Bq/mL	0,0222	*

Observando os gráficos a) e b) da Figura 28, verifica-se que o conjunto de curvas representantes da área e do diâmetro equivalente demonstram uma evolução semelhante ao longo dos dias. Inicialmente, os esferoides irradiados apresentavam todos um tamanho idêntico aos esferoides do grupo de controlo, com uma área média de $0,08 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ e um diâmetro equivalente médio de $0,32 \pm 0,02 \text{ mm}$, aumentando de forma aproximadamente semelhante até ao sexto dia nas condições controlo e de irradiação mais baixa. Também as restantes condições demonstraram um comportamento semelhante entre si até ao sexto dia, com valores pouco variáveis ao longo deste período. No sexto dia, quer a área quer o diâmetro equivalente apresentaram valores superiores aos valores iniciais com significância estatística para as condições controlo e 55 Bq/mL. No último dia, a área e o diâmetro equivalente dos esferoides controlo foram de $0,21 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ e de $0,52 \pm 0,01 \text{ mm}$, respetivamente, e, comparativamente a este grupo, todas as condições de irradiação demonstraram diferenças estatisticamente significativas, excetuando o grupo irradiado com 55 Bq/mL. Deste modo, os esferoides irradiados com 3 520 e com 7 040 Bq/mL obtiveram uma área e um diâmetro equivalente de $0,1 \pm 0,005 \text{ mm}^2$ ($p < 0,0001$) e de $0,35 \pm 0,01 \text{ mm}$ ($p < 0,0001$) e de $0,08 \pm 0,003 \text{ mm}^2$ ($p < 0,0001$) e de $0,32 \pm 0,01 \text{ mm}$ ($p < 0,0001$), respetivamente. De uma forma geral, o rádio-223 foi responsável por inibir o crescimento dos esferoides em análise, estagnando a sua área e o seu diâmetro.

No primeiro dia, o valor do perímetro foi semelhante em todas as condições, apresentando um valor médio de $1,55 \pm 0,06 \text{ mm}$ para o grupo de controlo. A partir do segundo dia, a evolução deste parâmetro foi semelhante para a condição controlo e para os esferoides irradiados com 55 Bq/mL, que, comparativamente aos restantes grupos, demonstraram um acréscimo superior. No último dia de monitorização, nenhuma condição demonstrou significância estatística relativamente ao primeiro dia. No entanto, comparativamente aos esferoides não irradiados, foi possível verificar que no sexto

dia o perímetro apresentou uma diminuição do seu valor para os dois grupos irradiados com atividades superiores, manifestando uma diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos e o grupo de controlo. Assim, os esfereoides irradiados com uma atividade de 3 520 e de 7 040 Bq/mL alcançaram um perímetro final de $1,66 \pm 0,03$ mm ($p=0,0388$) e de $1,63 \pm 0,11$ mm ($p=0,0222$), respetivamente.

A Figura 29 representa a evolução da circularidade (a), do volume (b), da compacidade (c) e da esfericidade (d) dos esfereoides ao longo dos seis dias. A análise estatística dos resultados foi realizada através do teste ANOVA de 2 fatores e do teste de *Dunnnett*, cujos valores-p se encontram nos próprios gráficos (comparação entre os dias um e seis, para a mesma condição) e na Tabela 6 (comparação entre cada grupo irradiado e os esfereoides controlo, no sexto dia de monitorização).

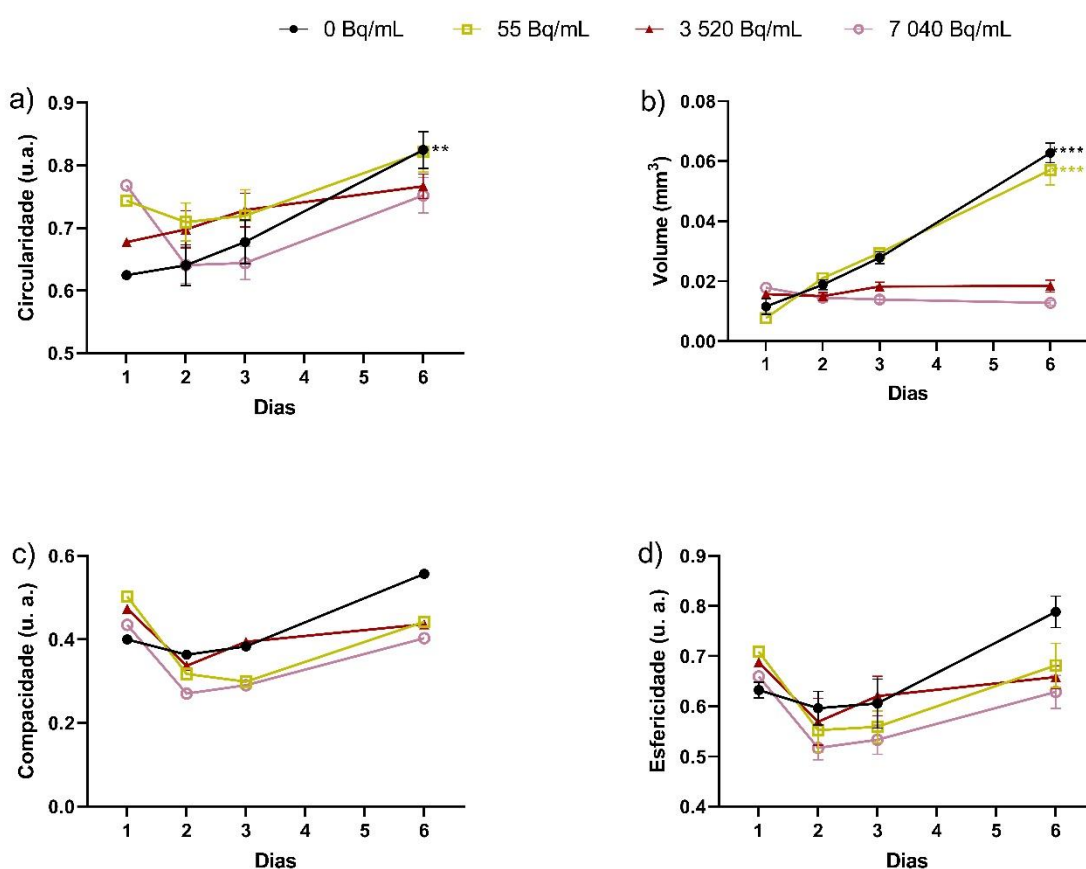


Figura 29: Representação gráfica da evolução da circularidade (a), do volume (b), da compacidade (c) e da esfericidade (d) dos esfereoides com 2 500 células LNCaP quando sujeitos à irradiação com rádio-223. O dia 1 corresponde ao dia da irradiação com as atividades volúmicas iniciais de 0, de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL. Os resultados são apresentados como a média \pm erro-padrão de 1 experiência realizada em quintuplicado e analisados estatisticamente através da comparação entre os dias 1 e 6, para todas as condições, recorrendo ao teste ANOVA de 2 fatores e ao teste de *Dunnnett* (** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$).

Resultados

Tabela 6: Análise estatística da Figura 29 através do teste ANOVA de 2 fatores e do teste de *Dunnnett*. Os valores-p correspondem à comparação entre a condição controlo e as condições de irradiação com as várias atividades volúmicas no dia 6 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

		Comparações		Valor- p	Representação
Volume	0 Bq/mL	3 520 Bq/mL	<0,0001	****	
		7 040 Bq/mL	<0,0001	****	
Compacidade	0 Bq/mL	7 040 Bq/mL	0,0498	*	
Esfericidade	0 Bq/mL	7 040 Bq/mL	0,0109	*	

Ainda que a circularidade dos esferoides demonstrasse uma evolução irregular, inicialmente este parâmetro apresentou valores variáveis entre 0,62 u.a. e 0,77 u.a., com uma média de $0,62 \pm 0,002$. Entre o primeiro e o último dia, a evolução deste parâmetro apenas se mostrou estatisticamente significativa para a condição controlo ($p=0,0055$). No sexto dia, a circularidade apresentou valores mais elevados para a condição controlo e para o grupo de esferoides sujeitos a menor atividade, no entanto, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os esferoides controlo e os esferoides irradiados, para nenhuma das condições de irradiação.

Relativamente ao volume, verificou-se que, no primeiro dia, os esferoides irradiados apresentavam um volume semelhante ao dos esferoides controlo, com volume médio de $0,012 \pm 0,001 \text{ mm}^3$, aumentando de forma semelhante para o grupo de controlo e para os esferoides irradiados com 55 Bq/mL. A evolução dos dois grupos de esferoides irradiados com atividades superiores também foi idêntica entre si, mantendo-se aproximadamente estável ao longo do período de monitorização. Entre o primeiro e o último dia verificou-se um aumento do volume para todas as condições exceto para os esferoides irradiados com 7 040 Bq/mL, mas estatisticamente significativo apenas para a condição controlo ($p < 0,0001$) e para os esferoides irradiados com 55 Bq/mL ($p < 0,0001$). No sexto dia, os esferoides não irradiados alcançaram um volume de $0,063 \pm 0,01 \text{ mm}^3$ e, relativamente a estes, os dois grupos irradiados com maior atividade volúmica demonstraram diferenças com significância estatística. Desta forma, os esferoides irradiados com 3 520 e com 7 040 Bq/mL obtiveram um volume de $0,018 \pm 0,002 \text{ mm}^3$ ($p < 0,0001$) e de $0,013 \pm 0,001 \text{ mm}^3$ ($p < 0,0001$), respetivamente. Assim, atividades superiores de rádio-223 inibiram o aumento do volume dos esferoides em estudo.

As curvas relativas à compacidade e à esfericidade dos esferoides demonstraram uma evolução semelhante. No primeiro dia, a média da compacidade e da esfericidade dos esferoides irradiados e dos esferoides controlo foi semelhante, apresentando valores de $0,40 \pm 0,008$ u.a. e de $0,63 \pm 0,007$ u.a. para os grupos de controlo, respetivamente. No geral, verificou-se um aumento de

ambos entre o início e o fim do período em estudo apenas para o grupo não irradiado. Deste modo, no sexto dia, o grupo de controlo alcançou uma compacidade e uma esfericidade de $0,56 \pm 0,05$ u.a. e de $0,74 \pm 0,11$ u.a., respetivamente. No último dia, e relativamente ao controlo, apenas os esféroides irradiados com 7 040 Bq/mL demonstraram uma diminuição estatisticamente significativa quer para a compacidade [$0,40 \pm 0,03$ u.a. ($p=0,0498$)], quer para a esfericidade, [$0,63 \pm 0,03$ u.a. ($p=0,0109$)], em comparação com a condição controlo.

4.1.3. Viabilidade celular

Os efeitos da irradiação nos esféroides constituídos por 1 000 células PC3 ou LNCaP foram avaliados sete dias após a remoção da atividade volúmica inicial de rádio-223 (irradiação de 24h) recorrendo ao ensaio CellTiter-Glo® 3D, que avalia a viabilidade celular através da quantificação dos níveis de ATP celular.

Através da Figura 30 é possível observar os resultados obtidos para os esféroides de células PC3, normalizados ao controlo e analisados estatisticamente através do teste ANOVA de 1 fator e do teste de Tukey. De um modo geral, foi possível observar um decréscimo da viabilidade celular com o aumento da atividade volúmica inicial de rádio-223 administrada. Comparativamente ao grupo de esféroides não sujeitos à irradiação, verificou-se uma diminuição da viabilidade celular estatisticamente significativa para todos os grupos, à exceção dos esféroides irradiados com 55 Bq/mL. Assim, a exposição dos esféroides a atividades volúmicas de 3 520 e de 7 040 Bq/mL provocou uma diminuição da viabilidade celular para $49,21 \pm 3,09\%$ ($p<0,0001$) e para $42,74 \pm 3,60\%$ ($p<0,0001$), respetivamente. Contudo, entre as várias atividades volúmicas adicionadas, apenas ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular entre os esféroides irradiados com 55 e com 3 520 Bq/mL ($p<0,0001$), e entre os esféroides irradiados com 55 e com 7 040 Bq/mL ($p<0,0001$), permitindo notar que a maior variação da viabilidade celular se sucede até aos 3 520 Bq/mL.

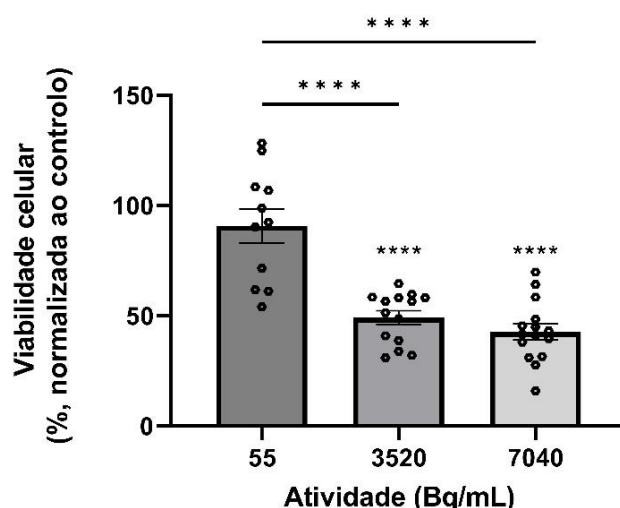


Figura 30: Análise da viabilidade celular (%) dos esféroides com 1 000 células PC3, medida através do ensaio CellTiter-Glo® 3D 7 dias após a remoção da atividade volúmica inicial de rádio-223 (55, 3 520 e 7 040 Bq/mL) administrada (irradiação de 24h). Os resultados são apresentados como a média \pm erro-padrão, normalizados ao controlo, de 4 experiências independentes realizadas em triplicado. Os dados foram analisados através do teste ANOVA de 1 fator e do teste de Tukey. (**** $p<0,0001$).

Os resultados preliminares referentes aos esferoides constituídos por células LNCaP estão representados na Figura 31. No geral, verificou-se que a exposição ao rádio-223 induziu diminuição na viabilidade celular dos esferoides de células LNCaP, dependente do aumento da atividade volúmica inicial de radiofármaco. Deste modo, relativamente aos esferoides controlo, a exposição dos esferoides a uma atividade volúmica de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL provocou um decréscimo da viabilidade celular para $62,86 \pm 1,75\%$, para $14,13 \pm 0,74\%$ e para $14,04 \pm 1,54\%$, respetivamente. Apesar dos resultados serem preliminares, parece que a exposição à mesma atividade volúmica inicial teve efeitos diferentes nos esferoides de células PC3. Assim, quando expostos a uma atividade volúmica inicial de 55 Bq/mL, verificou-se que a viabilidade foi de 90,79% para os esferoides de células PC3 e de 62,86% para os esferoides de células LNCaP, quando sujeitos a 3 520 Bq/mL foi de 49,21% para os esferoides de células PC3 e de 14,13% para os esferoides de células LNCaP e quando irradiados com 7 040 Bq/mL foi de 42,74% para os esferoides de células PC3 e de 14,04% para os esferoides de células LNCaP.

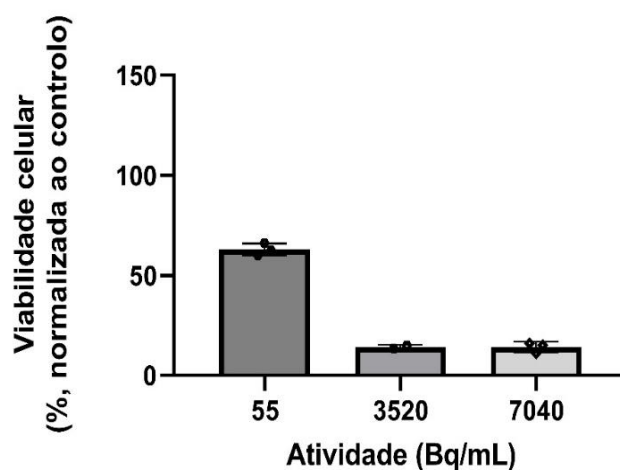


Figura 31: Análise da viabilidade celular (%) dos esferoides com 1 000 células LNCaP, medida através do ensaio CellTiter-Glo® 3D 7 dias após a remoção da atividade volúmica inicial de rádio-223 (55, 3 520 e 7 040 Bq/mL) administrada (irradiação de 24h). Os resultados são apresentados como a média \pm erro-padrão, normalizados ao controlo, de 1 experiência independente realizada em duplicado.

4.1.4. Migração e invasão celular

A avaliação da capacidade migratória e invasora das células constituintes dos esferoides de células PC3 estabelecidos a partir de 5 000 células/esferoide foi realizada ao longo de 72 horas, iniciando-se no sexto dia após a exposição da cultura celular 3D ao rádio-223. As imagens obtidas foram analisadas qualitativamente para aferir a invasão ou migração das células dos esferoides para o meio de cultura envolvente ou para a matriz extracelular.

Na Figura 32 é possível observar imagens dos esferoides no momento de realização dos ensaios (0h), verificando-se uma diminuição da dimensão dos esferoides irradiados com atividades volúmicas iniciais superiores.

Resultados

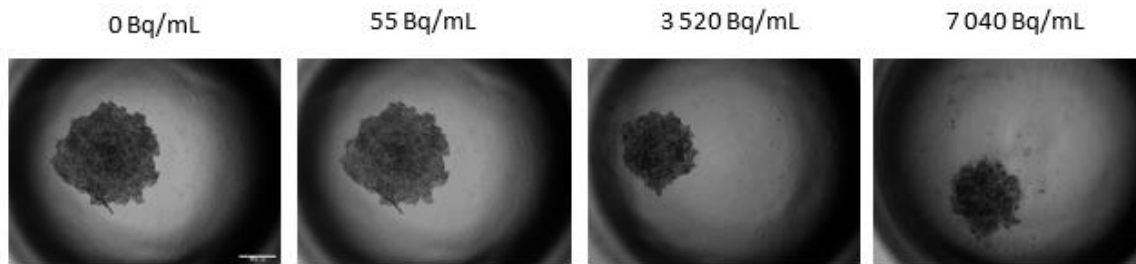


Figura 32: Esferoides de 5 000 células PC3 sujeitos à irradiação com rádio-223 com as atividades volúmicas de 0, de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio ótico invertido, com uma ampliação de 40X, no início da realização dos ensaios de migração e de invasão (0h). A escala apresentada corresponde a 600 μ m.

De acordo com a Figura 33 é possível observar a evolução dos esferoides ao longo do período de monitorização do ensaio de migração. Através do seguimento temporal, verificou-se que não existiram alterações na capacidade migratória dos esferoides nas primeiras 24h, todavia, com o decorrer do tempo, foi possível observar a presença de células migratórias na extremidade dos esferoides sobretudo para o grupo de controlo e para os esferoides irradiados com 55 Bq/mL, sendo estas mais evidentes 72 horas após o início do procedimento experimental.

Resultados

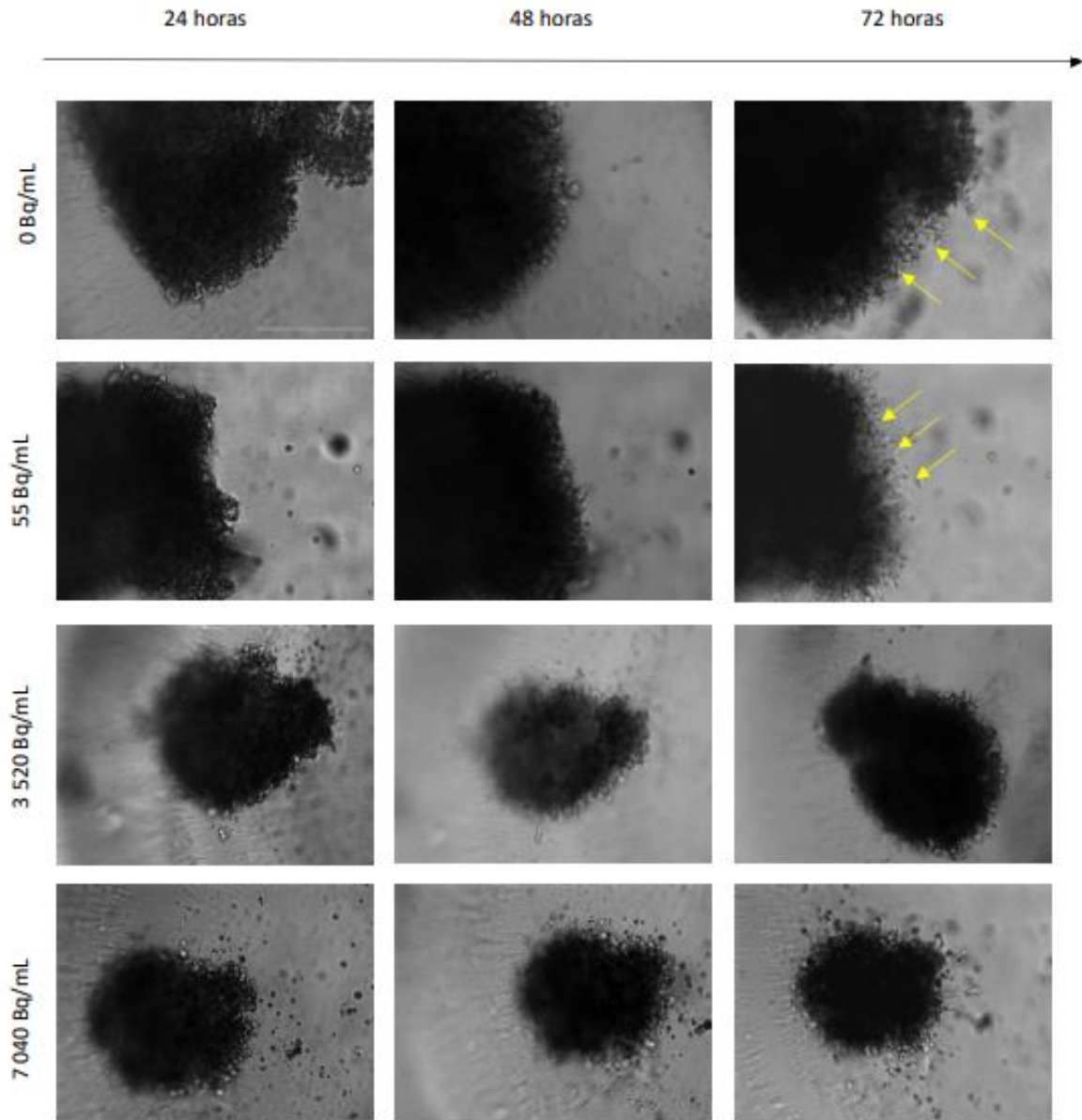


Figura 33: Painel temporal representativo da migração das células dos esferoides com 5 000 células PC3 quando sujeitos à irradiação com rádio-223, durante 24h, com as atividades volúmicas iniciais de 0, de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio ótico invertido, com uma ampliação de 100X, 24, 48 e 72 horas após a adição da matrigel (10 μ L). A escala apresentada corresponde a 600 μ m.

A Figura 34 representa a evolução temporal dos esferoides ao longo do ensaio de invasão. Tal como no ensaio anterior, nas primeiras 24 horas apenas se verificou uma redução do tamanho dos esferoides irradiados com 3 520 e com 7 040 Bq/mL em comparação com o grupo de controlo. Contudo, ao longo do período de monitorização, essencialmente 72 horas após o início do ensaio, tornou-se evidente a presença de células invasoras na periferia dos esferoides do grupo de controlo e nos esferoides irradiados com 55 Bq/mL e a sua ausência nas restantes condições.

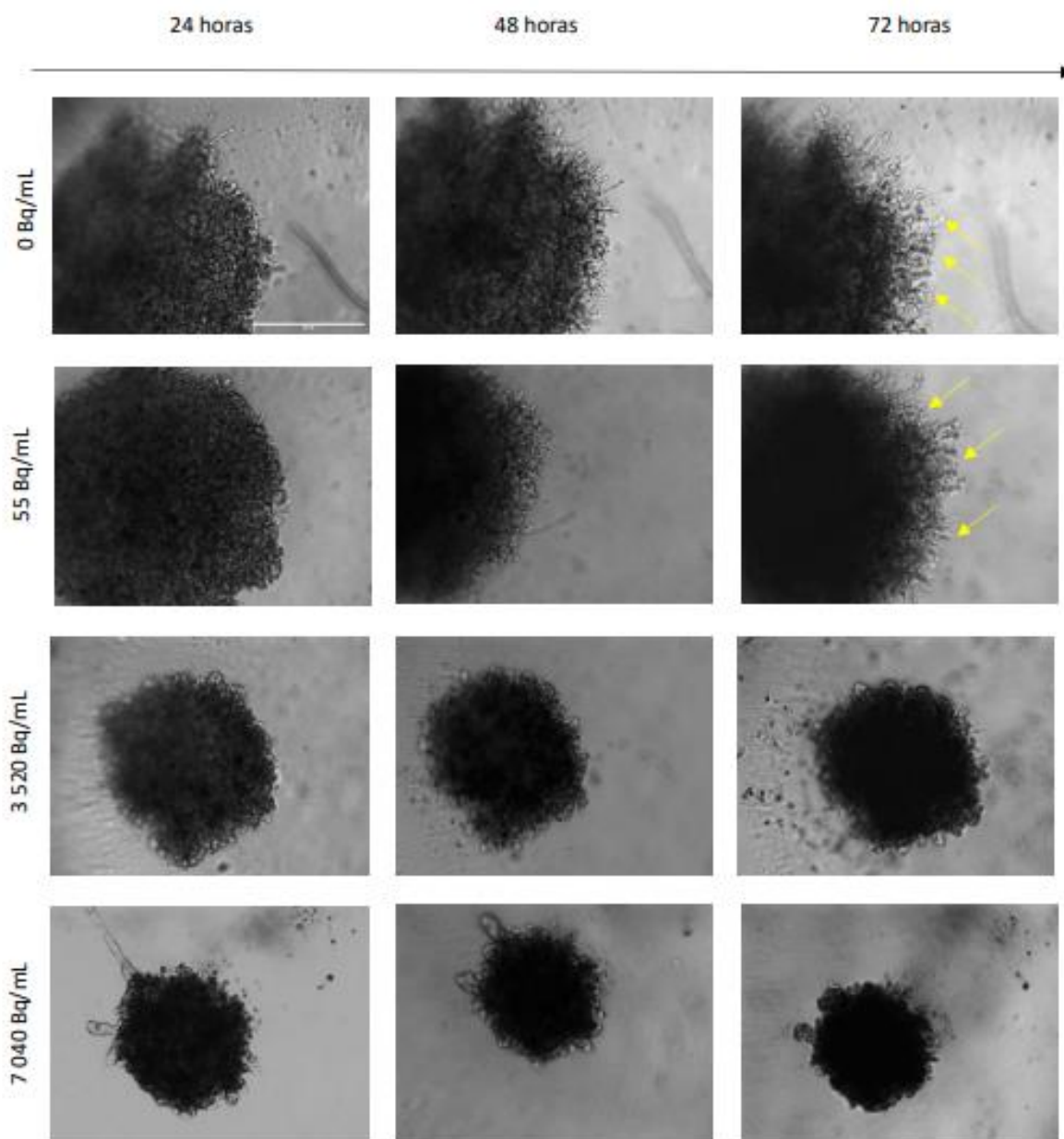


Figura 34: Paineis temporais representativos da invasão das células dos esferoides com 5 000 células PC3 quando sujeitos à irradiação com rádio-223, durante 24h, com as atividades volúmicas iniciais de 0, de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL. As imagens foram adquiridas recorrendo a um microscópio ótico invertido, com uma ampliação de 100X, 24, 48 e 72 horas após a adição da matrigel (50 μ L). A escala apresentada corresponde a 600 μ m.

4.2. Dosimetria *in vitro* do rádio-223

A dosimetria *in vitro* é dependente de vários fatores, nomeadamente da concentração e das dimensões celulares, do tipo de radiação, da atividade inicial adicionada e do tempo de irradiação. Assim, a realização dos cálculos dosimétricos *in vitro* com o rádio-223 para células PC3 e LNCaP pressupõe a determinação de um conjunto de parâmetros para cada linha celular, incluindo o raio da célula e do núcleo, a distância internuclear e, posteriormente, os *S-values*.

4.2.1. Dimensões celulares

A determinação das dimensões celulares foi efetuada com o auxílio do *software ImageJ* que, a partir de imagens adquiridas por microscopia confocal, permitiu definir o raio da célula e do respetivo núcleo. Na Figura 35 é possível observar a morfologia das células PC3 (esquerda) e LNCaP (direita), com marcação membranar a verde (CytoPainter #ab176735, Abcam).

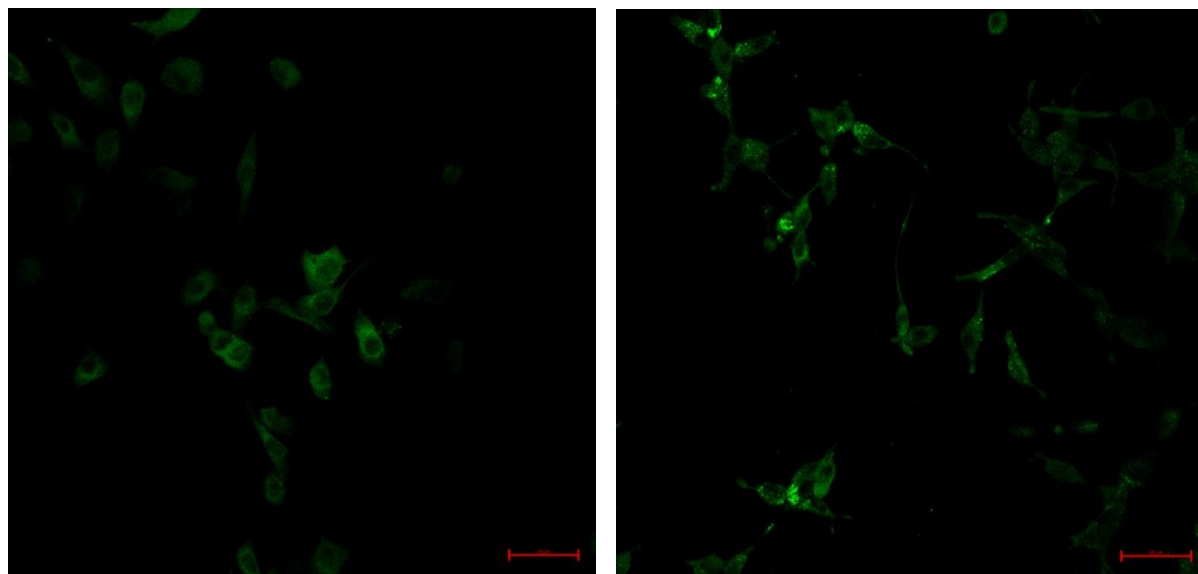


Figura 35: Imagens representativas da morfologia das células PC3 (esquerda) e LNCaP (direita) em cultura aderente. As células foram marcadas durante 24h com CytoPainter #ab176735 (Abcam) e as imagens foram obtidas por microscopia confocal com ampliação de 20X. A escala corresponde a 200 μm .

As características e a morfologia das células variam entre linhas celulares, inclusivamente para células do mesmo tipo de cancro, apresentando ainda alguma variabilidade entre as várias células da mesma linha celular (Figura 35). Assim, a determinação do raio da célula e do respetivo núcleo foi realizada através de um conjunto de medições em várias células da mesma cultura celular, a partir da qual se obteve o valor médio do raio da célula e do núcleo, descritos na Tabela 7, para as linhas celulares PC3 e LNCaP, quando em cultura monocamada aderente.

Tabela 7: Média e desvio-padrão do raio da célula e do raio do núcleo das células PC3 e LNCaP (N = 10 células).

Linha celular	Raio da célula (μm)	Raio do núcleo (μm)
PC3	$11,24 \pm 2,17$	$5,86 \pm 1,06$
LNCaP	$15,39 \pm 1,66$	$5,33 \pm 1,13$

4.2.2. Distância entre células

De modo a analisar o efeito que uma célula tem sobre outra é essencial avaliar como a dose absorvida varia em função da distância a que ambas as células se encontram. Para tal, procedeu-se à determinação de um conjunto de distâncias internucleares com o auxílio do *software ImageJ*, partindo da captura fotográfica de uma cultura celular, através do *software Motic Images Plus 2.0 ML*, incorporado no microscópio ótico invertido (Motic AE31) com uma câmara acoplada. A Figura 36

apresenta um exemplo do processo de determinação das distâncias internucleares para o caso das células PC3 tendo-se considerado, para tal, um grupo de células a distâncias variáveis de uma mesma célula. Assim, foram semeadas 30 000 e 1 500 células por poço em placas de 24 (P24) ou de 6 (P6) poços, respetivamente. A Tabela 8 apresenta os valores de distância internuclear obtidos para as linhas celulares PC3 e LNCaP.

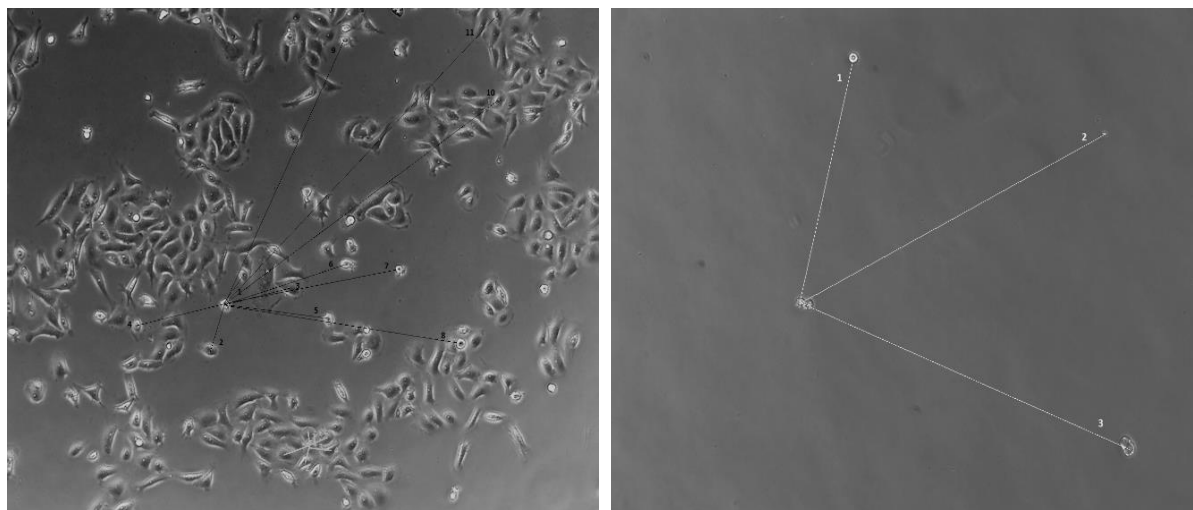


Figura 36: Medição das distâncias internucleares das células PC3 em diferentes condições de cultura: maior (esquerda) e menor (direita) densidade celular. As imagens foram obtidas através de um microscópio ótico invertido com uma ampliação de 100X.

Tabela 8: Média e desvio-padrão da distância internuclear das células PC3 e LNCaP cultivadas em diferentes condições.

Linha celular	Placa de cultura	Distância internuclear (μm)
PC3	P24	205 ± 232
	P6	727 ± 172
LNCaP	P24	247 ± 202
	P6	857 ± 54

4.2.3. S-values

Através da utilização do *software MIRDcell V3.12* foi então possível determinar, para cada linha celular, as frações de energia absorvidas numa região alvo por decaimento libertadas por uma região fonte, os *S-values* (Tamborino et al., 2020). Para a determinação de cada um destes valores, teve-se em consideração os raios da célula e do núcleo, a distância internuclear e as frações de internalização nuclear, citoplasmática e de adsorção na membrana celular determinados pelo grupo de investigação em estudos anteriores (Marques et al., 2021). Na Tabela 9 encontram-se os valores dos *S-values* (distância de 0 μm), assim como a sua variação de acordo com o aumento da distância internuclear que, no caso das células PC3 foi de 205 μm e 727 μm e para as células LNCaP, apresentou valores de 247 μm e 857 μm .

Tabela 9: Valores dos *S-values* obtidos para as linhas celulares PC3 e LNCaP.

Linha celular	PC3			LNCaP			
	Distância (μm)	S(C←C) (Gy/Bq.s)	S(N←C _s) (Gy/Bq.s)	S(C _y ←C _s) (Gy/Bq.s)	Distância (μm)	S(C←C) (Gy/Bq.s)	S(N←C _s) (Gy/Bq.s)
0	2,08x10 ⁻²	1,03x10 ⁻²	1,49x10 ⁻²	0	1,17x10 ⁻²	5,73x10 ⁻³	8,11x10 ⁻³
205	3,85x10 ⁻⁸	3,83x10 ⁻⁸	3,78x10 ⁻⁸	247	2,18x10 ⁻⁸	2,22x10 ⁻⁸	2,18x10 ⁻⁸
727	1,85x10 ⁻¹⁰	1,87x10 ⁻¹⁰	1,88x10 ⁻¹⁰	857	9,52x10 ⁻¹¹	9,43x10 ⁻¹¹	9,65x10 ⁻¹¹

$S(C \leftarrow C)$ corresponde ao *S-value* resultante da interação do radionuclídeo no interior da célula, $S(N \leftarrow C_s)$ é o *S-value* resultante da interação do radionuclídeo entre o núcleo e a membrana celular e $S(C_y \leftarrow C_s)$ é o *S-value* resultante da interação do radionuclídeo entre o citoplasma e a membrana celular.

De acordo com a Tabela 9 verifica-se um decréscimo dos *S-values* com o aumento da distância entre uma célula fonte e uma célula alvo que, por conseguinte, influenciará a dose total absorvida por uma célula. Além disso, comparando os valores obtidos para as duas linhas celulares verifica-se que as células PC3, de menor raio celular, apresentam *S-values* mais elevados.

4.2.4. Dose Absorvida

Após a determinação da atividade integrada no tempo e dos *S-values* (Tabela 9) procedeu-se ao cálculo das doses absorvidas, para cada linha celular, tendo em conta as diferentes condições pretendidas e a contribuição das células vizinhas. Nas Tabelas 10, 11 e 12 encontram-se descritos os valores da atividade integrada no tempo, da contribuição da vizinhança e da dose total absorvida por uma célula para a linha celular PC3 em diferentes tempos de exposição à atividade. Nestes casos, foram semeadas 30 000 células num volume de 0,5 mL com o objetivo de determinar o efeito do rádio-223 no conteúdo proteico celular. Como seria de esperar, os valores obtidos são dependentes da atividade volúmica, verificando-se um aumento da atividade integrada no tempo e da dose absorvida com o acréscimo da atividade administrada. Além disso, analisando as diferentes tabelas e os diversos tempos de irradiação estudados, observam-se também valores crescentes destes parâmetros com o aumento do tempo de irradiação e com o tempo pós-irradiação (decorrente entre a remoção da atividade e a realização do ensaio).

Resultados

Tabela 10: Valores de dose absorvida por célula, para a linha celular PC3, quando avaliada 5 ou 7 dias após a exposição das células a atividades iniciais de rádio-223 entre 55 e 7 040 Bq/mL, durante 4h, para posterior avaliação do conteúdo proteico celular.

Tempo de irradiação das células PC3: 4h							
Atividade Inicial		Atividade integrada no tempo (Bq.s)		Contribuição da vizinhança (Gy)		Dose total absorvida por célula (Gy)	
Volúmica (Bq/mL)	Total (Bq)	5d	7d	5d	7d	5d	7d
55	27,5	$1,12 \times 10^4$	$1,31 \times 10^4$	$2,76 \times 10^{-4}$	$6,64 \times 10^{-4}$	$8,59 \times 10^{-3}$	$1,04 \times 10^{-2}$
440	220	$8,90 \times 10^4$	$1,05 \times 10^5$	$2,21 \times 10^{-3}$	$5,31 \times 10^{-3}$	$6,88 \times 10^{-2}$	$8,30 \times 10^{-2}$
880	440	$1,80 \times 10^5$	$2,10 \times 10^5$	$4,41 \times 10^{-3}$	$1,06 \times 10^{-2}$	$1,38 \times 10^{-1}$	$1,66 \times 10^{-1}$
1 760	880	$3,59 \times 10^5$	$4,20 \times 10^5$	$8,83 \times 10^{-3}$	$2,12 \times 10^{-2}$	$2,75 \times 10^{-1}$	$3,32 \times 10^{-1}$
3 520	1 760	$7,19 \times 10^5$	$8,39 \times 10^5$	$1,77 \times 10^{-2}$	$4,25 \times 10^{-2}$	$5,50 \times 10^{-1}$	$6,64 \times 10^{-1}$
5 280	2 640	$1,08 \times 10^6$	$1,26 \times 10^6$	$2,65 \times 10^{-2}$	$6,37 \times 10^{-2}$	$8,25 \times 10^{-1}$	$9,96 \times 10^{-1}$
7 040	3 520	$1,44 \times 10^6$	$1,68 \times 10^6$	$3,53 \times 10^{-2}$	$8,50 \times 10^{-2}$	1,10	1,33

Tabela 11: Valores de dose absorvida por célula, para a linha celular PC3, quando avaliada 5 ou 7 dias após a exposição das células a atividades iniciais de rádio-223 entre 55 e 7 040 Bq/mL, durante 24h, para posterior avaliação do conteúdo proteico celular.

Tempo de irradiação das células PC3: 24h							
Atividade Inicial		Atividade integrada no tempo (Bq.s)		Contribuição da vizinhança (Gy)		Dose total absorvida por célula (Gy)	
Volúmica (Bq/mL)	Total (Bq)	5d	7d	5d	7d	5d	7d
55	27,5	$3,74 \times 10^4$	$3,93 \times 10^4$	$1,89 \times 10^{-3}$	$1,99 \times 10^{-3}$	$2,96 \times 10^{-2}$	$3,11 \times 10^{-2}$
440	220	$2,99 \times 10^5$	$3,14 \times 10^5$	$1,52 \times 10^{-2}$	$1,59 \times 10^{-2}$	$2,37 \times 10^{-2}$	$2,49 \times 10^{-1}$
880	440	$5,99 \times 10^5$	$6,29 \times 10^5$	$3,03 \times 10^{-2}$	$3,18 \times 10^{-2}$	$4,74 \times 10^{-1}$	$4,98 \times 10^{-1}$
1 760	880	$1,20 \times 10^6$	$1,26 \times 10^6$	$6,06 \times 10^{-2}$	$6,37 \times 10^{-2}$	$9,47 \times 10^{-1}$	$9,95 \times 10^{-1}$
3 520	1 760	$2,39 \times 10^6$	$2,51 \times 10^6$	$1,21 \times 10^{-1}$	$1,27 \times 10^{-1}$	1,89	1,99
5 280	2 640	$3,59 \times 10^6$	$3,77 \times 10^6$	$1,82 \times 10^{-1}$	$1,91 \times 10^{-1}$	2,84	2,99
7 040	3 520	$4,79 \times 10^6$	$5,03 \times 10^6$	$2,43 \times 10^{-1}$	$2,55 \times 10^{-1}$	3,79	3,98

Resultados

Tabela 12: Valores de dose absorvida por célula, para a linha celular PC3, quando avaliada 5 ou 7 dias após a exposição das células a atividades iniciais de rádio-223 entre 55 e 7 040 Bq/mL, durante 48h, para posterior avaliação do conteúdo proteico celular.

Tempo de irradiação das células PC3: 48h							
Atividade Inicial		Atividade integrada no tempo (Bq.s)		Contribuição da vizinhança (Gy)		Dose total absorvida por célula (Gy)	
Volúmica (Bq/mL)	Total (Bq)	5d	7d	5d	7d	5d	7d
55	27,5	$6,71 \times 10^4$	$6,90 \times 10^4$	$3,40 \times 10^{-3}$	$3,49 \times 10^{-3}$	$5,31 \times 10^{-2}$	$5,46 \times 10^{-2}$
440	220	$5,37 \times 10^5$	$5,52 \times 10^5$	$2,72 \times 10^{-2}$	$2,80 \times 10^{-2}$	$4,25 \times 10^{-1}$	$4,37 \times 10^{-1}$
880	440	$1,07 \times 10^6$	$1,10 \times 10^6$	$5,44 \times 10^{-2}$	$5,59 \times 10^{-2}$	$8,50 \times 10^{-1}$	$8,74 \times 10^{-1}$
1 760	880	$2,15 \times 10^6$	$2,21 \times 10^6$	$1,09 \times 10^{-1}$	$1,12 \times 10^{-1}$	1,70	1,75
3 520	1 760	$4,30 \times 10^6$	$4,42 \times 10^6$	$2,18 \times 10^{-1}$	$2,24 \times 10^{-1}$	3,40	3,50
5 280	2 640	$6,45 \times 10^6$	$6,63 \times 10^6$	$3,26 \times 10^{-1}$	$3,36 \times 10^{-1}$	5,10	5,24
7 040	3 520	$8,59 \times 10^6$	$8,83 \times 10^6$	$4,35 \times 10^{-1}$	$4,47 \times 10^{-1}$	6,80	6,99

Partindo dos resultados previamente obtidos no nosso grupo de trabalho (Fernandes, 2022), procedeu-se à conversão dos valores da atividade administrada, permitindo a representação do conteúdo proteico da linha celular PC3, sete dias após a exposição ao rádio-223 durante 24 horas, em função dos valores de dose absorvida, conforme a Tabela 11.

De acordo com os dados obtidos (Figura 37), verificou-se uma diminuição do conteúdo proteico com o aumento da atividade adicionada ao meio. Comparativamente à condição controlo, este decréscimo apresentou significância estatística a partir dos 2,00 Gy, correspondentes a uma atividade volúmica de 3 520 Bq/mL. Deste modo, verificou-se que uma dose de 2,00, de 2,99 e de 3,98 Gy provocou uma diminuição do conteúdo proteico para $56,8 \pm 9,6\%$ ($p=0,0001$), para $40,6 \pm 7,8\%$ ($p<0,0001$) e para $35,3 \pm 9,0\%$ ($p<0,0001$), respetivamente.

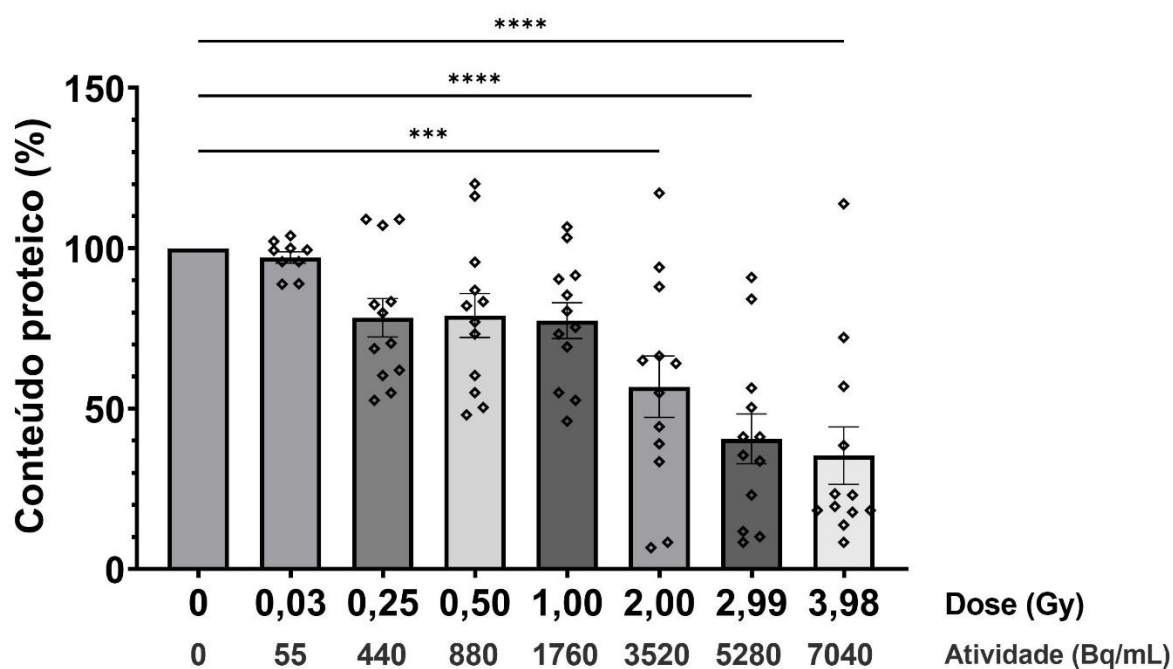


Figura 37: Análise do conteúdo proteico de células PC3, 7 dias após a exposição ao rádio-223 durante 24 horas, em função dos valores de dose absorvida, obtidos a partir da irradiação com atividades iniciais entre 0 e 7 040 Bq/mL. Os resultados foram normalizados ao grupo de controlo, não sujeito a irradiação, e são apresentados como a média \pm erro-padrão da percentagem de conteúdo proteico de, pelo menos, 5 experiências independentes realizadas em triplicado. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA de dois fatores e do teste de *Dunnnett* para as comparações múltiplas (** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Tal como para a linha celular PC3, a mesma metodologia se aplicou à linha celular LNCaP, cujos resultados se apresentam na Tabela 13 e na Tabela 14. Para estes casos, verificou-se também o aumento da atividade integrada no tempo e da dose absorvida com o aumento da atividade adicionada ao meio, assim como com o acréscimo dos tempos de irradiação. Relativamente à contribuição da vizinhança na totalidade da dose absorvida, e tal como expectável, averiguou-se uma menor influência das células mais distantes, neste caso, a vizinhança das células LNCaP.

Resultados

Tabela 13: Valores de dose absorvida por célula, para a linha celular LNCaP, quando avaliada 5 ou 7 dias após a exposição das células a atividades iniciais de rádio-223 entre 55 e 7 040 Bq/mL, durante 4h, para posterior avaliação do conteúdo proteico celular.

Tempo de irradiação das células LNCaP: 4h							
Atividade Inicial		Atividade integrada no tempo (Bq.s)		Contribuição da vizinhança (Gy)		Dose total absorvida por célula (Gy)	
Volúmica (Bq/mL)	Total (Bq)	5d	7d	5d	7d	5d	7d
55	27,5	$1,29 \times 10^4$	$1,54 \times 10^4$	$3,81 \times 10^{-4}$	$4,54 \times 10^{-4}$	$5,74 \times 10^{-3}$	$6,84 \times 10^{-3}$
440	220	$1,03 \times 10^5$	$1,23 \times 10^5$	$3,05 \times 10^{-3}$	$3,63 \times 10^{-3}$	$4,59 \times 10^{-2}$	$5,47 \times 10^{-2}$
880	440	$2,07 \times 10^5$	$2,47 \times 10^5$	$6,09 \times 10^{-3}$	$7,27 \times 10^{-3}$	$9,18 \times 10^{-2}$	$1,09 \times 10^{-1}$
1 760	880	$4,13 \times 10^5$	$4,93 \times 10^5$	$1,22 \times 10^{-2}$	$1,45 \times 10^{-2}$	$1,84 \times 10^{-1}$	$2,19 \times 10^{-1}$
3 520	1 760	$8,26 \times 10^5$	$9,86 \times 10^5$	$2,44 \times 10^{-2}$	$2,91 \times 10^{-2}$	$3,67 \times 10^{-1}$	$4,38 \times 10^{-1}$
5 280	2 640	$1,24 \times 10^6$	$1,48 \times 10^6$	$3,65 \times 10^{-2}$	$4,36 \times 10^{-2}$	$5,51 \times 10^{-1}$	$6,57 \times 10^{-1}$
7 040	3 520	$1,65 \times 10^6$	$1,97 \times 10^6$	$4,87 \times 10^{-2}$	$5,81 \times 10^{-2}$	$7,34 \times 10^{-1}$	$8,76 \times 10^{-1}$

Tabela 14: Valores de dose absorvida por célula, para a linha celular LNCaP, quando avaliada 5 ou 7 dias após a exposição das células a atividades iniciais de rádio-223 entre 55 e 7 040 Bq/mL, durante 24h, para posterior avaliação do conteúdo proteico celular.

Tempo de irradiação das células LNCaP: 24h							
Atividade Inicial		Atividade integrada no tempo (Bq.s)		Contribuição da vizinhança (Gy)		Dose total absorvida por célula (Gy)	
Volúmica (Bq/mL)	Total (Bq)	5d	7d	5d	7d	5d	7d
55	27,5	$3,80 \times 10^4$	$4,05 \times 10^4$	$1,12 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$	$1,69 \times 10^{-2}$	$1,80 \times 10^{-2}$
440	220	$3,04 \times 10^5$	$3,24 \times 10^5$	$8,96 \times 10^{-3}$	$9,55 \times 10^{-3}$	$1,35 \times 10^{-1}$	$1,44 \times 10^{-1}$
880	440	$6,08 \times 10^5$	$6,48 \times 10^5$	$1,79 \times 10^{-2}$	$1,91 \times 10^{-2}$	$2,70 \times 10^{-1}$	$2,88 \times 10^{-1}$
1 760	880	$1,22 \times 10^6$	$1,30 \times 10^6$	$3,58 \times 10^{-2}$	$3,82 \times 10^{-2}$	$5,40 \times 10^{-1}$	$5,75 \times 10^{-1}$
3 520	1 760	$2,43 \times 10^6$	$2,59 \times 10^6$	$7,17 \times 10^{-2}$	$7,64 \times 10^{-2}$	1,08	1,15
5 280	2 640	$3,65 \times 10^6$	$3,89 \times 10^6$	$1,07 \times 10^{-1}$	$1,15 \times 10^{-1}$	1,62	1,73
7 040	3 520	$4,86 \times 10^6$	$5,18 \times 10^6$	$1,43 \times 10^{-1}$	$1,53 \times 10^{-1}$	2,16	2,30

Novamente, através dos dados anteriormente obtidos no nosso grupo de trabalho (Fernandes, 2022), procedeu-se à conversão dos valores da atividade administrada, possibilitando a representação do conteúdo proteico da linha celular LNCaP, 7 dias após a exposição ao rádio-223 durante 24 horas, em função dos valores de dose absorvida, de acordo com a Tabela 14. Assim,

analisando os dados obtidos (Figura 38), denotou-se uma diminuição do conteúdo proteico com o aumento da dose absorvida. Comparativamente à condição controlo, este decréscimo mostrou-se estatisticamente significativo para todos os restantes grupos. Deste modo, verificou-se que uma dose de 0,02, de 1,15 e de 2,30 Gy foi responsável por uma diminuição do conteúdo proteico para $66,4 \pm 2,5\%$ ($p < 0,0001$), para $18,1 \pm 2,3\%$ ($p < 0,0001$) e para $9,9 \pm 1,1\%$ ($p < 0,0001$), respetivamente.

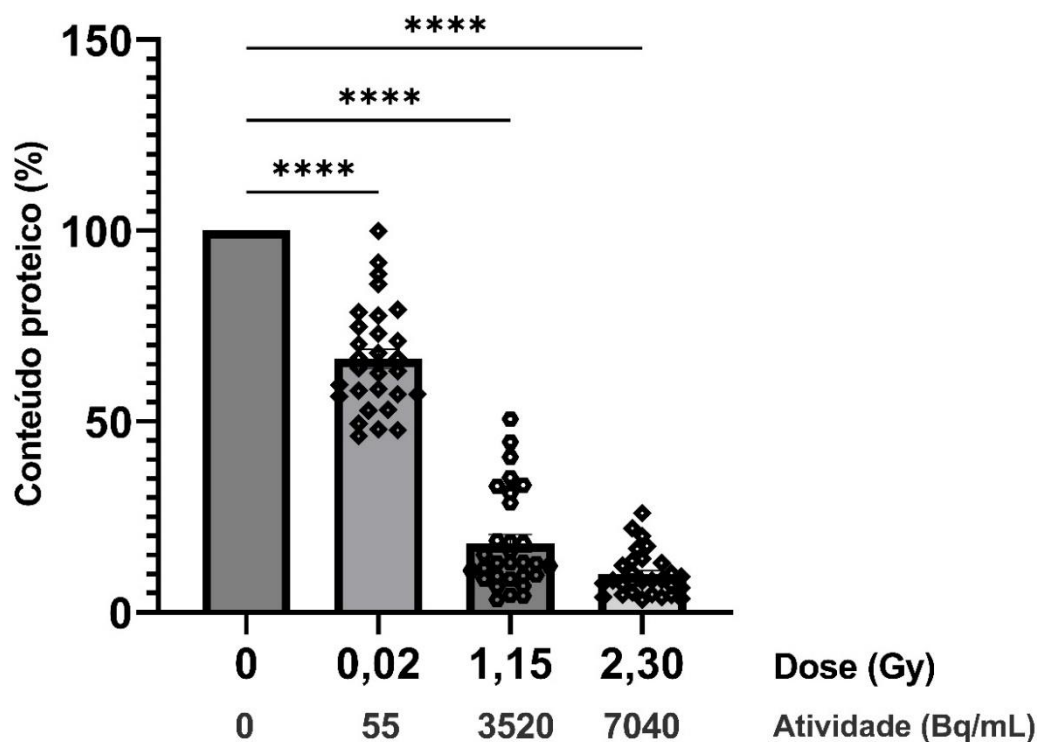


Figura 38: Análise do conteúdo proteico de células LNCaP, 7 dias após a exposição ao rádio-223 durante 24 horas, em função dos valores de dose absorvida, obtidos a partir da irradiação com atividades iniciais entre 0 e 7 040 Bq/mL. Os resultados foram normalizados ao grupo de controlo, não sujeito a irradiação, e são apresentados como a média \pm erro-padrão da percentagem de conteúdo proteico de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em sextuplicado. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA de dois fatores e do teste de *Dunnnett* para as comparações múltiplas ($****p < 0,0001$).

A realização dos cálculos dosimétricos foi também efetuada para obter os valores da dose absorvida em situações de avaliação do fator da sobrevivência em função da atividade administrada, cujos valores foram obtidos partindo de resultados previamente desenvolvidos pelo nosso grupo de trabalho (Fernandes, 2022). Na Tabela 15 e na Tabela 16 encontram-se os valores da atividade integrada no tempo, da contribuição da vizinhança e da dose total absorvida por uma célula para a linha celular PC3 em diferentes tempos de exposição à atividade, nas condições experimentais em que se avaliou a sobrevivência celular. Nestas situações, foram semeadas 1 500 células (para o controlo e para as atividades iniciais de 55 – 3 520 Bq/mL) ou 2 000 células (para as duas atividades mais elevadas) num volume de 3 mL com o objetivo de determinar o efeito do rádio-223 na sobrevivência celular.

Analisando os valores obtidos para a atividade integrada no tempo e para a dose absorvida verificou-se, novamente, o seu acréscimo com o aumento da atividade administrada. Além disso, e

Resultados

observando as diferentes tabelas e os diversos tempos de irradiação estudados, denotou-se também valores crescentes destes parâmetros dependentes do aumento do tempo de irradiação.

Tabela 15: Valores de dose absorvida por célula, para a linha celular PC3, quando avaliada 8 dias após a exposição das células a atividades iniciais de rádio-223 entre 55 e 7 040 Bq/mL, durante 4h, para posterior análise da sobrevivência celular.

Tempo de irradiação + Tempo decorrente até ao ensaio: 4h + 8d				
Atividade volúmica inicial (Bq/mL)	Atividade inicial/poço (Bq)	Atividade integrada no tempo (Bq.s)	Contribuição da vizinhança (Gy)	Dose total absorvida por célula (Gy)
55	165	$8,38 \times 10^4$	$2,06 \times 10^{-5}$	1,24
440	1 320	$6,70 \times 10^5$	$1,65 \times 10^{-4}$	9,93
880	2 640	$1,34 \times 10^6$	$3,30 \times 10^{-4}$	$1,99 \times 10^1$
1 760	5 280	$2,68 \times 10^6$	$6,61 \times 10^{-4}$	$3,97 \times 10^1$
3 520	10 560	$5,36 \times 10^6$	$1,32 \times 10^{-3}$	$7,95 \times 10^1$
5 280	15 840	$8,05 \times 10^6$	$1,98 \times 10^{-3}$	$8,94 \times 10^1$
7 040	21 120	$1,07 \times 10^7$	$2,64 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^2$

Tabela 16: Valores de dose absorvida por célula, para a linha celular PC3, quando avaliada 8 dias após a exposição das células a atividades iniciais de rádio-223 entre 55 e 7 040 Bq/mL, durante 24h, para posterior análise da sobrevivência celular.

Tempo de irradiação + Tempo decorrente até ao ensaio: 24h + 8d				
Atividade volúmica inicial (Bq/mL)	Atividade inicial/poço (Bq)	Atividade integrada no tempo (Bq.s)	Contribuição da vizinhança (Gy)	Dose total absorvida por célula (Gy)
55	165	$2,41 \times 10^5$	$5,93 \times 10^{-5}$	3,57
440	1 320	$1,93 \times 10^6$	$4,75 \times 10^{-4}$	$2,86 \times 10^1$
880	2 640	$3,85 \times 10^6$	$9,50 \times 10^{-4}$	$5,71 \times 10^1$
1 760	5 280	$7,71 \times 10^6$	$1,90 \times 10^{-3}$	$1,14 \times 10^2$
3 520	10 560	$1,54 \times 10^7$	$3,80 \times 10^{-3}$	$2,28 \times 10^2$
5 280	15 840	$2,31 \times 10^7$	$5,70 \times 10^{-3}$	$2,57 \times 10^2$
7 040	21 120	$3,08 \times 10^7$	$7,60 \times 10^{-3}$	$3,43 \times 10^2$

Partindo dos resultados da Tabela 15, da Tabela 16 e da determinação prévia do fator de sobrevivência pelo nosso grupo de trabalho (Fernandes, 2022), foi possível obter as curvas de sobrevivência para a linha celular PC3 em resposta à irradiação com rádio-223 8 dias após a exposição ao rádio-223 durante 4 e 24 horas (Figura 39).

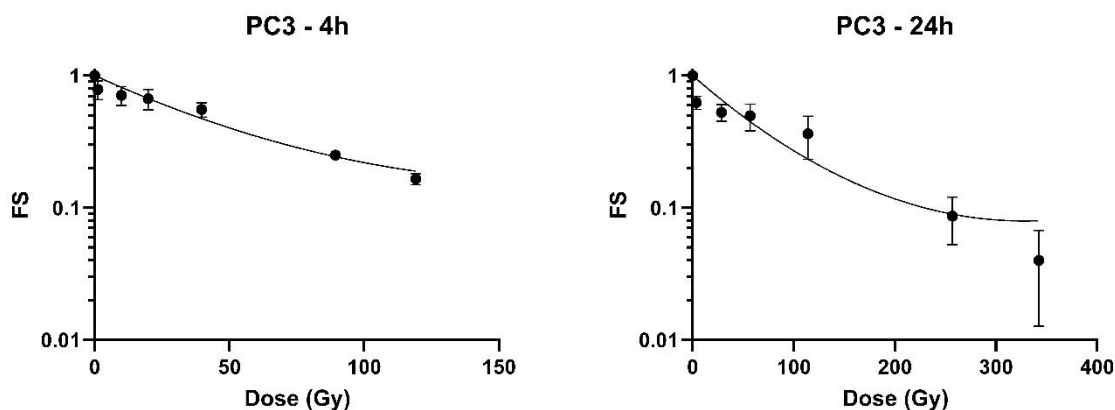


Figura 39: Curva de sobrevivência obtida para a linha celular PC3 em resposta à irradiação com rádio-223 durante 4 horas (esquerda) ou 24 horas (direita), seguidas de um período temporal de 8 dias de exposição ao radiofármaco. Os resultados experimentais correspondem à média \pm erro-padrão de 5 experiências independentes realizadas em duplicado.

De um modo geral, verificou-se que o aumento da dose de radiação do rádio-223 foi responsável por um decréscimo da sobrevivência celular. Além disso, e analisando as duas curvas de sobrevivência, denotou-se um decréscimo mais acentuado na situação em que o tempo de exposição à radiação foi mais elevado (24horas, direita). Para este caso, a dose letal média (DL_{50}), isto é, a dose responsável para que 50% da população celular perca a viabilidade e/ou a capacidade proliferativa, foi de 48,44 Gy (IC95%: 38,73; 60,98 Gy). Quando o tempo de exposição foi inferior (4 horas, esquerda), a DL_{50} foi de 36,29 Gy (IC95%: 30,12; 43,32 Gy). Os parâmetros determinados através de um modelo linear quadrático, para cada uma das diferentes situações de exposição ao rádio-223, encontram-se descritos na Tabela 17. Analisando os valores dos parâmetros obtidos, verifica-se que o α é superior para um tempo de irradiação menor sendo, no entanto, o β inferior para esta situação.

Tabela 17: Parâmetros de ajuste obtidos para o modelo linear quadrático, para cada uma das situações de exposição da linha celular PC3 à irradiação com rádio-223.

Tempo de irradiação	Parâmetro	Valor	Intervalo de confiança de 95%	R ²
4 horas	α	$2,13 \times 10^{-2}$	$1,67 \times 10^{-2}$ a $2,64 \times 10^{-2}$	0,829
	β	$-6,17 \times 10^{-5}$	$-1,16 \times 10^{-4}$ a $-4,82 \times 10^{-6}$	
	DL_{50}	$3,63 \times 10^1$	$3,01 \times 10^1$ a $4,33 \times 10^1$ Gy	
24 horas	α	$1,55 \times 10^{-2}$	$1,19 \times 10^{-2}$ a $1,97 \times 10^{-2}$	0,740
	β	$-2,36 \times 10^{-5}$	$-3,90 \times 10^{-5}$ a $-3,57 \times 10^{-6}$	
	DL_{50}	$4,84 \times 10^1$	$3,87 \times 10^1$ a $6,10 \times 10^1$ Gy	

Seguidamente, aplicou-se a mesma metodologia à linha celular LNCaP, de modo a obter os valores apresentados na Tabela 18. Nesta situação, verificou-se também o aumento da atividade integrada no tempo e, conseqüentemente, da dose absorvida com o aumento da atividade adicionada ao meio. Comparando a contribuição da vizinhança na totalidade da dose absorvida nos ensaios realizados quer para a análise do conteúdo proteico, quer para a análise da sobrevivência celular, denotou-se uma menor influência das células mais distantes, correspondentes ao segundo caso mencionado.

Tabela 18: Valores de dose absorvida por célula, para a linha celular LNCaP, quando avaliada 8 dias após a exposição das células a atividades iniciais de rádio-223 entre 55 e 7 040 Bq/mL, durante 24h, para posterior análise da sobrevivência celular.

Tempo de irradiação + Tempo decorrente até ao ensaio: 24h + 8d				
Atividade volúmica (Bq/mL)	Atividade/poço (Bq)	Atividade integrada no tempo (Bq.s)	Contribuição da vizinhança (Gy)	Dose absorvida por célula (Gy)
55	165	$2,50 \times 10^6$	$3,20 \times 10^{-5}$	1,04
440	1 320	$2,00 \times 10^6$	$2,56 \times 10^{-4}$	8,28
880	2 640	$3,99 \times 10^6$	$5,12 \times 10^{-4}$	$1,66 \times 10^1$
1 760	5 280	$7,99 \times 10^6$	$1,03 \times 10^{-3}$	$3,31 \times 10^1$
3 520	10 560	$1,60 \times 10^7$	$2,05 \times 10^{-3}$	$6,63 \times 10^1$
5 280	15 840	$2,40 \times 10^7$	$3,08 \times 10^{-3}$	$9,94 \times 10^1$
7 040	21 120	$3,20 \times 10^7$	$4,10 \times 10^{-3}$	$1,33 \times 10^2$

4.2.5. Curvas de simulação da sobrevivência para culturas 2D e 3D

O software *MIRDcell V3.12* permitiu ainda a obtenção de curvas de sobrevivência para culturas 2D e 3D. Assim, através da medição do raio (326 μ m) de esferoides estabelecidos inicialmente com 1 000 células PC3, foi possível obter a representação do fator de sobrevivência em função da dose absorvida, tal como representado na Figura 40. Neste caso, o cálculo dos parâmetros necessários (atividade média máxima por célula e coeficiente da atividade integrada no tempo) foi realizado tendo em conta um período de 8 dias após a exposição das células a atividades iniciais durante 24h e a atividade média máxima foi determinada a partir de uma atividade volúmica inicial de 55 Bq/mL. Tal como observável, para as culturas 3D verificou-se um decréscimo da sobrevivência celular com o aumento da dose absorvida, denotando-se que uma dose de cerca de 14,5 Gy foi suficiente para provocar a morte de toda a população. Comparativamente à cultura 2D, irradiada com a mesma atividade volúmica, exposta à radiação durante o mesmo intervalo de tempo e cuja curva de sobrevivência também demonstra dependência da dose absorvida (Figura 41), verifica-se que a dose necessária para provocar o mesmo efeito biológico é superior para o caso tridimensional. Deste modo, enquanto, por exemplo, para o caso 2D uma dose de cerca de 3 Gy está associada a um fator de

sobrevivência de 0,01, para os esferoides, a dose necessária para alcançar esse valor é de cerca de 4 Gy.

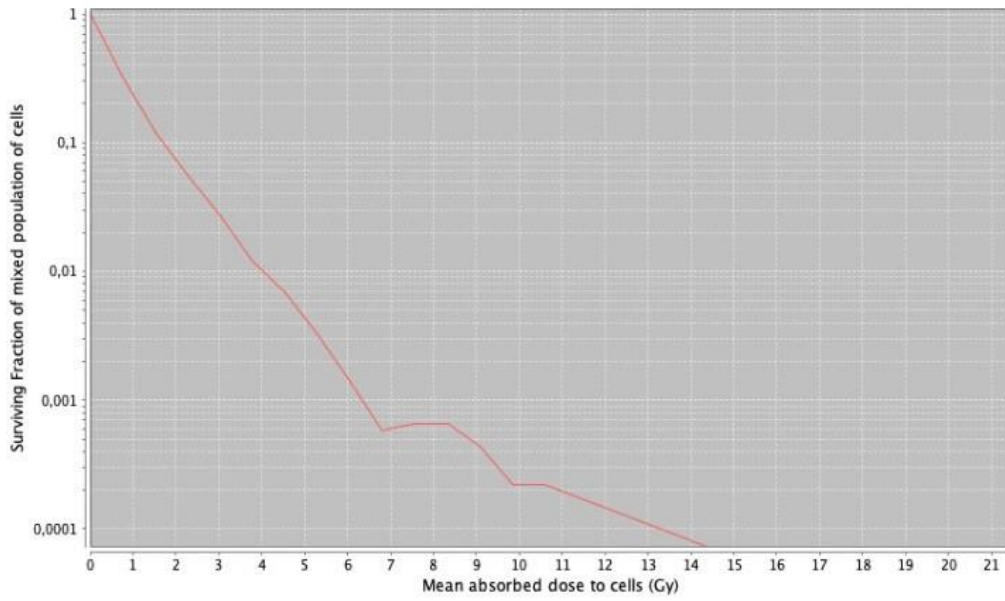


Figura 40: Curva de sobrevivência para uma cultura 3D de células PC3 sujeita a uma atividade volúmica de 55 Bq/mL.

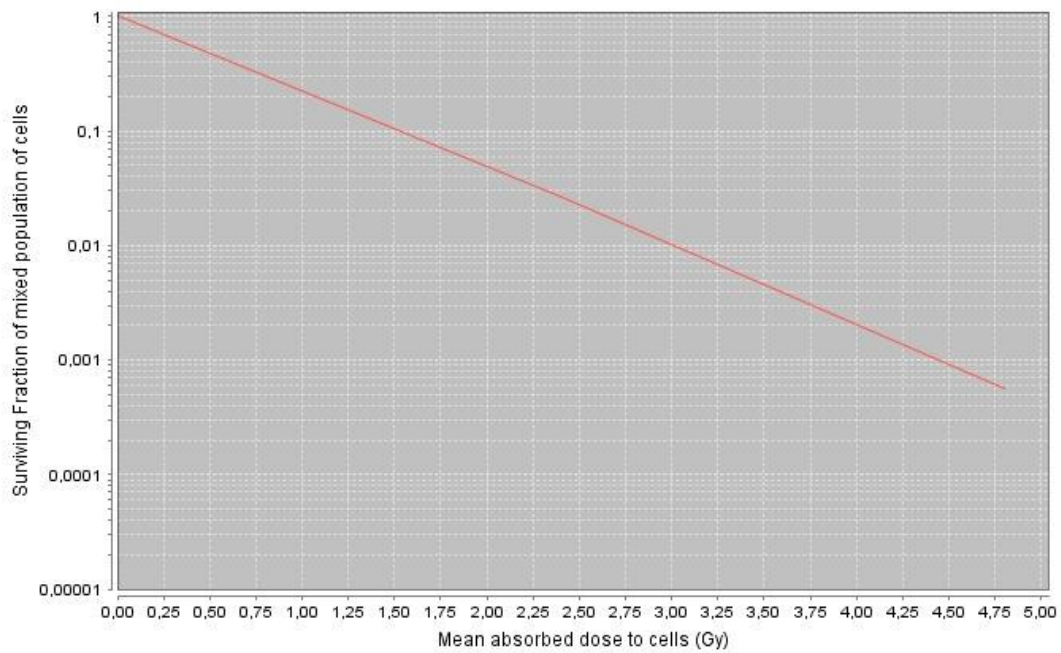


Figura 41: Curva de sobrevivência para uma cultura 2D de células PC3 sujeita a uma atividade volúmica de 55 Bq/mL.

5. Discussão

O cancro da próstata afeta milhões de homens em todo o mundo, sendo uma das neoplasias mais incidentes no sexo masculino. No entanto, ainda que se tenha verificado um aumento da taxa de sobrevivência dos doentes com cancro da próstata ao longo do tempo, o avanço desta doença para estádios avançados ainda permanece um desafio devido ao seu mau prognóstico (Rebello et al., 2021). O cancro da próstata metastático resistente à castração (CPMRC) é o estágio mais avançado do cancro da próstata e o que apresenta maior letalidade, com uma sobrevida relativamente curta, tendo, por isso, sido alvo de diversos estudos com o intuito de aumentar as opções terapêuticas disponíveis que, neste momento, são apenas paliativas. A elevada prevalência de metastização óssea levou ao surgimento de alternativas terapêuticas dirigidas a este tecido, como o dicloreto de rádio-223 (Suominen et al., 2019). Todavia, permanecem ainda diversas dúvidas relativamente ao conhecimento dos efeitos radiobiológicos e dos cálculos dosimétricos deste radiofármaco, condicionando uma aplicação clínica mais eficaz (Marques, 2016).

De forma a compreender e a avaliar o efeito antitumoral e o perfil cinético do rádio-223, foram conduzidos diversos estudos no nosso grupo de trabalho, envolvendo duas linhas celulares de cancro da próstata metastático, a linha celular PC3 e a linha celular LNCaP. Os resultados demonstraram haver uma internalização do rádio-223 nas duas linhas celulares, verificando-se a sua retenção no interior das células ao longo do tempo. Além disso, verificou-se ainda que as células irradiadas revelaram uma diminuição da sua proliferação e sobrevivência, assim como alterações morfológicas associadas a eventos apoptóticos e aumentos das lesões no ADN com o acréscimo da dose absorvida (Marques et al., 2021).

Contudo, como estes ensaios foram realizados em culturas celulares 2D e considerando a relevância clínica deste tema, procedeu-se ao seu seguimento em modelos mais complexos e que permitissem uma melhor mimetização do microambiente tumoral *in vivo*. Assim, o estabelecimento de culturas celulares 3D representativas da estrutura da metástase surge na tentativa de ultrapassar algumas das limitações, representando de forma mais realista as interações célula-célula e os gradientes de oxigénio e de nutrientes disponíveis que, em simultâneo, asseguram uma representação mais aproximada do ambiente fisiológico e da resposta das células tumorais às alternativas terapêuticas em estudo (Habanjar et al., 2021; Jensen & Teng, 2020). De entre as várias metodologias previamente testadas pelo nosso grupo de investigação (Tavares, 2019; Silva, 2021), a obtenção de esferoides através da cultura por sobreposição líquida (Fernandes, 2022) provou ser a melhor para obter esferoides coesos, compactos, uniformes, reprodutíveis e de longa duração. Além disso, através deste método foi possível obter esferoides a partir de um menor número de células (5 000), o que se torna numa vantagem pois, de acordo com Leek e seus colaboradores (Leek et al., 2016), esferoides de menores dimensões desenvolvem uma região necrótica menor, sendo, por isso, os mais adequados e os que fornecem os resultados mais precisos aquando da realização de ensaios *in vitro*.

Tendo em consideração a relevância do uso de estruturas 3D para a realização dos estudos de radiobiologia, foram estabelecidos esferoides a partir de uma concentração inicial de 1 000 células PC3. Todavia, verificou-se que estes esferoides necessitavam de um maior tempo para se estabelecerem (6 dias) comparativamente aos esferoides desenvolvidos a partir de 5 000 células (2 dias). Apesar de no primeiro dia os esferoides de 1 000 células apresentarem uma área média de 0,33 mm² e um diâmetro equivalente médio de 0,65 mm, relativamente aos resultados obtidos por Fernandes (Fernandes, 2022), onde esferoides constituídos inicialmente por 5 000 células PC3, apresentavam uma área de 0,71 mm² e um diâmetro equivalente de 0,95 mm, ambos demonstraram

um perfil de crescimento semelhante ao longo do tempo. Este perfil de crescimento incluiu um período de proliferação, seguido pela estagnação do crescimento 7 dias (esferoides de 5 000 células) ou 13 dias (esferoides de 1 000 células) após o início da cultura. O comportamento verificado ocorreu, possivelmente, devido à elevada capacidade proliferativa das células PC3 que, ao longo do tempo, se vão multiplicando e acumulando. No entanto, com o crescimento dos esferoides, ocorre a criação de diversas camadas celulares compactas, expostas a diferentes níveis de oxigénio e de nutrientes, provocando o desenvolvimento de um core necrótico e hipóxico, como observado através da marcação com *CytoPainter Green Fluorescence*. Consequentemente, nesta zona central do esferoide verifica-se uma diminuição dos níveis de oxigénio e de nutrientes, que se tornam insuficientes para suportar a capacidade proliferativa celular, podendo estar associados à estabilização do crescimento dos esferoides (Bull et al., 2020; Silva, 2021).

Outro modelo de esferoide utilizado neste estudo foi obtido a partir da linha celular LNCaP, para o qual ainda não se tinha conseguido desenvolver anteriormente nenhum modelo no grupo de investigação (Fernandes, 2022). Os esferoides foram estabelecidos pelo mesmo método, tendo sido determinado que a concentração inicial de 2 500 células e a incubação de 2 dias eram as condições ideais para estabelecer esferoides LNCaP adequados à realização dos estudos de radiobiologia. Estas estruturas 3D, dois dias após o início do procedimento experimental, apresentavam uma área média de 0,08 mm² e um diâmetro equivalente médio de 0,32 mm. Apesar de não atingirem dimensões tão elevadas como os esferoides da linha celular PC3, ao longo dos dias, e tal como observado por Jouberton e colaboradores (Jouberton et al., 2022), verificou-se também um aumento do tamanho dos esferoides da linha celular LNCaP. No entanto, o perfil de crescimento dos esferoides de LNCaP não apresentou um período de estagnação, possivelmente devido ao reduzido tempo de monitorização.

De forma semelhante aos resultados obtidos por Raghavan e seus colaboradores (Raghavan et al., 2016), realizados em células do cancro da mama (MCF7) ou em células do cancro do ovário (OVCAR8), ou, mais recentemente, por Souza-Araújo e colaboradores (Souza-Araújo et al., 2020), observou-se que a morfologia e o “arranjo” das estruturas celulares dependem não só da técnica utilizada, como também da linha celular em estudo. Deste modo e, tal como descrito por Carlsson e colaboradores (Carlsson et al., 1983), verificar-se-á uma estrutura específica para os esferoides de acordo com a sua constituição celular. Por exemplo, comparando a compacidade entre os diferentes tipos de esferoides obtidos, denotou-se que a compacidade média dos esferoides constituídos por células PC3 foi inferior aos valores obtidos para os esferoides da linha celular LNCaP que, ao demonstrarem a maior tendência das suas células constituintes em formarem agregados, corroboram a literatura existente, confirmando a diversidade morfológica dos esferoides de acordo com a linha celular utilizada (Eder et al., 2016). Esta diferença pode-se dever ao formato das células, uma vez que, neste caso, as células PC3 demonstram um formato arredondado e de menor dimensão, enquanto as células LNCaP apresentam uma morfologia estrelada e maior. Além disso, nem sempre é possível obter esferoides para todas as linhas celulares através da técnica de sobreposição líquida, uma vez que a sua estrutura é dependente da capacidade intrínseca das células se agregarem em estruturas tridimensionais (Costa et al., 2018).

A avaliação dos efeitos radiobiológicos do rádio-223 já tinha sido realizada em culturas 2D contudo, a nível tridimensional, poucos foram os estudos realizados até ao momento. Abramenkovs e colaboradores (Abramenkovs et al., 2022) analisaram os efeitos do rádio-223 em culturas 2D de

células do cancro da próstata, de origem não metastática (células 22RV1), de origem em metástase óssea (células PC3) e em metástase cerebral (células DU145), entre 8 a 14 dias após a sua exposição a atividades volúmicas variáveis de 0 a 500 Bq/mL. Além disso, estabeleceram também esferoides compostos por 1 000 células 22RV1 ou 1 000 células DU145, avaliando os efeitos do radiofármaco na morfologia destas estruturas 18 dias após irradiação com atividades volúmicas iniciais entre 0 e 500 Bq/mL. Este estudo demonstrou um decréscimo significativo do crescimento dos esferoides com o aumento da atividade volúmica inicial.

Neste estudo, os esferoides estabelecidos e caracterizados *in vitro* foram irradiados através da exposição a diferentes atividades volúmicas iniciais de 0, 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL de rádio-223 e os efeitos radiobiológicos avaliados sete dias após a remoção da atividade. O uso destas atividades volúmicas e do tempo de exposição tiveram por base os resultados obtidos previamente pelo grupo de investigação (Fernandes, 2022).

Os efeitos da irradiação na morfometria dos esferoides foram alvos de avaliação. Efetivamente, verificou-se que um aumento da atividade inicial induziu um decréscimo do crescimento e do tamanho, para os esferoides de células PC3 ou de células LNCaP, comparativamente ao grupo controlo. Adicionalmente, observou-se a desintegração dos esferoides ao longo do tempo, especialmente quando expostos a atividades volúmicas iguais ou superiores a 3 520 Bq/mL. A desintegração verificou-se sobretudo na periferia dos esferoides, podendo ser justificada pela baixa capacidade de penetração do radiofármaco, que origina uma deposição da energia na zona mais exposta às partículas α . Consequentemente, ao promover a perda das conexões célula-célula, este fenómeno pode-se tornar responsável pela desagregação das células componentes do esferoide que, ao se separarem da estrutura principal, o tornam cada vez menor (Silva, 2021; Fernandes, 2022). Estes resultados estão em concordância com os estudos prévios realizados no nosso laboratório em esferoides com 5 000 células PC3 (Fernandes, 2022). O perfil inicial de evolução dos esferoides foi semelhante entre condições, em termos de área e de diâmetro equivalente, o que pode estar relacionado com o período de ativação dos mecanismos de reparação das células, na tentativa de ultrapassarem as lesões sofridas. No entanto, com o aumento da atividade volúmica inicial administrada, e indo de encontro com os resultados observados ao *Brüningk* e colaboradores (Brüningk et al., 2020) em células do cancro colorretal (HCT116) e em células do cancro espinho-celular (CAL27), as lesões vão-se acumulando tornando-se, por vezes, irreparáveis, e levando à ativação de mecanismos de morte celular. Nestes casos, as células que não sobrevivem libertam-se da zona superficial dos esferoides, promovendo a sua desintegração com o decorrer do tempo, o que pode explicar o decréscimo da dimensão dos esferoides com o aumento da atividade volúmica inicial administrada. Além disso, realça-se ainda que com o aumento da atividade volúmica inicial se denotou uma evolução da área, do diâmetro equivalente e do volume de forma menos acentuada para os esferoides das linhas celulares PC3 e LNCaP. Estes resultados vão de encontro ao observado por *Wang* e colaboradores (J. Wang et al., 2006), que, ao exporem esferoides compostos por células LNCaP à radiação alfa, também verificaram um decréscimo no aumento destes parâmetros ao longo do período de monitorização. Relativamente aos esferoides da linha celular PC3, os esferoides compostos por células LNCaP apresentaram não só menores dimensões, como também uma divergência do seu padrão de crescimento para atividades superiores, reforçando a ideia de que as estruturas 3D dependem das linhas celulares que as compõem. Como seria de esperar, ao longo do tempo, o volume dos esferoides manifestou um perfil idêntico. A evolução do perímetro não demonstrou ser completamente regular, evidenciando valores inferiores para os esferoides de células LNCaP, quer

com o aumento das atividades volúmicas superiores, como comparativamente aos esferoides da linha celular PC3.

As variações da área, do diâmetro equivalente, do volume e do perímetro dos esferoides irradiados foram também acompanhadas por variações na circularidade, na esfericidade e na compacidade dos esferoides. Enquanto no grupo controlo a circularidade demonstrou um ligeiro aumento ao longo do tempo, nos grupos de esferoides irradiados esta apresentou uma evolução irregular que pode, em parte, ser justificada pela variação da área e do perímetro, uma vez que o seu cálculo pressupõe a determinação destes fatores (The Royal Society of Chemistry, 2014). Além disso, e de acordo com *Leung* e seus colaboradores (Leung et al., 2015), o gradiente de difusão de solutos e a circularidade encontram-se intimamente relacionados, sendo expectável que esta irregularidade seja responsável por uma difusão de oxigénio e nutrientes mais heterogénea e mais fraca, originando morte celular. Tal como seria de esperar, ao longo do período de monitorização, a esfericidade apresentou um perfil semelhante ao da circularidade, verificando-se ainda que, no geral, estes parâmetros demonstraram valores superiores para os esferoides de células LNCaP.

Relativamente à compacidade, ainda que não se tenha verificado um padrão evolutivo para os esferoides de células PC3, no geral, observou-se um aumento deste parâmetro entre o início e o fim do período em estudo. Estes resultados corroboram o que foi descrito anteriormente, demonstrando um aumento da compacidade num período inicial, correspondente à fase proliferativa, seguido de uma estabilização do seu tamanho. Para uma atividade volúmica de 7 040 Bq/mL, verificaram-se valores de compacidade menores, o que está em concordância com as imagens obtidas, uma vez que esferoides mais desagregados, estão associados a um grau de compacidade menor. Nos esferoides da linha celular LNCaP, a compacidade final dos grupos irradiados foi sempre inferior ao seu valor inicial e, apesar de também não se ter verificado uma evolução regular, os valores finais alcançados foram superiores comparativamente a todos os grupos dos esferoides de células PC3.

Os efeitos biológicos do rádio-223 também se observaram na viabilidade dos esferoides compostos por 1 000 células PC3 ou LNCaP, quando avaliada sete dias após a exposição das células a várias atividades volúmicas iniciais de rádio-223 durante 24h. Assim, verificou-se, através da medição dos níveis de ATP celular, um decréscimo significativo da viabilidade celular dos esferoides de células PC3 para atividades volúmicas iguais ou superiores a 3 520 Bq/mL, sugerindo a hipótese de que o decréscimo da viabilidade celular está associado à perda da capacidade de intercomunicação celular e, conseqüentemente, à desagregação e desintegração das células do esferoide. Estes resultados estão em concordância com a análise morfométrica, que demonstrou que a inibição do crescimento dos esferoides foi estatisticamente significativa a partir dos 3 520 Bq/mL. No geral, os valores obtidos foram idênticos aos observados em esferoides constituídos por 5 000 células PC3 por Fernandes (Fernandes, 2022). Doravante, adotou-se a abordagem com a preparação de esferoides com 5 000 células PC3 sempre que necessário, devido ao seu menor tempo de estabelecimento.

Ainda que preliminares, os resultados obtidos para o ensaio CellTiter-Glo® 3D em esferoides com 1 000 células LNCaP parecem também demonstrar valores decrescentes da viabilidade celular com o aumento da atividade volúmica inicial de rádio-223 administrada. Comparando o ensaio de viabilidade celular realizado em esferoides compostos por células PC3, os esferoides da linha celular LNCaP apresentaram valores inferiores, tal como observado por *Distel* e colaboradores (Distel et al., 2023), ao irradiarem esferoides de ambas as linhas celulares referidas. Assim, e de acordo com os resultados obtidos, ao serem expostos aos mesmos valores de atividades volúmicas, verificou-se a

possibilidade de uma maior sensibilidade dos esferoides da linha celular LNCaP quando sujeitos à irradiação com rádio-223, indo de encontro aos resultados anteriormente obtidos no nosso laboratório (Marques et al., 2021).

Segundo *Yamada* e seus colaboradores (Yamada et al., 2019), a migração e a invasão tumorais são processos complexos e multifatoriais que envolvem interações dinâmicas entre as células tumorais e o microambiente circundante, incluindo a matriz extracelular, as células vizinhas, moléculas de sinalização e fatores de crescimento. Assim, mesmo após a metastização, e em particular em células do cancro da próstata metastático resistente à castração, a análise da migração e da invasão celulares continua a ser fundamental na compreensão do desenvolvimento e do tratamento do cancro, permitindo avaliar a agressividade metastática, selecionar alvos terapêuticos, através da compreensão das vias de sinalização e dos mecanismos moleculares envolvidos, monitorizar a eficácia do tratamento, desenvolver terapias direcionadas e prever metástases futuras (Vinci et al., 2013; Rommerswinkel et al., 2014). Por estes motivos, recorreu-se ao ensaio em matrigel na tentativa de esclarecer o efeito do rádio-223 nestes processos.

De um modo geral, a avaliação da migração seis dias após a irradiação das culturas 3D durante 24 horas com rádio-223 demonstrou a presença de células migratórias na periferia dos esferoides, no grupo controlo e nos esferoides expostos a 55 Bq/mL, 72 horas após o início da monitorização. Para atividades volúmicas superiores não se verificou uma capacidade migratória celular, indo de encontro aos resultados obtidos por *Fehlauer* e colaboradores (Fehlauer et al., 2005), que também verificaram a diminuição da migração celular com o aumento da exposição à radiação em esferoides compostos por células de glioma. Esta alteração poderá ser justificada uma vez que, ao migrarem, as células são alvo de alterações no seu citoesqueleto e nos complexos de actina-miosina, associados ao movimento celular. Deste modo, para valores superiores de atividades volúmicas, a interação da radiação com o citoesqueleto e com as suas proteínas poderá induzir modificações neste complexo, influenciando a capacidade migratória das células (Merrick et al., 2021; Panzetta et al., 2020).

Quando avaliada a invasão celular, verificou-se a presença de células invasoras 72 horas após o início da monitorização na zona periférica dos esferoides do grupo controlo e nos esferoides irradiados com 55 Bq/mL. Durante a invasão, as células tumorais exibem um comportamento mais agressivo e adquirem a capacidade de produção de enzimas, como as metaloproteinases, que, ao promoverem a degradação das componentes da matriz extracelular, permitem o movimento das células tumorais através dessas regiões (Yamada et al., 2019; Novikov et al., 2021). No entanto, quando expostas à radiação, as células podem sofrer uma variedade de alterações promotoras da modificação da resposta celular invasiva, nomeadamente danos no ADN, responsáveis pela diminuição da sua capacidade proliferativa ou indutores da morte celular. Além disso, estão sujeitas à interrupção de vias de sinalização envolvidas no processo de invasão, como a via PI3 quinase-AKT-mTOR, associada ao controlo do crescimento, sobrevivência e motilidade celulares e também a alterações na interação célula-matriz e na rigidez da membrana extracelular (Yang et al., 2019). A adesão das células à matriz é mediada por proteínas de adesão, como as integrinas, expressas na superfície das células. Estas proteínas, ao ligarem as células aos restantes componentes da matriz permitem a movimentação e a migração celular. No entanto, quando expostas à radiação, a interação entre as células e a matriz extracelular pode ficar comprometida, limitando a sua capacidade de invadir tecidos (Koistinen & Heino, 2013; Panzetta et al., 2020).

Os efeitos radiobiológicos de um determinado radiofármaco dependem da energia depositada numa escala comparável ao alcance da radiação por si emitida. Desta forma, e considerando a heterogeneidade na quantidade de energia absorvida por uma população celular irradiada com radionuclídeos emissores de partículas alfa, de elevada LET, os cálculos dosimétricos para este tipo de emissores, mais concretamente o rádio-223, devem ser realizados a nível celular (Hofmann et al., 2020; Roeske et al., 2008). A nível clínico, a dosimetria torna possível a obtenção de noções da energia depositada no tecido ou órgão em estudo, permitindo ajustar a quantidade de radiofármaco administrado de modo a alcançar uma boa eficácia terapêutica (Budinger, 2014).

O formalismo MIRD, aplicado a nível celular através do *software MIRDcell V3.12*, permitiu a obtenção dos *S-values* que, posteriormente, auxiliaram no cálculo da dose absorvida. Os valores obtidos demonstraram uma diminuição dos *S-values* com o aumento da distância entre a fonte e o alvo, indicando que a dose absorvida numa determinada região alvo por cada decaimento diminui com o aumento da distância à fonte emissora, como resultado do curto percurso médio das partículas alfa. Indo de encontro aos resultados obtidos por *Rojas-Calderón* e seus colaboradores (Rojas-Calderón et al., 2018), que verificaram um decréscimo dos *S-values* com o aumento do tamanho das células, também nesta situação se verificou o mesmo, obtendo-se um valor superior de todos os *S-values* para a linha celular PC3, de raios celulares inferiores relativamente às células LNCaP. No entanto, verificou-se uma única exceção, para o *S-value* resultante da interação do radionuclídeo entre o núcleo e a membrana celular, $S(N \leftarrow C_s)$, que apresentou valores superiores para células com raios nucleares maiores, tal como observado para os resultados obtidos para as células PC3 e indo de encontro ao postulado por *Sadremomtaz* e *Masoumi* (Sadremomtaz & Masoumi, 2018).

De seguida, foram realizados os cálculos dosimétricos tendo em conta as condições de avaliação do conteúdo proteico celular estabelecidas anteriormente no nosso grupo de trabalho (Fernandes, 2022). Os resultados obtidos para as células PC3 evidenciaram um aumento da dose absorvida não só com o acréscimo da atividade inicial administrada como também com o tempo de irradiação das células, tal como verificado por *Bannik* e seus colaboradores (Bannik et al., 2019), ao irradiarem células do cancro colorretal (HCT116), do cancro da próstata (22RV1) e do cancro pulmão (A549, H1299 e H460) com rádio-223 em diferentes tempos (2,4 e 8 horas). De acordo com os valores obtidos para um tempo de exposição de 24 horas seguido de sete dias até à realização do ensaio, verificou-se um decréscimo do conteúdo proteico celular com o aumento da dose absorvida, todavia, esta diminuição apenas se demonstrou estatisticamente significativa para doses iguais ou superiores a 2 Gy. Tal como descrito anteriormente, as partículas emitidas pelo rádio-223, caracterizadas por uma elevada LET, são responsáveis por induzir danos diretos, mais concretamente quebras na cadeia dupla de ADN. No entanto, de forma a repararem as lesões sofridas, as células recorrem a mecanismos de reparação dos danos, associadas à ativação de vias de reparação do ADN, conduzindo ao aumento da expressão de proteínas envolvidas nestes processos (Sgouros et al., 2010; Penninckx et al., 2021). Assim, a significância estatística apenas para valores acima dos 2 Gy pode ser justificada por este mecanismo, demonstrando uma capacidade de reparação de danos celulares das células PC3 e uma resistência a doses mais baixas de radiação (até 1 Gy). Para valores de doses superiores, as células perdem a capacidade de reparação de danos, justificando, por conseguinte, um menor conteúdo proteico celular.

Para as células LNCaP verificou-se também um aumento da dose absorvida com o acréscimo da atividade inicial administrada. Comparativamente aos resultados obtidos para a dose absorvida

pelas células PC3 quando sujeitas às mesmas condições, observaram-se valores de dose absorvida inferiores para a linha celular LNCaP. Esta diferença deve-se sobretudo aos *S-values* obtidos para as células LNCaP, inferiores aos das células PC3, assim como a sua menor capacidade de captação do radiofármaco administrado. Através da representação gráfica do conteúdo proteico celular em função da dose absorvida para um tempo de exposição de 24 horas sucedido de sete dias até à realização do ensaio, observaram-se diferenças estatisticamente significativas a partir dos 0,02 Gy. Desta forma, e comparando com os valores obtidos para a linha celular PC3, denotou-se uma menor capacidade de reparação de danos das células LNCaP, demonstrando a sua maior radiosensibilidade ao rádio-223. Os resultados estão em concordância com os estudos efetuados por *Distel* e seus colaboradores (*Distel et al., 2023*), confirmando a suposição retirada após a comparação dos efeitos do radiofármaco na morfologia e na viabilidade celular entre as células PC3 e LNCaP. Esta diferença de radiosensibilidade poderá dever-se ao facto das células LNCaP provirem de um estado mais inicial do cancro da próstata metastático, demonstrando um crescimento lento e uma dependência androgénica que, por conseguinte, resultam num perfil menos agressivo e mais radiosensível. Por sua vez, as células PC3, originárias de um estágio muito avançado da doença, com uma elevada taxa proliferativa e sem dependência androgénica, evidenciam um comportamento mais agressivo e mais radioresistente (*Namekawa et al., 2019*). O comportamento das células em análise vai de encontro aos resultados observados quer por *Pinto* e seus colaboradores (*Pinto et al., 2020b*), que verificaram a maior radiosensibilidade de duas linhas celulares de cancro da próstata com dependência androgénica relativamente a uma linha celular independente de androgénios, sugerindo uma maior eficácia clínica do rádio-223 se administrado numa fase mais inicial da doença

A dosimetria do rádio-223 foi também realizada para condições de avaliação da capacidade das células sobreviverem e de formarem colónias, possibilitando o estudo do efeito do rádio-223 através da análise dos resultados dos ensaios clonogénicos previamente obtidos no nosso grupo de trabalho (*Fernandes, 2022*). Os resultados obtidos demonstraram um aumento da dose absorvida de acordo com o acréscimo das atividades iniciais administradas, corroborando os resultados obtidos por *Belchior* e seus colaboradores (*Belchior et al., 2020*) ao irradiarem células PC3 com tecnécio-99 metaestável. Além disso, verificou-se também um aumento da dose absorvida com o aumento do tempo de exposição à radiação provocando, conseqüentemente, um decréscimo na sobrevivência celular. As curvas de sobrevivência para as células PC3 foram obtidas através do modelo que melhor se ajustava aos pontos experimentais, o modelo linear quadrático, baseado na premissa de que a radiação ionizante induz várias lesões que desencadeiam uma interação entre respostas de forma a eliminar eficazmente as células atingidas (*McMahon, 2018*). A partir das duas curvas de sobrevivência, obtiveram-se DL_{50} de 36,29 Gy e de 48,44 Gy para as situações de 4 e 24 horas de exposição à radiação, respetivamente. Analisando os respetivos intervalos de confiança denotou-se uma interseção dos mesmos, permitindo verificar que, ainda que as doses obtidas para um intervalo de irradiação de 24 horas apresentassem valores muito mais elevados, o efeito radiobiológico ocorre maioritariamente no tempo inicial de exposição ao radiofármaco. No entanto, estes resultados exibiram uma discrepância comparativamente ao que se verificou na avaliação do conteúdo proteico, em que o decréscimo da proliferação apenas se demonstrou significativo para uma dose igual ou superior a 2 Gy, correspondente a uma atividade volúmica inicial de 3 520 Bq/mL. Como referido anteriormente, tal comportamento poderá ser justificado como consequência da ativação dos mecanismos de reparação dos danos causados pelas partículas alfa, responsáveis pelo aumento do conteúdo proteico celular para valores inferiores de dose administrada, o que, no entanto, poderá não significar que as

células continuem a proliferar e a formar colónias, sugerindo uma explicação para a diminuição da sobrevivência celular para doses inferiores.

Embora os resultados obtidos para os dois tipos de estudos estejam em concordância, demonstrando o efeito do rádio-223 no decréscimo da sobrevivência celular (Marques, 2016), os valores de doses absorvidas obtidos de acordo com as condições subjacentes aos ensaios realizados demonstraram resultados superiores para as situações de avaliação da sobrevivência celular quer comparativamente aos valores anteriormente obtidos por Marques e colaboradores (Marques et al., 2021), como em relação à análise do conteúdo proteico celular. Este facto pode ser justificado pelos parâmetros utilizados no cálculo das doses, uma vez que a dosimetria *in vitro* é dependente do número de decaimentos ocorridos, proporcional à quantidade de atividade inicial administrada e inversamente proporcional ao número de células sujeitas à radiação. Assim, facilmente se compreende que um ensaio realizado com um menor número de células (1 500) sujeitas a uma maior atividade (165 a 21 120 Bq), como o ensaio clonogénico, origine valores de dose absorvida bastante superiores relativamente a um ensaio executado com uma maior concentração de células (30 000) irradiadas com um menor intervalo de atividades iniciais (27,5 a 3 520 Bq), como foi o caso da análise do conteúdo proteico.

Finalmente, os gráficos da sobrevivência celular para esferoides e para culturas 2D de células PC3, obtidos através do *MIRDcell V3.12*, estão em conformidade com os estudos realizados por *Distel* e seus colaboradores (Distel et al., 2023), demonstrando uma maior radiosensibilidade das culturas 2D quando expostas à radiação ionizante. De acordo com *Leek* e seus colaboradores (Leek et al., 2016), esferoides com um diâmetro superior a 160 μm começam a desenvolver um núcleo hipóxico. Deste modo, e tendo em conta que o esferoide em análise apresentava um raio de 326 μm , é possível que a presença de uma região hipóxica na sua zona central restrinja a formação de ROS, responsáveis pela indução de efeitos radiobiológicos secundários nas células, e provoque a acidificação do meio, promotora da redução da captação do radiofármaco, tornando este tipo de culturas mais resistentes à radiação ionizante (Nunes et al., 2019). A arquitetura espacial do esferoide poderá também ter sido uma razão pelas diferenças observadas na sua resistência ao rádio-223, em particular, a existência de uma camada exterior proliferativa, com um maior número de células em fases do ciclo celular mais sensíveis à radiação, e de camadas interiores, com células quiescentes e senescentes, mais resistentes à terapêutica (Xing et al., 2005). Além disso, e tendo em conta a capacidade de penetração das partículas alfa nos tecidos biológicos, cerca de 100 μm , como os esferoides em estudo apresentavam raios superiores a esse valor, as partículas acabavam por não conseguirem alcançar todas as células constituintes dos esferoides, levando a uma diminuição do efeito citotóxico comparativamente às culturas 2D, que apresentam todas as células expostas de igual modo à radiação particulada. Assim, o aumento da radiorresistência das células componentes das estruturas 3D contribui para uma melhor representação do microambiente tumoral, mimetizando de forma mais realista a resposta *in vivo* aos radiofármacos.

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

No decorrer deste projeto foram realizados diversos estudos com o objetivo de analisar os efeitos radiobiológicos e a dosimetria do rádio-223 em modelos celulares 2D e 3D de cancro da próstata metastático. Neste sentido, através da cultura de sobreposição líquida, foram estabelecidos esferoides das linhas celulares PC3 ou LNCaP, com diferente número inicial de células. Os esferoides de 1 000 células PC3 desenvolvidos mantiveram-se compactos, coesos e uniformes durante o tempo necessário para a realização dos ensaios com o radiofármaco, demonstrando uma progressão morfológica e um formato aproximadamente circular até ao décimo terceiro dia após o início da realização da experiência, estabilizando o seu crescimento nos dias subsequentes. De igual forma, foram também desenvolvidos esferoides de 1 000 e 2 500 células LNCaP, demonstrando que a centrifugação da placa se revelou um procedimento essencial para a agregação dos aglomerados celulares. Ao longo do período de monitorização, os esferoides evidenciaram um aumento progressivo do seu tamanho não se verificando, no entanto, a sua estabilização. Por este motivo, no futuro, torna-se essencial alargar o período de cultura e monitorização dos esferoides, de forma a possibilitar a estabilização do crescimento e a análise morfométrica nesse instante.

A avaliação dos efeitos radiobiológicos do rádio-223 foi realizada através da exposição dos esferoides a atividades volúmicas iniciais de rádio-223 de 55, de 3 520 e de 7 040 Bq/mL durante seis (LNCaP) e nove (PC3) dias. Relativamente aos seus efeitos na morfologia dos agregados 3D, verificou-se que, de um modo geral, o aumento da atividade volúmica inicial adicionada foi responsável por uma desintegração progressiva dos esferoides de células PC3 ou de células LNCaP na sua região periférica devido, possivelmente, à maior exposição desta zona à radiação emitida pelo radiofármaco. Ademais, verificou-se uma inibição do crescimento dos esferoides, resultando na diminuição da área, do diâmetro equivalente, do perímetro e do volume em comparação com os esferoides não irradiados. A compacidade, a circularidade e a esfericidade não demonstraram alterações significativas após a irradiação.

De acordo com os resultados da análise da viabilidade celular, concluiu-se que o rádio-223 foi responsável pela perda de viabilidade celular para os dois tipos de esferoides, ambos desenvolvidos inicialmente com 1 000 células. Os valores de viabilidade celular obtidos foram inferiores para as estruturas 3D de células LNCaP, podendo sugerir a sua maior radiosensibilidade. No entanto, como os resultados são preliminares é fundamental a sua replicação. Tendo em conta que os efeitos do rádio-223 nos esferoides compostos por 1 000 células PC3 apresentaram concordância com os efeitos anteriormente observados para os esferoides de 5 000 células PC3, a partir daí, o procedimento de formação de esferoides foi realizado utilizando 5 000 células como número de células inicial, permitindo o estabelecimento dos esferoides em menor tempo. Relativamente aos ensaios de migração e de invasão celulares, verificou-se que o radiofármaco provocou um decréscimo na capacidade migratória e invasiva das células periféricas dos esferoides irradiados com atividades volúmicas iniciais iguais ou superiores a 3 520 Bq/mL, essencialmente 72 horas depois do início da monitorização, correspondentes a 6 dias após irradiação.

Em suma, a avaliação dos efeitos radiobiológicos demonstrou que, no geral, a exposição a diferentes atividades de rádio-223 provocou uma diminuição no tamanho, na viabilidade, na migração e na invasão celular dos esferoides de cancro da próstata. Tal efeito sugere a potencialidade terapêutica do radiofármaco para uma atividade inicial mais baixa, o que se torna particularmente

interessante uma vez que poderá contribuir para a redução da atividade de rádio-223 administrada nos doentes e, por conseguinte, a limitação dos efeitos secundários.

Os cálculos dosimétricos, realizados em diferentes condições de irradiação, permitiram verificar que os valores de dose absorvida por célula tendem a aumentar com o acréscimo do tempo de exposição à radiação, com a atividade inicial adicionada e com a diminuição da densidade celular. Ao avaliar a influência das células vizinhas na dose absorvida, concluiu-se que a vizinhança é responsável por uma pequena fração na totalidade da dose que uma célula absorve, como resultado do curto percurso médio das partículas alfa. Todavia, foi notório que o aumento da distância entre uma célula considerada alvo e uma célula considerada fonte é responsável por um decréscimo da contribuição na dose total absorvida.

Efetivamente, e de acordo com os resultados obtidos em condições de avaliação do conteúdo proteico celular, concluiu-se que a linha celular LNCaP é a mais radiossensível ao rádio-223, o que poderá ser justificado com base na sua origem, uma vez que provém de metástases linfáticas associadas a um estágio menos avançado de cancro da próstata. Por este motivo, no futuro, seria pertinente aprofundar os estudos dos efeitos da exposição ao rádio-223 em células representativas deste tipo de metástases de cancro da próstata. Além disso, os cálculos da dose absorvida para as condições do ensaio clonogénico foram concordantes com os resultados obtidos anteriormente, evidenciando uma diminuição da sobrevivência celular com o aumento da dose absorvida por célula.

Por fim, e tendo em consideração as curvas de simulação obtidas para as culturas celulares 2D e 3D, foi evidente que o mesmo efeito biológico em ambos os tipos de culturas foi alcançado através de diferentes valores de dose absorvida. Mais concretamente, a dose necessária para provocar o mesmo decréscimo da sobrevivência celular foi superior para os esferoides, demonstrando a sua maior radorresistência comparativamente a culturas em monocamada. Estas diferenças de radorresistência dever-se-ão, sobretudo, ao baixo poder de penetração das partículas alfa emitidas pelo rádio-223 e à arquitetura espacial do esferoide que, em simultâneo, permitem uma melhor mimetização do microambiente tumoral *in vivo*. Além da dosimetria realizada através do software *MIRDcell V3.12* seria também relevante determinar as doses de rádio-223 absorvidas pelas células e comparar com os resultados obtidos através de outros programas, como o Geant4 ou o TOPAS, uma versão baseada no Geant4 que incorpora modelos de física avançados pertinentes em simulações detalhadas das interações heterogéneas de partículas com a matéria.

Embora a terapia com rádio-223 tenha demonstrado resultados favoráveis com o aumento da sobrevida e da qualidade de vida dos doentes com cancro da próstata metastático resistente à castração, esta doença continua a manifestar um prognóstico muito desfavorável. Assim, e na tentativa de ultrapassar as limitações enfrentadas na compreensão desta patologia e dos mecanismos de ação do radiofármaco, torna-se essencial o desenvolvimento de estudos adicionais. Futuramente, o estabelecimento de culturas celulares heterotípicas de cancro da próstata, constituídas por uma linha celular de cancro da próstata e por outras linhas celulares representativas do estroma, como osteoblastos, fibroblastos e células endoteliais, serão um passo importante na aproximação da arquitetura das estruturas 3D ao microambiente tumoral. Em particular, a linha celular PC3 poderá ser cultivada simultaneamente com uma linha celular de osteoblastos ou de células endoteliais, mimetizando o ambiente metastático, e a linha celular LNCaP com linfócitos, evidenciando a

complexidade dos esferoides. Posteriormente, o desenvolvimento e a avaliação de terapias combinadas em estruturas heterotípicas 3D, envolvendo o rádio-223 com outros agentes quimioterapêuticos, com terapias hormonais ou com inibidores da reparação dos danos no ADN, poderão ser determinantes no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas com melhor eficácia, maximizando a aplicabilidade do rádio-223 no tratamento de doentes com cancro da próstata metastático resistente à castração.

7. Bibliografia

- Abou, D. S., Ulmert, D., Doucet, M., Hobbs, R. F., Riddle, R. C., & Thorek, D. L. J. (2016). Whole-Body and Microenvironmental Localization of Radium-223 in Naïve and Mouse Models of Prostate Cancer Metastasis. *Journal of the National Cancer Institute*, 108(5). <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJV380>
- Abramenkovs, A., Hariri, M., Spiegelberg, D., Nilsson, S., & Stenerlöw, B. (2022). Ra-223 induces clustered DNA damage and inhibits cell survival in several prostate cancer cell lines. *Translational Oncology*, 26, 101543. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101543>
- Abshire, D., & Lang, M. K. (2018). The Evolution of Radiation Therapy in Treating Cancer. In *Seminars in Oncology Nursing* (Vol. 34, Issue 2, pp. 151–157). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2018.03.006>
- Agrawal, S. (2020). The role of 225Ac-PSMA-617 in chemotherapy-naive patients with advanced prostate cancer: Is it the new beginning. *Indian Journal of Urology : IJU : Journal of the Urological Society of India*, 36(1), 69. https://doi.org/10.4103/IJU.IJU_266_19
- Bannik, K., Madas, B., Jarzombek, M., Sutter, A., Siemeister, G., Mumberg, D., & Zitzmann-Kolbe, S. (2019). *Radiobiological effects of the alpha emitter Ra-223 on tumor cells*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54884-7>
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. In *International Journal of Medical Sciences* (Vol. 9, Issue 3, pp. 193–199). <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>
- Belchior, A., Maria, S. Di, Fernandes, C., Vaz, P., Paulo, A., & Raposinho, P. (2020). *Radiobiological and dosimetric assessment of DNA-intercalated 99m Tc-complexes bearing acridine orange derivatives*. <https://doi.org/10.1186/s13550-020-00663-9>
- Bernardino, R. M. M., Leão, R., Henrique, R., Pinheiro, L. C., Kumar, P., Suravajhala, P., Beck, H. C., Carvalho, A. S., & Matthiesen, R. (2021). Extracellular vesicle proteome in prostate cancer: A comparative analysis of mass spectrometry studies. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 24). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222413605>
- Beyzadeoglu, M., Ozyigit, G., & Ebruli, C. (2010). *Basic Radiation Oncology*.
- Bolch, W. E., Eckerman, K. F., Sgouros, G., Thomas, S. R., Brill, A. B., Fisher, D. R., Howell, R. W., Meredith, R., & Wessels, B. W. (2009). A Generalized Schema for Radiopharmaceutical Dosimetry-Standardization of Nomenclature In collaboration with the SNM MIRD Committee. *J Nucl Med*, 50, 477–484. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.056036>
- Brito, A. E., & Etchebehere, E. (2020). Radium-223 as an Approved Modality for Treatment of Bone Metastases. In *Seminars in Nuclear Medicine* (Vol. 50, Issue 2, pp. 177–192). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2019.11.005>

- Browning, A. P., Sharp, J. A., Murphy, R. J., Gunasingh, G., Lawson, B., Burrage, K., Haass, N. K., & Simpson, M. (2021). *Quantitative analysis of tumour spheroid structure*. 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.73020>
- Brüningk, S. C., Rivens, I., Box, C., Oelfke, U., & ter Haar, G. (2020). 3D tumour spheroids for the prediction of the effects of radiation and hyperthermia treatments. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-58569-4>
- Budinger, T. F. (2014). Absorbed Radiation Dose Assessment from Radionuclides. *Comprehensive Biomedical Physics*, 253–269. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53632-7.00117-9>
- Bull, J. A., Mech, F., Quaiser, T., Waters, S. L., & Byrne, H. M. (2020). Mathematical modelling reveals cellular dynamics within tumour spheroids. *PLoS Computational Biology*, 16(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1007961>
- Camus, V. L., Stewart, G., Nailon, W. H., McLaren, D. B., & Campbell, C. J. (2016). Measuring the effects of fractionated radiation therapy in a 3D prostate cancer model system using SERS nanosensors. *Analyst*, 141(17), 5056–5061. <https://doi.org/10.1039/C6AN01032F>
- Capala, J., Graves, S. A., Scott, A., Sgouros, G., James, S. S., Zanzonico, P., & Zimmerman, B. E. (2021). Dosimetry for Radiopharmaceutical Therapy: Current Practices and Commercial Resources. *J Nucl Med*, 62, 3–11. <https://doi.org/10.2967/jnumed.121.262749>
- Capes-Davis, A., & Freshney, R. I. (2021). *Freshney's Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 704. <https://www.wiley.com/en-gb/Freshney%27s+Culture+of+Animal+Cells%3A+A+Manual+of+Basic+Technique+and+Specialized+Applications%2C+8th+Edition-p-9781119513049>
- Carlsson, J., Nilsson, K., Westermark, B., Pontén, J., Sundström, C., Larsson, E., Bergh, J., Pählman, S., Busch, C., & Collins, V. P. (1983). Formation and growth of multicellular spheroids of human origin. *International Journal of Cancer*, 31(5), 523–533. <https://doi.org/10.1002/IJC.2910310502>
- Chalkia, M., Arkoudis, N. A., Maragkoudakis, E., Rallis, S., Tremi, I., Georgakilas, A. G., Kouloulis, V., Efstathopoulos, E., & Platoni, K. (2022). The Role of Ionizing Radiation for Diagnosis and Treatment against COVID-19: Evidence and Considerations. In *Cells* (Vol. 11, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells11030467>
- Chan, L. L. Y., Rice, W. L., & Qiu, J. (2020). Observation and quantification of the morphological effect of trypan blue rupturing dead or dying cells. *PLOS ONE*, 15(1), e0227950. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0227950>
- Chatal, J. F., & Hoefnagel, C. A. (1999). Radionuclide therapy. In *Lancet* (Vol. 354, Issue 9182, pp. 931–935). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)06002-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)06002-X)
- Chen, C. L., Chen, Y.-T., Cantó, E., Anguera, G., Jiménez, N., Mellado, B., Ramírez, O., Mariscal, A., Maroto, P., & Vidal, S. (2023). *Association between the Immunophenotype of Peripheral Blood*

- from mCRPC Patients and the Outcomes of Radium-223 Treatment. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13132222>
- Coleman, R. E., Croucher, P. I., Padhani, A. R., Clézardin, P., Chow, E., Fallon, M., Guise, T., Colangeli, S., Capanna, R., & Costa, L. (2020). Bone metastases. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 6, Issue 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00216-3>
- Corning. (2023). *Corning® 96-well Spheroids Microplates*. (n.d.). Retrieved May 13, 2023, from <https://ecatalog.corning.com/life-sciences/b2b/NO/en/Microplates/Assay-Microplates/96-Well-Microplates/Corning%C2%AE-96-well-Spheroid-Microplates/p/4515>
- Corrò, C., Novellademunt, L., & Li, V. S. W. (2020). A brief history of organoids. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *319*(1), C151–C165. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2020>
- Costa, E. C., de Melo-Diogo, D., Moreira, A. F., Carvalho, M. P., & Correia, I. J. (2018). Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches. *Biotechnology Journal*, *13*(1). <https://doi.org/10.1002/BIOT.201700417>
- Crouch, S. P. M., Kozlowski, R., Slater, K. J., & Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, *160*(1), 81–88. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90011-U](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90011-U)
- Daniyal, M., Siddiqui, Z. A., Akram, M., Asif, H. M., Sultana, S., & Khan, A. (2014). Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. In *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* (Vol. 15, Issue 22, pp. 9575–9578). Asian Pacific Organization for Cancer Prevention. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.22.9575>
- Desai, K., McManus, J. M., & Sharifi, N. (2021). Hormonal therapy for prostate cancer. In *Endocrine Reviews* (Vol. 42, Issue 3, pp. 354–373). Endocrine Society. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnab002>
- Deshayes, E., Fersing, C., Thibault, C., Roumiguie, M., Pourquier, P., & Houédé, N. (2023). Innovation in Radionuclide Therapy for the Treatment of Prostate Cancers: Radiochemical Perspective and Recent Therapeutic Practices. *Cancers*, *15*(12), 3133. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15123133>
- Deshayes, E., Roumiguie, M., Thibault, C., Beuzeboc, P., Cachin, F., Hennequin, C., Huglo, D., Rozet, F., Kassab-Chahmi, D., Rebillard, X., & Houédé, N. (2017). Radium 223 dichloride for prostate cancer treatment. In *Drug Design, Development and Therapy* (Vol. 11, pp. 2643–2651). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S122417>
- Diniz Filho, J. F. S., de Barros, A. O. da S., Pijeira, M. S. O., Ricci-Junior, E., Midlej, V., Baroni, M. P. M. A., dos Santos, C. C., Alencar, L. M. R., & Santos-Oliveira, R. (2023). Ultrastructural Analysis of Cancer Cells Treated with the Radiopharmaceutical Radium Dichloride ([²²³Ra]RaCl₂): Understanding the Effect on Cell Structure. *Cells*, *12*(3). <https://doi.org/10.3390/CELLS12030451>

- Distel, R., Jost, T., Hildebrand, L., Raitanen, J., Barta, B., Hacker, M., Georg, D., Balber, T., & Mitterhauser, M. (2023). *Comparison of Radiation Response between 2D and 3D Cell Culture Models of Different Human Cancer Cell Lines*. <https://doi.org/10.3390/cells12030360>
- Dominijanni, A. J., Devarasetty, M., Forsythe, S. D., Votanopoulos, K. I., & Soker, S. (2021). *Cell Viability Assays in Three-Dimensional Hydrogels: A Comparative Study of Accuracy*. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2021.0060>
- Donya, M., Radford, M., ElGuindy, A., Firmin, D., & Yacoub, M. H. (2014). Radiation in medicine: Origins, risks and aspirations. *Global Cardiology Science and Practice*, 2014(4), 57. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2014.57>
- Dunn, M. W., & Kazer, M. W. (2011). Prostate cancer overview. *Seminars in Oncology Nursing*, 27(4), 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2011.07.002>
- Eder, T., Weber, A., Neuwirt, H., Grünbacher, G., Ploner, C., Klocker, H., Sampson, N., & Eder, I. E. (2016). Cancer-associated fibroblasts modify the response of prostate cancer cells to androgen and anti-androgens in three-dimensional spheroid culture. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS17091458>
- Elliott, A. D. (2020). *Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices*. <https://doi.org/10.1002/cpcy.68>
- European Medicines Agency. (2013). *XOFIGO - RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO*. (n.d.).
- Fehlauer, F., Muench, M., Rades, D., Stalpers, L. J. A., Leenstra, S., Van Der Valk, P., Slotman, B., Smid, E. J., & Sminia, P. (2005). Effects of irradiation and cisplatin on human glioma spheroids: Inhibition of cell proliferation and cell migration. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 131(11), 723–732. <https://doi.org/10.1007/S00432-005-0014-3/METRICS>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Fernandes, C. (2022). Efeitos do Rádio-223 em modelos celulares de cancro da próstata metastático. *Efeitos Do Rádio-223 Em Modelos Celulares de Cancro Da Próstata Metastático*. <https://estudogeral.uc.pt/handle/10316/103104>
- Fitzgerald, K. A., Guo, J., Tierney, E. G., Curtin, C. M., Malhotra, M., Darcy, R., O'Brien, F. J., & O'Driscoll, C. M. (2015). The use of collagen-based scaffolds to simulate prostate cancer bone metastases with potential for evaluating delivery of nanoparticulate gene therapeutics. *Biomaterials*, 66, 53–66. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2015.07.019>
- Flux, G. D. (2017). Imaging and dosimetry for radium-223: The potential for personalized treatment. *British Journal of Radiology*, 90(1077). <https://doi.org/10.1259/BJR.20160748/FORMAT/EPUB>

- Fontana, F., Raimondi, M., Marzagalli, M., Sommariva, M., Gagliano, N., & Limonta, P. (2020). *Molecular Sciences Three-Dimensional Cell Cultures as an In Vitro Tool for Prostate Cancer Modeling and Drug Discovery*. <https://doi.org/10.3390/ijms21186806>
- Fornetti, J., Welm, A. L., & Stewart, S. A. (2018). Understanding the Bone in Cancer Metastasis. In *Journal of Bone and Mineral Research* (Vol. 33, Issue 12, pp. 2099–2113). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3618>
- Fu, A., Yao, B., Dong, T., & Cai, S. (2023). Emerging roles of intratumor microbiota in cancer metastasis. *Trends in Cell Biology*, 33(7), 583–593. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.11.007>
- Furesi, G., Rauner, M., & Hofbauer, L. C. (2021). Emerging Players in Prostate Cancer–Bone Niche Communication. *Trends in Cancer*, 7(2), 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.09.006>
- Gibas, Z., Becher, R., Kawinski, E., Horoszewicz, J., & Sandberg, A. A. (1984). A high-resolution study of chromosome changes in a human prostatic carcinoma cell line (LNCaP). *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 11(4), 399–404. [https://doi.org/10.1016/0165-4608\(84\)90020-7](https://doi.org/10.1016/0165-4608(84)90020-7)
- GLOBOCAN. (2020). *World*. (n.d.). Retrieved August 4, 2023, from <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>
- Goh, A., Yeh, C. C., & Lei, K. F. (2020). Visualization and Quantification of 3D Tumor Cell Migration under Extracellular Stimulation. *ACS Applied Bio Materials*, 3(3), 1506–1513. <https://doi.org/10.1021/ACSABM.9B01134>
- Guerra Liberal, F. D. C., Moreira, H., Redmond, K. M., O’Sullivan, J. M., Alshehri, A. H. D., Wright, T. C., Dunne, V. L., Campfield, C., Biggart, S., McMahon, S. J., & Prise, K. M. (2022). Differential responses to 223Ra and Alpha-particles exposure in prostate cancer driven by mitotic catastrophe. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.877302>
- Guerra Liberal, F. D. C., O’Sullivan, J. M., McMahon, S. J., & Prise, K. M. (2020). Targeted Alpha Therapy: Current Clinical Applications. In *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* (Vol. 35, Issue 6, pp. 404–417). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/cbr.2020.3576>
- Gunti, S., Hoke, A. T. K., Vu, K. P., & London, N. R. (2021). Organoid and Spheroid Tumor Models: Techniques and Applications. *Cancers 2021*, Vol. 13, Page 874, 13(4), 874. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13040874>
- Habanjar, O., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F., & Delort, L. (2021). *Molecular Sciences 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages*. <https://doi.org/10.3390/ijms222212200>
- Hardiansyah, D., Riana, A., Kletting, P., Zaid, N. R. R., Eiber, M., Pawiro, S. A., Beer, A. J., & Glatting, G. (2021). A population-based method to determine the time-integrated activity in molecular radiotherapy. <https://doi.org/10.1186/s40658-021-00427-x>

- He, L., Fang, H., Chen, C., Wu, Y., Wang, Y., Ge, H., Wang, L., Wan, Y., & He, H. (2020). Metastatic castration-resistant prostate cancer: Academic insights and perspectives through bibliometric analysis. In *Medicine (United States)* (Vol. 99, Issue 15). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000019760>
- Heinlein, C. A., & Chang, C. (2004). Androgen receptor in prostate cancer. In *Endocrine Reviews* (Vol. 25, Issue 2, pp. 276–308). <https://doi.org/10.1210/er.2002-0032>
- Helal, M., & Dadachova, E. (2018). Radioimmunotherapy as a Novel Approach in HIV, Bacterial, and Fungal Infectious Diseases. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 33(8), 330. <https://doi.org/10.1089/CBR.2018.2481>
- Hofmann, W., Li, W. B., Friedland, W., Miller, B. W., Madas, B., Bardiès, M., & Balásházy, I. (2020). Internal microdosimetry of alpha-emitting radionuclides. *Radiation and Environmental Biophysics*, 59(1), 29–62. <https://doi.org/10.1007/s00411-019-00826-w>
- Howell, R. W., Rajon, D., & Bolch, W. E. (2012). Monte Carlo simulation of irradiation and killing in three-dimensional cell populations with lognormal cellular uptake of radioactivity. *Int J Radiat Biol*, 88(0), 115–122. <https://doi.org/10.3109/09553002.2011.602379>
- Howell, R. W., Wang, J., Katugampola, S., Dhawan, A., Goddu, M. S., Haydock, C., Paul, E., Rao, D. V., Rosen, A., Sastry, K. S. R., Trivedi, D., Vaziri, B., Wu, H., Adhikarla, V., Bartlett, R. M., Bolch, W. E., Brill, A. B., Dewaraja, Y. K., Dunphy, M. P., ... Zanzonico, P. B. (2023). *MIRDcell User Manual V3.13 MIRDcell User Manual Page 2 of 80 Past contributors to MIRDcell In collaboration with the SNMMI MIRD Committee.*
- Ivascu, A., & Kubbies, M. (2006). Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *Journal of Biomolecular Screening*, 11(8), 922–932. <https://doi.org/10.1177/1087057106292763>
- Jadvar, H., & Quinn, D. I. (2013). *Targeted α -Particle Therapy of Bone Metastases in Prostate Cancer.* <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000000290>
- Jensen, C., & Teng, Y. (2020). Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 33. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2020.00033/BIBTEX>
- Jones, J. A., Casey, R. C., & Karouia, F. (2010). Ionizing Radiation as a Carcinogen. *Comprehensive Toxicology, Second Edition*, 14, 181–228. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01411-1>
- Jouberton, E., Voissiere, A., Penault-Llorca, F., Cachin, F., & Miot-Noirault, E. (2022). Original Article Multicellular tumor spheroids of LNCaP-Luc prostate cancer cells as in vitro screening models for cytotoxic drugs. *Am J Cancer Res*, 12(3), 1116–1128. www.ajcr.us/
- Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. (2014). In vitro Cell Migration and Invasion Assays. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 88(88), 51046. <https://doi.org/10.3791/51046>

- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., & Jones, L. W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative Urology*, 17(1), 16–23. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/447482/>
- Katugampola, S., Wang, J., Rosen, A., & Howell, R. (2022a). MIRD Pamphlet No. 27: MIRDcell V3, a Revised Software Tool for Multicellular Dosimetry and Bioeffect Modeling. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 63(9). <https://doi.org/10.2967/JNUMED.121.263253>
- Katugampola, S., Wang, J., Rosen, A., & Howell, R. W. (2022b). a Revised Software Tool for Multicellular Dosimetry and Bioeffect Modeling The widespread use of 223 Ra-dichloride (Xofigo; Bayer) and. *J Nucl Med*, 63, 1441–1449. <https://doi.org/10.2967/jnumed.121.263253>
- Kelm, J. M., Timmins, N. E., Brown, C. J., Fussenegger, M., & Nielsen, L. K. (2003). Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(2), 173–180. <https://doi.org/10.1002/BIT.10655>
- Kim, W., Gwon, Y., Park, S., Kim, H., & Kim, J. (2023). Therapeutic strategies of three-dimensional stem cell spheroids and organoids for tissue repair and regeneration. *Bioactive Materials*, 19, 50–74. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2022.03.039>
- Kim, Y. S., & Brechbiel, M. W. (2012). An overview of targeted alpha therapy. In *Tumor Biology* (Vol. 33, Issue 3, pp. 573–590). IOS Press BV. <https://doi.org/10.1007/s13277-011-0286-y>
- Klein, C. A. (2020). Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 20, Issue 11, pp. 681–694). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00300-6>
- Koistinen, P., & Heino, J. (2013). *Integrins in Cancer Cell Invasion*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6070/>
- Ku, A., Facca, V. J., Cai, Z., & Reilly, R. M. (2019). *Auger electrons for cancer therapy-a review*. <https://doi.org/10.1186/s41181-019-0075-2>
- Kunz-Schughart, L. A., Freyer, J. P., Hofstaedter, F., & Ebner, R. (2004). The use of 3-D cultures for high-throughput screening: The multicellular spheroid model. *Journal of Biomolecular Screening*, 9(4), 273–285. <https://doi.org/10.1177/1087057104265040>
- Lee, C. H., Akin-Olugbade, O., & Kirschenbaum, A. (2011). Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. In *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* (Vol. 40, Issue 3, pp. 565–575). <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2011.05.012>
- Leek, R., Grimes, D. R., Harris, A. L., & McIntyre, A. (2016). Methods: Using three-dimensional culture (spheroids) as an in vitro model of tumour hypoxia. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 899, 167–196. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26666-4_10
- Lenaerts E., & Coucke P. (2014). *LA PHYSIQUE DES RADIATIONS IONISANTES POUR LES NÉOPHYTES*.

- Leung, B. M., Cai Leshner-Perez, S., Matsuoka, T., Moraes, C., & Takayama, S. (2015). Media additives to promote spheroid circularity and compactness in hanging drop platform †. *Biomaterials Science*, 3, 336. <https://doi.org/10.1039/c4bm00319e>
- Li, A. P., Bode, C., & Sakai, Y. (2004). A novel in vitro system, the integrated discrete multiple organ cell culture (IdMOC) system, for the evaluation of human drug toxicity: comparative cytotoxicity of tamoxifen towards normal human cells from five major organs and MCF-7 adenocarcinoma breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 150(1), 129–136. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2004.09.010>
- Li, W. B., Bouvier-Capely, C., Clarita, ·, Vargas, S., Andersson, M., & Madas, B. (2022). *Heterogeneity of dose distribution in normal tissues in case of radiopharmaceutical therapy with alpha-emitting radionuclides*. 61, 579–596. <https://doi.org/10.1007/s00411-022-01000-5>
- Loke, K. S. H., Padhy, A. K., Ng, D. C. E., Goh, A. S. W., & Divgi, C. (2011). Dosimetric Considerations in Radioimmunotherapy and Systemic Radionuclide Therapies: A Review. *World Journal of Nuclear Medicine*, 10(2), 122. <https://doi.org/10.4103/1450-1147.89780>
- Mansinho, A., Macedo, D., Fernandes, I., & Costa, L. (2018). Castration-resistant prostate cancer: Mechanisms, targets and treatment. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1126, pp. 117–133). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99286-0_7
- Marcu, L., Bezak, E., & Allen, B. J. (2018). Global comparison of targeted alpha vs targeted beta therapy for cancer: In vitro, in vivo and clinical trials. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 123, 7–20. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2018.01.001>
- Marques, I. A., Abrantes, A. M., Pires, A. S., Neves, A. R., Caramelo, F. J., Rodrigues, T., Matafome, P., Tavares-da-Silva, E., Gonçalves, A. C., Pereira, C. C., Teixeira, J. P., Seiça, R., Costa, G., Figueiredo, A., & Botelho, M. F. (2021). Kinetics of radium-223 and its effects on survival, proliferation and DNA damage in lymph-node and bone metastatic prostate cancer cell lines. *International Journal of Radiation Biology*, 97(5), 714–726. <https://doi.org/10.1080/09553002.2021.1906462>
- Marques, I. A. F. (2016). *Rádio-223 no carcinoma da próstata metastático*. <https://estudogeral.uc.pt/handle/10316/36430>
- Marques, I. A., Fernandes, C., Tiago Tavares, N., Pires, A. S., Abrantes, A. M., & Botelho, M. F. (2022). Magnetic-Based Human Tissue 3D Cell Culture: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci*, 2022, 12681. <https://doi.org/10.3390/ijms232012681>
- Mateo, J., Boysen, G., Barbieri, C. E., Bryant, H. E., Castro, E., Nelson, P. S., Olmos, D., Pritchard, C. C., Rubin, M. A., & de Bono, J. S. (2017). DNA Repair in Prostate Cancer: Biology and Clinical Implications [figure presented]. In *European Urology* (Vol. 71, Issue 3, pp. 417–425). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.08.037>
- Mayor de Castro, J., Caño Velasco, J., Aragón Chamizo, J., Andrés Boville, G., & Herranz Amo Carlos Hernández Fernández, F. (2018). *CÁNCER DE PRÓSTATA LOCALMENTE AVANZADO. DEFINICIÓN, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO*.

- McMahon, S. J. (2018). The linear quadratic model: usage, interpretation and challenges. *Physics in Medicine and Biology*, 64(1). <https://doi.org/10.1088/1361-6560/AAF26A>
- Merrick, M., Mimlitz, M. J., Weeder, C., Akhter, H., Bray, A., Walther, A., Nwakama, C., Bamesberger, J., Djam, H., Abid, K., & Ekpenyong, A. (2021). In vitro radiotherapy and chemotherapy alter migration of brain cancer cells before cell death. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 27, 101071. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101071>
- Mohs, R. C., & Greig, N. H. (2017). Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 3(4), 651. <https://doi.org/10.1016/J.TRCI.2017.10.005>
- Morris, M. J., Corey, E., Guise, T. A., Gulley, J. L., Kevin Kelly, W., Quinn, D. I., Scholz, A., & Sgouros, G. (2019). Radium-223 mechanism of action: implications for use in treatment combinations. In *Nature Reviews Urology* (Vol. 16, Issue 12, pp. 745–756). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0251-x>
- Morris, Z. S., Wang, A. Z., & Knox, S. J. (2021). The Radiobiology of Radiopharmaceuticals. In *Seminars in Radiation Oncology* (Vol. 31, Issue 1, pp. 20–27). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2020.07.002>
- Murray, I., & Flux, G. (2021). Applying radiobiology to clinical molecular radiotherapy. In *Nuclear Medicine and Biology* (Vols. 100–101, pp. 1–3). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2021.05.005>
- Namekawa, T., Ikeda, K., Horie-Inoue, K., & Inoue, S. (2019). Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells. *Cells*, 8(1), 74. <https://doi.org/10.3390/cells8010074>
- Natânia de Souza-Araújo, C., Rodrigues Tonetti, C., Cardoso, M. R., Lucci de Angelo Andrade, L. A., Fernandes da Silva, R., Romani Fernandes, L. G., & Guimarães, F. (2020). Three-Dimensional Cell Culture Based on Magnetic Fields to Assemble Low-Grade Ovarian Carcinoma Cell Aggregates Containing Lymphocytes. *Cells* 2020, Vol. 9, Page 635, 9(3), 635. <https://doi.org/10.3390/CELLS9030635>
- Novikov, N. M., Zolotaryova, S. Y., Gautreau, A. M., & Denisov, E. V. (2021). Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. *British Journal of Cancer*, 124, 102–114. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01149-0>
- Nowak, E., Kammerer, S., & Küpper, J. H. (2018). ATP-based cell viability assay is superior to trypan blue exclusion and XTT assay in measuring cytotoxicity of anticancer drugs Taxol and Imatinib, and proteasome inhibitor MG-132 on human hepatoma cell line HepG2. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 69(1–2), 327–336. <https://doi.org/10.3233/CH-189120>

- Nunes, A. S., Barros, A. S., Costa, E. C., Moreira, A. F., & Correia, I. J. (2019). 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(1), 206–226. <https://doi.org/10.1002/bit.26845>
- O'donoghue, J., Zanzonico, P., Humm, J., & Kesner, A. (2022). *Dosimetry in Radiopharmaceutical Therapy*. <https://doi.org/10.2967/jnumed.121.262305>
- O'sullivan, J. M. (2017). *Radium-223 from Bench to Bedside-Future Directions for Targeted Alpha Therapy Satellite Symposium Proceedings Prostate Cancer Radium-223 from Bench to Bedside-Future Directions for Targeted Alpha Therapy*.
- Pandit-Taskar, N., Larson, S. M., & Carrasquillo, J. A. (2014). Bone-Seeking Radiopharmaceuticals for Treatment of Osseous Metastases, Part 1: α Therapy with ^{223}Ra -Dichloride. *Journal of Nuclear Medicine*, 55(2), 268–274. <https://doi.org/10.2967/JNUMED.112.112482>
- Panzetta, V., La Verde, G., Pugliese, M., Artiola, V., Arrichiello, C., Muto, P., La Commara, M., Netti, P. A., & Fusco, S. (2020). Adhesion and Migration Response to Radiation Therapy of Mammary Epithelial and Adenocarcinoma Cells Interacting with Different Stiffness Substrates. *Cancers*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/CANCERS12051170>
- Parker, C., Lewington, V., Shore, N., Kratochwil, C., Levy, M., Lindén, O., Noordzij, W., Park, J., & Saad, F. (2018). Targeted Alpha Therapy, an Emerging Class of Cancer Agents: A Review. In *JAMA Oncology* (Vol. 4, Issue 12, pp. 1765–1772). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.4044>
- Parker, C., Nilsson, S., Heinrich, D., Helle, S. I., O'Sullivan, J. M., Fosså, S. D., Chodacki, A., Wiechno, P., Logue, J., Seke, M., Widmark, A., Johannessen, D. C., Hoskin, P., Bottomley, D., James, N. D., Solberg, A., Syndikus, I., Kliment, J., Wedel, S., ... Sartor, O. (2013). Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 369(3), 213–223. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1213755>
- Paunesku, T., Stevanović, A., Popović, J., & Woloschak, G. E. (2021). Effects of low dose and low dose rate low linear energy transfer radiation on animals—review of recent studies relevant for carcinogenesis. In *International Journal of Radiation Biology* (Vol. 97, Issue 6, pp. 757–768). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1859155>
- Penninckx, S., Pariset, E., Cekanaviciute, E., & Costes, S. V. (2021). Quantification of radiation-induced DNA double strand break repair foci to evaluate and predict biological responses to ionizing radiation. *NAR Cancer*, 3(4). <https://doi.org/10.1093/narcan/zcab046>
- Pereira, V. (2010). *_Biologia da Remodelação Óssea SUMÁRIO: Parte A-Introdução e justificação do Tema*.
- Pernar, C. H., Ebot, E. M., Wilson, K. M., & Mucci, L. A. (2018). The epidemiology of prostate cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(12). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A030361>

- Phelan, K., & May, K. M. (2017). Mammalian Cell Tissue Culture Techniques. *Current Protocols in Molecular Biology*, 117(1). <https://doi.org/10.1002/cpmb.31>
- Piccinini, F. (2015). AnaSP: A software suite for automatic image analysis of multicellular spheroids. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 119(1), 43–52. <https://doi.org/10.1016/J.CMPB.2015.02.006>
- Pinto, C. I. G., Bucar, S., Alves, V., Fonseca, A., Abrunhosa, A. J., da Silva, C. L., Guerreiro, J. F., & Mendes, F. (2020a). Copper-64 Chloride Exhibits Therapeutic Potential in Three-Dimensional Cellular Models of Prostate Cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 609172. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2020.609172/BIBTEX>
- Pinto, C. I. G., Bucar, S., Alves, V., Fonseca, A., Abrunhosa, A. J., da Silva, C. L., Guerreiro, J. F., & Mendes, F. (2020b). Copper-64 Chloride Exhibits Therapeutic Potential in Three-Dimensional Cellular Models of Prostate Cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.609172>
- Polson, A. G., Fuji, R. N., & Polson, A. G. (2012). *The successes and limitations of preclinical studies in predicting the pharmacodynamics and safety of cell-surface-targeted biological agents in patients Correspondence*. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01811.x>
- Pugh, T. J., Nguyen, B.-N., Kanke, J. E., Johnson, J. L., & Hoffman, K. E. (2013). Radiation Therapy Modalities in Prostate Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 11(4), 414–421. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2013.0056>
- Raghavan, S., Mehta, P., Horst, E. N., Ward, M. R., Rowley, K. R., & Mehta, G. (2016). *Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity*. www.impactjournals.com/oncotarget/
- Raitanen, J., Barta, B., Hacker, M., Georg, D., Balber, T., & Mitterhauser, M. (2023). Comparison of Radiation Response between 2D and 3D Cell Culture Models of Different Human Cancer Cell Lines. *Cells*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/CELLS12030360>
- Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E., Gillissen, S., Van der Kwast, T., & Bristow, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>
- Reese, A. C. (2016). Clinical and Pathologic Staging of Prostate Cancer. In *Prostate Cancer: Science and Clinical Practice: Second Edition* (pp. 353–360). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800077-9.00039-6>
- Roeske, J. C., Aydogan, B., Bardies, M., & Humm, J. L. (2008). Small-Scale Dosimetry: Challenges and Future Directions. *Seminars in Nuclear Medicine*, 38(5), 367–383. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2008.05.003>
- Rojas-Calderón, E. L., Ávila, O., & Ferro-Flores, G. (2018). Monte Carlo calculations of the cellular S - values for α -particle-emitting radionuclides incorporated into the nuclei of cancer cells of the

- MDA-MB231, MCF7 and PC3 lines. *Applied Radiation and Isotopes*, 135, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2018.01.007>
- Rolver, M. G., Elingaard-Larsen, L. O., & Pedersen, S. F. (2019). Assessing Cell Viability and Death in 3D Spheroid Cultures of Cancer Cells. *Journal of Visualized Experiments*, 148. <https://doi.org/10.3791/59714>
- Rommerswinkel, N., Niggemann, B., Keil, S., Zänker, K. S., & Dittmar, T. (2014a). Analysis of Cell Migration within a Three-dimensional Collagen Matrix. *J. Vis. Exp*, 92, 51963. <https://doi.org/10.3791/51963>
- Rommerswinkel, N., Niggemann, B., Keil, S., Zänker, K. S., & Dittmar, T. (2014b). Analysis of Cell Migration within a Three-dimensional Collagen Matrix. *J. Vis. Exp*, 92, 51963. <https://doi.org/10.3791/51963>
- Sadremomtaz, A., & Masoumi, M. (2018). Cellular dosimetry of different radionuclides for targeted radionuclide therapy: Monte Carlo simulation. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 4(6), 065006. <https://doi.org/10.1088/2057-1976/aade5d>
- Santivasi, W. L., & Xia, F. (2014). Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 21, Issue 2, pp. 251–259). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5668>
- Sapienza, M. T., & Willegaignon, J. (2019). Radionuclide therapy: current status and prospects for internal dosimetry in individualized therapeutic planning. *Clinics*, 74, e835. <https://doi.org/10.6061/clinics/2019/e835>
- Schatten, H. (2018). Brief overview of prostate cancer statistics, grading, diagnosis and treatment strategies. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1095, pp. 1–14). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95693-0_1
- Schumann, S., Eberlein, U., Muhtadi, R., Lassmann, M., & Scherthan, H. (2018). DNA damage in leukocytes after internal ex-vivo irradiation of blood with the α -emitter Ra-223 OPEN. *Scientific REpoRtS* |, 8, 2286. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20364-7>
- Sciuto, R., Rea, S., Ungania, S., Testa, A., Dini, V., Tabocchini, M. A., Patrono, C., Soriani, A., Palma, V., Marconi, R., & Strigari, L. (2021). The role of dosimetry and biological effects in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) patients treated with 223Ra: first in human study. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 40(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02056-9>
- Segeritz, C. P., & Vallier, L. (2017). Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, 151. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>
- Sekhoacha, M., Riet, K., Motlounge, P., Gumenku, L., Adegoke, A., & Mashele, S. (2022). *molecules Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches*. <https://doi.org/10.3390/molecules27175730>

- Sgouros, G., Bodei, L., McDevitt, M. R., & Nedrow, J. R. (2019). *Radiopharmaceutical therapy in cancer: clinical advances and challenges*. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0073-9>
- Sgouros, G., & Hobbs, R. F. (2014). *Dosimetry for Radiopharmaceutical Therapy*. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2014.03.007>
- Sgouros, G., Roeske, J. C., Mcdevitt, M. R., Palm, S., Allen, B. J., Fisher, D. R., Brill, A. B., Song, H., Howell, R. W., Akabani, G., St, O., Bolch, W. E., Meredith, R. F., Wessels, B. W., & Zanzonico, P. B. (2010). MIRD Pamphlet No. 22 (Abridged): Radiobiology and Dosimetry of α -Particle Emitters for Targeted Radionuclide Therapy* In collaboration with the SNM MIRD Committee: HHS Public Access. *J Nucl Med*, *51*(2), 311–328. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.058651>
- Sharifi, N. (2013). *Mechanisms of Androgen Receptor Activation in Castration-Resistant Prostate Cancer*. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1466>
- Siegel, D. A., Mary, ;, O'neil, E., Richards, T. B., Dowling, N. F., & Weir, H. K. (2020). *Prostate Cancer Incidence and Survival, by Stage and Race/Ethnicity — United States, 2001–2017*. https://www.cdc.gov/mmwr/mmwr_continuingEducation.html
- Silva, C. R. A. (2021). Ra-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático. *Ra-223 No Tratamento Do Carcinoma Da Próstata Metastático*. <https://estudogeral.uc.pt/handle/10316/98076>
- Stoddart, M. J. (2011). Cell viability assays: introduction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *740*, 1–6. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1
- Stuchbery, R., McCoy, P. J., Hovens, C. M., & Corcoran, N. M. (2017). Androgen synthesis in prostate cancer: Do all roads lead to Rome? In *Nature Reviews Urology* (Vol. 14, Issue 1, pp. 49–58). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.221>
- Suhail, Y., Cain, M. P., Vanaja, K., Kurywchak, P. A., Levchenko, A., Kalluri, R., & Kshitiz. (2019). Systems Biology of Cancer Metastasis. In *Cell Systems* (Vol. 9, Issue 2, pp. 109–127). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.07.003>
- Suominen, M. I., Wilson, T., Käkönen, S. M., & Scholz, A. (2019). The mode-of-action of targeted alpha therapy radium-223 as an enabler for novel combinations to treat patients with bone metastasis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20163899>
- Tai, S., Sun, Y., Squires, J. M., Zhang, H., Oh, W. K., Liang, C.-Z., & Huang, J. (2011). PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *The Prostate*, *71*(15), 1668–1679. <https://doi.org/10.1002/pros.21383>
- Tamborino, G., De Saint-Hubert, M., Struelens, L., Seoane, D. C., Ruigrok, E. A. M., Aerts, A., van Cappellen, W. A., de Jong, M., Konijnenberg, M. W., & Nonnekens, J. (2020). Cellular dosimetry of [177Lu]Lu-DOTA-[Tyr3]octreotate radionuclide therapy: the impact of modeling assumptions

- on the correlation with in vitro cytotoxicity. *EJNMMI Physics*, 7(1).
<https://doi.org/10.1186/s40658-020-0276-5>
- Tavares, N. T. F. (2019). *Radium-223 in metastatic prostate cancer: effects on metastasis microenvironment*. <https://ria.ua.pt/handle/10773/26898>
- The Royal Society of Chemistry. (2014). *Visual assessment of spheroid circularity and compactness*. (n.d.).
- Thierry-Chef, I., Cardis, E., Damilakis, J., Frija, G., Hierath, M., & Hoeschen, C. (2022). Medical applications of ionizing radiation and radiation protection for European patients, population and environment. *EPJ Nuclear Sciences & Technologies*, 8, 44. <https://doi.org/10.1051/epjn/2022044>
- Tonnessen, B. H., Pounds, L., Charleston, S. ;, & Antonio, S. (2011). *Radiation physics*. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2010.05.138>
- Tuieng, R. J., Cartmell, S. H., Kirwan, C. C., & Sherratt, M. J. (2021). The effects of ionising and non-ionising electromagnetic radiation on extracellular matrix proteins. In *Cells* (Vol. 10, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10113041>
- Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. In *Cell* (Vol. 147, Issue 2, pp. 275–292). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>
- Vinci, M., Box, C., & Eccles, S. A. (2015). Three-Dimensional (3D) Tumor Spheroid Invasion Assay. *J. Vis. Exp*, 99, 52686. <https://doi.org/10.3791/52686>
- Vinci, M., Box, C., Zimmermann, M., & Eccles, S. A. (2013). Tumor spheroid-based migration assays for evaluation of therapeutic agents. *Methods in Molecular Biology*, 986, 253–266. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-311-4_16
- Vogin, G., & Foray, N. (2013). The law of Bergonié and Tribondeau: A nice formula for a first approximation. *International Journal of Radiation Biology*, 89(1), 2–8. <https://doi.org/10.3109/09553002.2012.717732>
- Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J., & Depinho, R. A. (2018). *Genetics and biology of prostate cancer*. <https://doi.org/10.1101/gad.315739>
- Wang, H., Brown, P. C., Chow, E. C. Y., Ewart, L., Ferguson, S. S., Fitzpatrick, S., Freedman, B. S., Guo, G. L., Hedrich, W., Heyward, S., Hickman, J., Isoherranen, N., Li, A. P., Liu, Q., Mumenthaler, S. M., Polli, J., Proctor, W. R., Ribeiro, A., Wang, J. Y., ... Huang, S. M. (2021). 3D cell culture models: Drug pharmacokinetics, safety assessment, and regulatory consideration. *Clinical and Translational Science*, 14(5), 1659–1680. <https://doi.org/10.1111/CTS.13066>
- Wang, J., Rizvi, S. M. A., Madigan, M. C., Cozzi, P. J., Power, C. A., Qu, C. F., Morgenstern, A., Apostolidis, C., Russell, P. J., Allen, B. J., & Li, Y. (2006). Control of prostate cancer spheroid growth using ²¹³Bi-labeled multiple targeted α radioimmunoconjugates. *The Prostate*, 66(16), 1753–1767. <https://doi.org/10.1002/PROS.20502>

- Weidner, A., Michaely, H., Pelzer, A., Michel, M., Wenz, F., Schoenberg, S., & Dinter, D. (2009). Radiologisch-nuklearmedizinische Bildgebung des Prostatakarzinoms. *Aktuelle Urologie*. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1224730>
- Welsh, J. S. (2006). Beta Radiation. *The Oncologist*, 11(2), 181–183. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-2-181>
- Xing, H., Wang, S., Hu, K., Tao, W., Li, J., Gao, Q., Yang, X., Weng, D., Lu, Y., & Ma, D. (2005). Effect of the cyclin-dependent kinases inhibitor p27 on resistance of ovarian cancer multicellular spheroids to anticancer chemotherapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 131(8), 511–519. <https://doi.org/10.1007/s00432-005-0677-9>
- Yamada, K. M., Collins, J. W., Cruz Walma, D. A., Doyle, A. D., Gonzalez, S., Jiaoyang, M. |, Kazue, L. |, | M., Nazari, S. S., Sekiguchi, R., Shinsato, Y., & Wang, S. (2019). *Extracellular matrix dynamics in cell migration, invasion and tissue morphogenesis*. <https://doi.org/10.1111/iep.12329>
- Yang, J., Nie, J., Ma, X., Wei, Y., Peng, Y., & Wei, X. (2019). Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Molecular Cancer* 2019 18:1, 18(1), 1–28. <https://doi.org/10.1186/S12943-019-0954-X>
- Yuen, K. Y., Shelley, M., Sze, W. M., Wilt, T., & Mason, M. D. (2006). Bisphosphonates for advanced prostate cancer. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Issue 4). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006250>
- Zanoni, M., Cortesi, M., Zamagni, A., Arienti, C., Pignatta, S., & Tesei, A. (2020). *Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids*. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00931-0>
- Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., Santi, S., Polico, R., Bevilacqua, A., & Tesei, A. (2015). *3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained OPEN*. <https://doi.org/10.1038/srep19103>
- Zeigler-Johnson, C. M., Spangler, E., Jalloh, M., Gueye, S. M., Rennert, H., & Rebbeck, T. R. (2008). *Genetic susceptibility to prostate cancer in men of African descent: implications for global disparities in incidence and outcomes*.
- Zhang, H., Zhou, Y., Xing, Z., Sah, R. K., Hu, J., & Hu, H. (2022). Androgen Metabolism and Response in Prostate Cancer Anti-Androgen Therapy Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13521. <https://doi.org/10.3390/ijms232113521>