

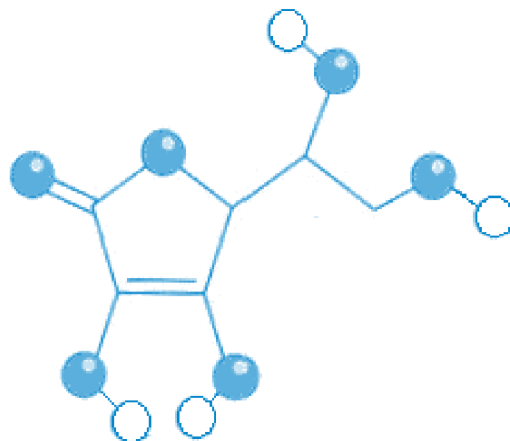


Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Departamento de Física

Vitamina C, cancro e citotoxicidade:

Marcação e estabilidade *in vitro* e *in vivo*



Sónia Dorilde Gomes Tavares

Coimbra
2010

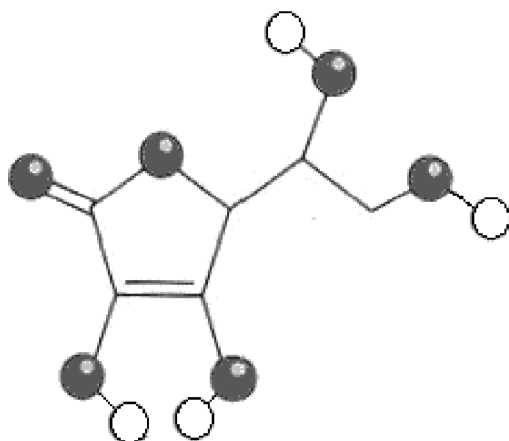


Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Departamento de Física

Vitamina C, cancro e citotoxicidade:

Marcação e estabilidade *in vitro* e *in vivo*



Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho (Universidade de Coimbra).

Sónia Dorilde Gomes Tavares

Coimbra

2010

Agradecimentos

Após a realização dessa dissertação e avaliando as contribuições que muitas pessoas tiveram durante este ano, não podendo deixar de os referir, expresso aqui os meus agradecimentos:

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Directora do Instituto de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela orientação deste projecto, pelo apoio, disponibilidade, dedicação e empenho ao longo do seu desenvolvimento, em especial obrigada pela partilha de conhecimento, experiência científica e pelas críticas e conselhos durante a duração do projecto.

Ao Doutor Paulo Crespo agradeço por ter estado na origem deste projecto tão aliciante e pelas suas palavras de apoio sempre com um toque de motivação.

À Margarida Abrantes, um agradecimento especial, pela co-orientação, dedicação, amizade, paciência em ensinar e pela disponibilidade demonstrada em me ajudar tanto quando precisava de uma co-orientadora ou de uma amiga.

À Catarina Mamede, pela amizade, disponibilidade, pela paciência por me acompanhar durante o tempo da duração do projeto pela ajuda e apoio incondicional na realização deste.

À Mafalda Laranjo e Ana Brito, pela disponibilidade em ajudar sempre que precisava, à Professora Bárbara Oliveira pela disponibilidade em me ajudar na análise estatística dos resultados, aos estagiários de Medicina Nuclear da ESTS do Porto pela ajuda que me deram ao longo do ano, à Cláudia Claridade pela ajuda diária e aos

restantes elementos do serviço da biofísica que de alguma forma terão contribuído para este trabalho.

Agradeço às minhas colegas de casa pelo ambiente saudável que proporcionaram tornando possível a conclusão deste manuscrito.

Aos meus pais, e a minha irmã que sempre me apoiaram mesmo estando longe nunca deixei de sentir o carinho e a preocupação. Obrigada por acreditarem em mim.

Ao meu namorado, Bruno, por me encorajar sempre que apresentei fraquezas, por acreditar em mim e pela paciência que teve nesses últimos dois anos.

Agradeço também a todos os meus colegas de curso por serem verdadeiros companheiros de batalha e pelo apoio e encorajamento que demonstraram ao longo desses sete anos de curso.

Por último agradeço a Deus que me deu saúde, assim como as pessoas que estiveram ligadas a esse projecto, e a todos os meus familiares e amigos

Resumo

A vitamina C é uma substância essencial apresentando inúmeras propriedades fisiológicas. Ela apresenta-se sob duas formas, a reduzida e a oxidada. O ácido ascórbico (AA), a forma reduzida da vitamina C, é um potente antioxidante hidrossolúvel, na medida em que neutraliza os radicais livres, constituindo um potencial mecanismo anticancerígeno. O AA actua também como pró-oxidante, promovendo a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), que comprometem a viabilidade celular. Por outro lado, a maioria das células tumorais não transporta directamente o AA para o seu interior, razão pela qual as células obtêm a vitamina C na sua forma oxidada, o ácido dehidroascórbico (DHA). As células tumorais demonstram ainda outra particularidade, a diminuição da catalase (enzima responsável pela destoxificação do H_2O_2), num factor entre 10 e 100, relativamente às células normais. Assim, o aumento da produção de H_2O_2 , acoplado à deficiência da actividade da catalase nas células neoplásicas e à presença de metais de transição, poderá redundar na citotoxicidade selectiva da vitamina C e na consequente revelação do seu potencial terapêutico.

O objectivo deste trabalho é avaliar o metabolismo da vitamina C e mostrar o efeito citotóxico da forma reduzida, em células de adenocarcinoma colorectal e de melanoma melanocítico, recorrendo a métodos bioquímicos e de imagiologia nuclear.

Primeiramente, efectuou-se a marcação da forma reduzida da vitamina C com tecnécio, de forma a obter um complexo radioactivo ($^{99m}Tc-AA$) passível de ser usado em imagiologia nuclear. Sendo que a sua pureza radioquímica determinada por HPLC.

Posteriormente, realizaram-se estudos *in vitro*, com as linhas celulares de adenocarcinoma colorectal (WiDr) e melanoma melanocítico (A375), que incluíram

estudos de captação com $^{99m}\text{Tc-AA}$, e estudos de avaliação da citotoxicidade da vitamina C. Estes estudos incluíram os estudos de avaliação da proliferação por colorimetria e de sobrevivência por ensaios clonogénicos. Sendo que para estudos de estabilidade por HPLC foram usadas as WiDr, pela avaliação do meio extracelular.

Por último, foram feitos estudos *in vivo*, em que consistiu no desenvolvimento de xenotransplantes de WiDr em ratinhos *Balb/c nu/nu*, que posteriormente foi feito estudos de biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-AA}$. A avaliação do crescimento tumoral em ratinhos *Balb/c nu/nu* portadores de xenotransplantes pelo efeito do AA foi também realizada.

Desta feita, a marcação do AA com $^{99m}\text{Tc-AA}$, foi desenvolvida tendo uma elevada eficiência de marcação, confirmada por HPLC. Os estudos *in vitro* realizados deram resultados que levam a concluir que o AA tem potencial no tratamento do cancro pois, apresenta efeitos anti-proliferativos nas células tumorais, esses resultados foram comprovados nos estudos *in vivo*. Onde se tira também que o complexo $^{99m}\text{Tc-AA}$ apresenta baixa captação tumoral como foi observada nos estudos *in vitro*.

Lista de abreviaturas

A -Selectividade

AA – Ácido Ascórbico

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ATP – Trifosfato de Adenosina

Bq – Becquerel (uma desintegração por segundo - unidade do sistema internacional)

CAT – Catalase

CPM – Contagens por Minuto

CPS – Contagens por Segundo

Da – *Dalton*

DHA – Ácido Dehidroascórbico

DMEM – *Dubelcco's Modified Eagle's Medium*

GLUT – Transportadores de Glicose

GSH – glutationa reductase

HETP - *Height Equivalent to the Theoretical Plate*

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio

KeV – kilo electrões volte

K_m – Constante de *Michaelis*

LEHR – *Low Energy High Resolution*

MTT – [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide]

NADPH - *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*

PBS – *Phosphate Buffer Solution*

R - *Resolução*

RIA - *Radioimunoensaio*

R_f – *Retention Factor*

ROI – *Region of interest*

ROS – *Reactive Oxygen Species*

SOD – *Superoxide Dismutase*

SVCT – *Sodium Vitamin C Cotransporters*

UV - *Ultravioleta*

V – *Volte*

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Lista de abreviaturas	v
Índice Geral	vii
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xi
Índice de Gráficos	xi
Índice de Quadro	xiv
Índice de Equações	xiv
• Capítulo I - Introdução	1
1. Vitamina C	3
1.1. Funções	5
1.1.1. Antioxidante	6
1.1.2. Pró-oxidante	7
1.2. Transporte	8
1.2.1. Difusão Facilitada (GLUTs)	9
1.2.2. Transporte Activo (SVCTs)	10

2.	Stresse Oxidativo.....	13
2.1.	Vitamina C e Cancro	14
3.	Potencial Terapêutico/Citotoxicidade.....	16
4.	Medicina Nuclear	17
4.1.	Radiofármacos	18
4.2.	Controlo de Qualidade.....	20
4.2.1.	HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	21
•	Capítulo II - Materiais e Métodos	27
1.	Estudos de Química.....	29
1.1.	Marcação do AA com tecnécio-99m (^{99m}Tc).....	29
2.	Estudos in Vitro	33
2.1.	Culturas celulares.....	33
2.2.	Estudos de captação.....	34
2.3.	Determinação da viabilidade celular	35
2.4.	Estudos de citotoxicidade	36
2.4.1.	Avaliação da proliferação celular por colorimetria	36
2.4.2.	Avaliação da sobrevivência celular através do ensaio clonogénico	37
2.5.	Estudos de Estabilidade da vitamina C	38
2.5.1.	Avaliação do meio extracelular	39

3.	Estudos in Vivo	40
3.1.	Estudos de biodistribuição em ratinhos normais com $^{99m}\text{Tc-AA}$	41
3.2.	Desenvolvimento de Xenotransplantes.....	42
3.3.	Estudos de biodistribuição em ratinhos com xenotransplantes com $^{99m}\text{Tc-AA}$	42
3.4.	Imagiologia com $^{99m}\text{Tc-AA}$	43
3.5.	Avaliação do crescimento tumoral <i>in vivo</i> após tratamento com AA.....	44
4.	Análise estatística.....	44
•	Capítulo III- Resultados.....	47
1.	Estudos de química	49
1.1.	Preparação e controlo de qualidade do $^{99m}\text{Tc-AA}$	49
2.	Estudos in vitro.....	56
2.1.	Estudos de captação.....	56
2.2.	Estudos de citotoxicidade	58
2.2.1.	Avaliação da proliferação celular por colorimetria	58
2.2.2.	Avaliação da sobrevivência celular por ensaios clonogénicos	61
2.3.	Estudos de estabilidade da vitamina C	62
2.3.1.	Avaliação do meio extracelular	66
3.	Estudos in vivo	71
3.1.	Estudos de Biodistribuição em ratinhos normais com $^{99m}\text{Tc-AA}$	71

3.2.	Estudos de Biodistribuição em ratinhos normais com $^{99m}\text{Tc-AA}$	72
3.3.	Imagiologia com $^{99m}\text{Tc-AA}$	76
3.4.	Avaliação do crescimento tumoral in vivo após tratamento com AA.....	77
•	Capítulo IV – Discussão.....	79
	Conclusão.....	88
	Bibliografia	92

Índice de Figuras

Figura 1 : Blossíntese da vitamina C a partir da glicose. (Adaptado de Schorah <i>et.al.</i> 1973)-----	4
Figura 2: Reacção de oxidação do ácido ascórbico em ácido dehidroascórbico.(Adaptado de(Levine, et al., 1999)-----	4
Figura 3: Esquema do sistema de transporte do DHA através dos GLUT. (Retirado de (Li and Schellhorn, 2007)-----	10
Figura 4: Esquema representativo do sistema de transporte do AA através dos SVCT.(Retirado de(Li and Schellhorn, 2007)-----	11
Figura 5: Esquema ilustrativo de um aparelho do HPLC. 1. Reservatório de solventes 2. Válvulas de abertura 3. Bomba 4. Misturador 5. Válvula interna 6. Injector 7. Pré-coluna 8. Coluna 9. Detectores 10. Estação de aquisição de dados 11. Reservatório de resíduos. A seta azul, representa o sentido da progressão do solvente durante uma análise Adaptado de Meyer, 2004. -----	23
Figura 6: Visualização das colónias formadas. Controlo visualizado no microscópio óptico - A375 (A) e WiDr (C) e o número de colónias formadas após a exposição das células a 2 mM de AA - A375 (B) e WiDr (D). Visualização macroscópica das colónias referentes ao controlo - A375 (E) e WiDr (G) e colónias formadas após exposição das células a 2 mM de AA – A375 (F) e WiDr (H). -----	62

Figura 7: Imagens obtidas através da câmara de raios gama. A - Imagem estática aos 60 minutos após a injeção do $^{99m}\text{Tc-AA}$, de um ratinho com xenotransplante. A seta aponta para a localização do tumor. B - Imagem estática aos 30 minutos após a injeção do $^{99m}\text{Tc-AA}$, de um ratinho normal, onde podem ser vistos os dois rins. Todas as imagens estão referenciadas à mesma escala de cores mostrada. ----- 77

Índice de Tabelas

Tabela 1: Resumo dos tempos de incubação e respectivos tempos de repouso -----	37
Tabela 2: Amostras injectadas no HPLC para o estudos da estabilidade da vitamina C. -----	39
Tabela 3: Amostras injectadas no HPLC na presença de metabolismo celular para avaliar o meio extracelular. -----	40
Tabela 4: Características das imagens dinâmicas e estáticas. -----	43
Tabela 5: Médias das eficiências de marcação de quatro formulações farmacêuticas ao longo do tempo -----	54
Tabela 6: Médias dos tempos de retenção referentes a 3 amostras de AA, DHA e DMEM analisadas por HPLC. -----	63

Índice de Gráficos

Gráfico 1 : Cromatograma da amostra do AA (10mM) injectada no HPLC, sendo o seu tempo de retenção determinado por integração gráfica. -----	49
Gráfico 2: Cromatograma da amostra de FeCl_3 (0,1N) injectada no HPLC, sendo o seu tempo de retenção determinado por integração gráfica. -----	49
Gráfico 3: Cromatograma da amostra do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ injectada no HPLC, sendo o seu tempo de retenção determinado por integração gráfica. -----	49
Gráfico 4: Cromatogramas do controlo de qualidade do <i>Kit</i> , resultante de uma formulação farmacêutica. A – Cromatograma resultante da detecção UV, representando os compostos não radioactivos presentes na formulação. B – Cromatograma resultante da detecção de radioactividade correspondente ao controlo de qualidade do <i>kit</i> aos zero minutos após a marcação observando uma eficiência de marcação igual a 74,16%. C – Cromatograma resultante da detecção de radioactividade correspondente ao controlo de qualidade do <i>kit</i> a 4 horas após a marcação observando uma eficiência de marcação igual a 81,84%. D – Cromatograma resultante da detecção de radioactividade correspondente ao controlo de qualidade do <i>kit</i> as 24 horas após a marcação observando uma eficiência de marcação igual a 90,40%. -----	51

Gráfico 5: Cromatogramas do controlo de qualidade do *Kit*, resultante de uma formulação farmacêutica. A – Cromatograma resultante da detecção UV, representando os compostos não radioactivos presentes na formulação. B – Cromatograma resultante da detecção de radioactividade correspondente ao controlo de qualidade do *kit* aos zero minutos após a marcação observando uma eficiência de marcação igual a 94,24%. C – Cromatograma resultante da detecção de radioactividade correspondente ao controlo de qualidade do *kit* a 4 horas após a marcação observando uma eficiência de marcação igual a 95,80%. D – Cromatograma resultante da detecção de radioactividade correspondente ao controlo de qualidade do *kit* as 24 horas após a marcação observando uma eficiência de marcação igual a 90,91%. -----52

Gráfico 6: Cromatogramas de uma formulação farmacêutica de elevada eficiência de marcação. A – Cromatograma resultante da detecção UV, representando os compostos não radioactivos presentes na formulação. B – Cromatograma resultante da detecção de radioactividade correspondente ao controlo de qualidade do *kit* aos zero minutos após a marcação observando uma eficiência de marcação igual a 99,45%. C – Cromatograma resultante da detecção de radioactividade correspondente ao controlo de qualidade do *kit* a 6 horas após a marcação observando uma eficiência de marcação igual a 99,51%. -53

Gráfico 7: Cromatograma referente aos picos de AA (pico B) e FeCl₃ (pico A) detetados por UV. -----54

Gráfico 8: Captação do ^{99m}Tc-AA e do ^{99m}Tc-livre nas WiDr. As células foram incubadas com a mesma concentração de ^{99m}Tc-AA e do ^{99m}Tc-livre e a captação foi determinada pelos estudos de influxo. Os dados expressam a média de oito experiências independentes -----57

Gráfico 9: Captação do ^{99m}Tc-AA e do ^{99m}Tc-livre nas A375. As células foram incubadas com a mesma concentração de ^{99m}Tc-AA e do ^{99m}Tc-livre e a captação foi determinada pelos estudos de influxo. Os dados expressam a média de oito experiências independentes. -----57

Gráfico 10: Captação do ^{99m}Tc-AA nas WiDr e A375. As duas linhas celulares foram incubadas com a mesma concentração do ^{99m}Tc-AA e a captação foi determinada pelos estudos de influxo. Os dados expressam a média de oito experiências independentes. -----58

Gráfico 11: Curvas de dose-resposta do AA nas WiDr. A – Gráfico representando o efeito do AA com uma e quatro horas de exposição com 24 horas de descanso. B – Gráfico representando o efeito do AA com uma e quatro horas de exposição com 48 horas de descanso. Os resultados expressam a média de seis experiências independentes. -----59

Gráfico 12: Curvas de dose-resposta do AA nas A375. A – Gráfico representando o efeito do AA com uma e quatro horas de exposição com 24 horas de descanso. B – Gráfico representando o efeito do AA com uma e quatro horas de exposição com 48 horas de descanso. Os resultados expressam a média de seis experiências independentes-----60

A avaliação da sobrevivência foi feita a fim de confirmar os efeitos pró-oxidantes da vitamina C em células tumorais. Assim os efeitos que poderão surgir, devido à exposição ao AA, são avaliados depois de um longo período de tempo. O gráfico 13, mostra a relação entre a percentagem de sobrevivência das células e a concentração do AA. Gráfico 13: Relação entre a percentagem do factor de sobrevivência e a

concentração do AA, nas WiDr e A375. As linhas celulares foram tratadas com as concentrações referidas no gráfico. Os resultados são a média de três estudos independentes.-----61

Gráfico 14: Cromatogramas das amostras padrão injectadas no HPLC. A – Amostra do DHA (10 mM). B – Amostra DMEM. C – Amostra do AA (10mM).-----63

Gráfico 15: Cromatogramas de amostras de DMEM com 10 mM de AA. A – Cromatograma correspondente à injeção do DMEM com 24 horas de incubação. B – Cromatograma de DMEM e AA para 1 hora de incubação. C - Cromatograma de DMEM e AA para 24 hora de incubação. D - Cromatograma de DMEM e AA para 48 hora de incubação. E - Cromatograma de DMEM e AA para 72 hora de incubação. F - Cromatograma de DMEM e AA para 96 hora de incubação.-----64

Gráfico 16: Cromatogramas de amostras de DMEM com 10 mM de DHA. A – Cromatograma correspondente à injeção do DMEM com 24 horas de incubação. B – Cromatograma de DMEM e DHA para 1 hora de incubação. C – Cromatograma de DMEM e DHA para 24 hora de incubação. D – Cromatograma de DMEM e AA para 48 hora de incubação. E – Cromatograma de DMEM e DHA para 72 hora de incubação. F – Cromatograma de DMEM e DHA para 96 hora de incubação.-----66

Gráfico 17: Cromatograma de amostras controlo. A – 1 hora de incubação. B – 96 horas de incubação. 67

Gráfico 18: Estudo comparativo para a valiação do meio extracelular após incubação com AA. A WiDr foram tratadas durante 1, 24, 48, 72 e 96 na presença do AA e na ausência (C) com três concentrações referidas no gráfico. Após injeção no HPLC os respectivos tempos de retenção foram comparados bem como as áreas por integração gráfica.-----68

Gráfico 19: Estudo comparativo para a valiação do meio extracelular após incubação com DHA. A WiDr foram tratadas durante 1, 24, 48, 72 e 96 na presença do DHA e na ausência (C) com três concentrações referidas no gráfico. Após injeção no HPLC os respectivos tempos de retenção foram comparados bem como as áreas por integração gráfica.-----68

Gráfico 20: curva de calibração para determinar a linearidade da detecção UV. Foram injectadas cinco amostras de AA com as concentrações apresentados no gráfico. -----69

Gráfico 21: Análise do comportamento do AA e DHA no meio extracelular para concentração de 3 mM. Após integração gráfica dos cromatogramas evidenciados nos gráficos 17, 18 e 19, foi feita a análise comparativa entre as áreas dos picos do AA e DHA ao longo do tempo.-----69

Gráfico 22 : Análise do comportamento do AA e DHA no meio extracelular para concentração de 7 mM. Após integração gráfica dos cromatogramas evidenciados nos gráficos 17, 18 e 19, foi feita a análise comparativa entre as áreas dos picos do AA e DHA ao longo do tempo.-----70

Gráfico 23: Análise do comportamento do AA e DHA no meio extracelular para concentração de 10 mM. Após integração gráfica dos cromatogramas evidenciados nos gráficos 17, 18 e 19, foi feita a análise comparativa entre as áreas dos picos do AA e DHA ao longo do tempo.-----70

Gráfico 24: A - Biodistribuição do ^{99m}Tc-AA. Depois de passados os tempos, descritos nos gráficos, da administração do radiofármaco, os ratinhos foram sacrificados, os órgãos colhidos e a percentagem de dose injectada por grama de tecido quantificada. B - Fracção percentual do gráfico A.-----72

Gráfico 25: A - Biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-AA}$ em ratinhos portadores de xenotransplantes. Depois de passados os tempos, descritos nos gráficos, da administração do radiofármaco, os ratinhos foram sacrificados, os órgãos colhidos e a percentagem de dose injectada por grama de tecido quantificada. B - Fracção percentual do gráfico A -----	73
Gráfico 26: Percentagem da actividade administrada por grama de tecido tumoral. -----	75
Gráfico 27: Razão entre as captações tumor/osso e tumor/sangue. -----	76
Gráfico 28: Resposta <i>in vivo</i> das WiDr ao tratamento com o AA. O resultado é uma média de n=6 para cada grupo. -----	78

Índice de Quadro

Quadro 1: Tempo de retenção das amostras padrão injectadas no HPLC. Os valores referentes às amostras padrão representam a média de três injeções.....	50
Quadro 2: Média dos tempos de retenção (com n=6) referentes à amostras controlo analisadas no HPLC.	67
Quadro 3: Análise da razão entre a captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ em ratinhos <i>Balb/c nu/nu</i> atímicos e normais.	74

Índice de Equações

Equação 1: Dismutação do radical ascorbil.....	7
Equação 2: A e B reação de Fenton.....	7
Equação 3: Reacção de redução de compostos derivados de quinona.....	7
Equação 4: Equação de Michaelis-Menten.....	9
Equação 5: Resolução.....	24
Equação 6: A - Números de pratos teóricos (N). B – Eficiência (HETP).....	24
Equação 7: Selectividade (α).....	24
Equação 8: Equação para a determinação da captação do radiofármaco.....	35
Equação 9: determinação da viabilidade celular.....	35
Equação 10: A - Eficiência da placa. B - Factor de sobrevivência.....	38
Equação 11: Linearidade (retirado de Snyder, 2002).....	40
Equação 12: Percentagem de dose do radiofármaco injectado por grama de órgão.....	42
Equação 13: Cálculo do volume do tumor.....	42

Capítulo I - Introdução

1. Vitamina C

As vitaminas fazem parte de uma classe de nutrientes essenciais para o organismo humano, devido às suas funções em múltiplos processos bioquímicos e fisiológicos. O ascorbato ou ácido ascórbico (AA), mais tarde designado por vitamina C, é um derivado da glicose isolado em 1928 pelo bioquímico e Prémio Nobel *Szent-Gyorgyi*. A biossíntese do ácido ascórbico a partir da glicose decorre principalmente no fígado ou nos rins de vários animais devido à presença do enzima gulonolactona oxidase (GULO) responsável por catalizar o último passo da reacção (figura 1). Os humanos, os primatas e outros animais perderam a capacidade de sintetizar endogenamente o ácido ascórbico devido às inúmeras mutações que levaram a inactivação do gene que codifica o enzima GULO; deste modo é necessário obter a vitamina C a partir da dieta. Uma alimentação deficiente em vitamina C leva ao desenvolvimento do escorbuto, doença caracterizada por afectar a síntese do colagénio, dificuldade em cicatrização das feridas, defeitos na formação dos dentes e na ruptura dos vasos sanguíneos provocando equimoses. Uma dieta rica em frutos e vegetais frescos aumenta a ingestão de vitamina C, prevenindo assim o escorbuto. Aceita-se a designação de ascorbato ou ácido ascórbico (AA) para a vitamina C, sendo esta a forma reduzida, tendo o ácido dehidroascórbico (DHA) como a forma oxidada. Estas duas formas coexistem de igual modo nos alimentos ricos em vitamina C, sendo que a forma reduzida é a fisiologicamente activa. A síntese do DHA a partir do AA é através de uma reacção de oxidação, onde dois electrões são removidos, dando origem primeiramente ao radical ascorbil e de seguida ao ácido dehidroascórbico, essa reacção é mediada pelos enzimas redutases (figura 2) (Fransson and Mani, 2007; Levine, et al., 1999; Verrax and Calderon, 2008).

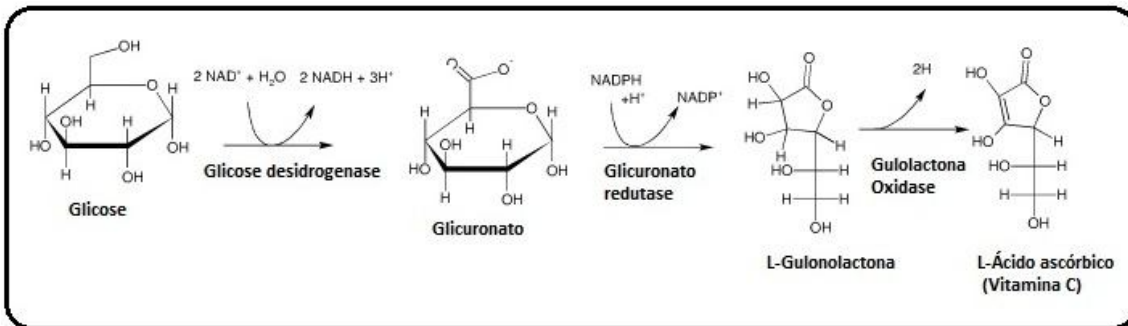


Figura 1 : Biossíntese da vitamina C a partir da glicose. (Adaptado de Schorah *et.al.* 1973)

A absorção da vitamina C, tanto na forma reduzida como na forma oxidada provenientes da dieta, ocorre na mucosa bucal e maioritariamente no estômago e nos intestinos. A primeira absorção, feita na mucosa bucal, é principalmente realizada pela difusão passiva através das cavidades da membrana bucal, sendo que a maior fracção é absorvida no tracto gastrointestinal através da difusão facilitada e transporte activo mediada por transportadores. Após a absorção da vitamina c, esta entra no sangue e é distribuída por outras células e tecidos, sendo que na glândula supra-renal, nos glóbulos brancos, no músculo esquelético e no cérebro (hipófise ou glândula pituitária) são os tecidos onde podemos encontrar maiores concentrações do AA (Wilson, 2005). A quantidade de vitamina C que não é totalmente absorvida pelas células sofre uma reabsorção nos túbulos renais proximais (Li and Schellhorn, 2007).

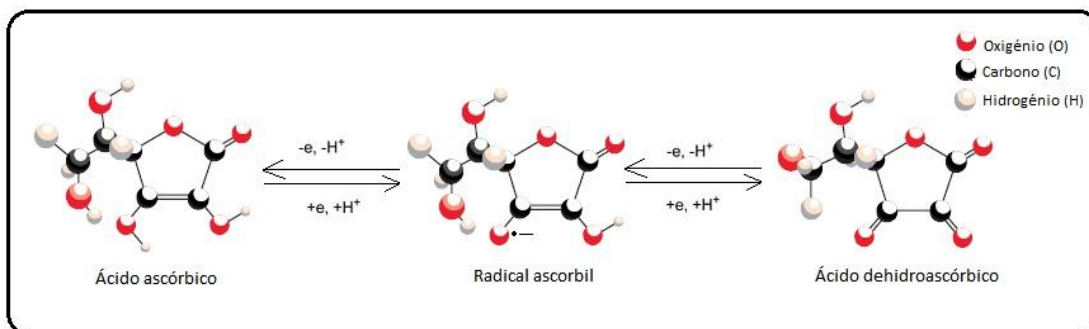


Figura 2: Reacção de oxidação do ácido ascórbico em ácido dehidroascórbico.(Adaptado de(Levine, et al., 1999)

1.1. Funções

Como referido anteriormente a vitamina C desempenha um papel importante em diversos processos fisiológicos. Para além de prevenir o aparecimento do escorbuto é essencial na síntese do tecido conjuntivo mais concretamente do colagénio, de aminoácidos, da carnitina e catecolaminas, também actua como co-enzima no metabolismo da tirosina, do ácido fólico e triptofano e do colesterol, aumentando a sua eliminação do sangue, sem deixar de referir que esta vitamina é um agente redutor devido a sua grande capacidade de doar electrões. Possui a capacidade de doar dois electrões formando o radical ascorbil (A^{\bullet}) sendo que estes electrões são usados em reacções de hidroxilação e na amidação de hormonas peptídicas. Essas funções são conseguidas pela ingestão na dieta de pequenas concentrações da vitamina C (Padayatty, et al., 2003). A vitamina C apresenta um vasto número de funções na prevenção de doenças, pois ela melhora significativamente o sistema imunitário, prevenindo assim o aparecimento de algumas infecções. Também, previne o aparecimento de doenças cardiovasculares, cataratas e mesmo no aparecimento de certos tipos de cancro. O ascorbato tem também um papel de elevada relevância no crescimento de tecidos e nos processos de cicatrização de feridas, na formação de neurotransmissores e no aumento da absorção de ferro ao nível dos intestinos. Como antioxidante tem um papel muito importante nos tecidos, pois protege as células dos efeitos dos radicais livres (Iqbal, 2004).

Hoje em dia com a crescente preocupação na prevenção de doenças como a diabetes, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e cancro, é frequente falar-se das propriedades antioxidantes dos alimentos e muitos estudos estão a ser feitos para relacionar o aparecimento dessas doenças e o consumo regular de frutas e vegetais ricos em antioxidantes. Sendo a vitamina C um potente antioxidante a sua relação com a prevenção destas doenças tem despertado interesse na comunidade científica, apesar do seu mecanismo de acção ser ainda pouco conhecido.

Muitos estudos realizados recentemente indicam outras funções para a vitamina C em células humanas. Essas descobertas apontam para possíveis efeitos benéficos de altas doses de vitamina C aquando do crescimento celular, da transcrição génica e na resistência à infecção (Fransson and Mani, 2007).

1.1.1. Antioxidante

Como antioxidante a vitamina C tem como principal função neutralizar os radicais livres e outros agentes que poderão estar envolvidos no aparecimento de certas doenças. Esta função é conseguida quando concentrações fisiológicas do AA são mantidas a nível tecidual. Os radicais livres são compostos que apresentam electrões desemparelhados podendo ser derivados do oxigénio ou do nitrogénio e que são reduzidos pelo ascorbato. Existem igualmente compostos tóxicos que não possuem electrões desemparelhados e que são reduzidos por esta vitamina, tais como o ácido hipocloroso e outros compostos nitrosantes, bem como produtos de reacções entre radicais livres e outros compostos. É o caso da formação do radical alfa-tocoferol pela reacção dos radicais de oxigénio com o alfa-tocoferol nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL - do inglês *low-density lipoprotein*) onde a vitamina C tem a capacidade de reduzir o radical alfa-tocoferol dando origem ao alfa-tocoferol(Padayatty, et al., 2003).

Por ser hidrossolúvel a vitamina C actua tanto dentro como fora das células doando electrões e levando à redução biológica dos radicais livres como o anião superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (HO^\cdot) e o oxigénio singleto (O_2^{\cdot}), permitindo assim que estes recuperam a sua estabilidade. Sendo o radical ascorbil (A^\cdot) um produto intermediário do processo de redução do AA é relativamente estável e pode dismutar em AA e DHA como representado na equação 1. Este processo contribui para a reciclagem do AA, podendo ter um papel importante pois permite a transferência de equivalentes oxidantes da fase hidrofóbica para a fase aquosa

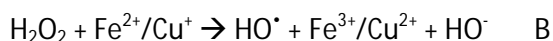
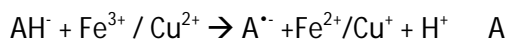
(membrana → citosol), protegendo assim as membranas celulares de radicais livres (Verrax and Calderon, 2008).



Equação 1: Dismutação do radical ascorbil

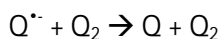
1.1.2. Pró-oxidante

O ácido ascórbico é conhecido principalmente por ser um antioxidante, mas ele também apresenta função de pró-oxidante em concentrações farmacológicas. A actividade pró-oxidante da vitamina C pode ocorrer de duas formas. A primeira é logo quando o AA é oxidado para DHA dentro da célula pela enzima glutathione redutase (GSH), um antioxidante celular. No entanto, durante este processo a glutathione redutase GSH é consumida e é transformada em dissulfeto de GSH, perdendo a sua capacidade antioxidante levando ao aumento dos radicais livres na célula. Outra forma do seu efeito pró-oxidante é através da reacção de Fenton (equação 2 A e B). A vitamina C na presença de metais livres de transição como o ferro e o cobre *in vitro* tem a capacidade de os reduzir levando assim à formação dos iões Fe^{2+} e Cu^+ e A^{\cdot} que interagem com o H_2O_2 produzindo radicais hidroxilo (Engel and Evens, 2006; Verrax and Calderon, 2008).



Equação 2: A e B reacção de Fenton

Acredita-se que *in vitro* a redução dos metais livres de transição pode ser a principal razão do efeito pró-oxidante da vitamina C mas também pode reduzir compostos derivados da quinona (Q) formando radicais que podem ser reoxidados por moléculas de oxigénio através da reacção apresentada pela equação 3.



Equação 3: Reacção de redução de compostos derivados de quinona

As funções da vitamina C são de antioxidante e pró-oxidante e são determinadas principalmente pela concentração local da vitamina, a presença ou ausência de metais de transição e pelo potencial redox da célula.

1.2. Transporte

O fluxo da vitamina C para dentro e fora da célula, não é um processo simples, pois a molécula tem um peso molecular relativamente grande (176,13 Da) e apresenta uma componente polar que dificulta a sua passagem através da membrana celular. Existem dois mecanismos de transportes principais responsáveis em manter a concentração da vitamina C intracelular permitindo assim o seu desempenho como cofactor enzimático e antioxidante. Os mecanismos de transporte são realizados por difusão facilitada através dos transportadores de glicose (GLUTs – específicos para a forma oxidada da vitamina C - DHA), e por transporte activo do ascorbato através dos transportadores de vitamina C dependentes de sódio (SVCT1 e SVCT2 – específicos para a forma reduzida da vitamina C - AA). Estas vias de transporte são reguladas sob condições fisiológicas e alteradas pelo envelhecimento e em caso de doença (Wilson, 2005).

Desconhece-se o mecanismo de transporte do AA para o sangue durante a absorção intestinal e a reabsorção tubular renal. Acredita-se na possibilidade do AA atravessar a membrana basolateral através dos canais iónicos sensíveis a variações de volume, entrando de seguida no plasma sanguíneo através de discontinuidades da parede capilar que poderão existir. Devemos porém notar que nem as proteínas que medeiam esse transporte nem as suas características moleculares são conhecidas.

Para além da dieta, o DHA também é obtido a partir de reacções de oxidação do AA no fluido extracelular, sendo rapidamente transportado para dentro das células através dos GLUTs; no entanto, é facilmente reduzido a AA, sendo este utilizado pela própria célula ou libertado para o fluido extracelular. Este processo é conhecido como reciclagem do DHA. A

conversão intracelular do DHA em AA deve-se ao facto de existirem enzimas reductases, utilizando equivalentes redutores de glutathiona (GSH) ou NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*). Condições patológicas podem afectar os mecanismos da reciclagem do DHA fazendo com que a concentração do AA diminua e, conseqüentemente, afecte as suas funções (Li and Schellhorn, 2007; Wilson, 2002).

Ambos os sistemas de transporte do AA e do DHA estão sujeitos à saturação pelo aumento da concentração dessas moléculas no fluido extracelular, reflectindo assim a afinidade entre o substrato e o enzima, podendo ser modelados pela cinética de *Michaelis-Menten*. A equação de *Michaelis-Menten* (equação 4) descreve a relação quantitativa entre a velocidade inicial v_0 , a velocidade máxima $v_{m\acute{a}x}$, a concentração inicial de substrato $[S]$ e a constante de *Michaelis* K_m .

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Equação 4: Equação de Michaelis-Menten

1.2.1. Difusão Facilitada (GLUTs)

Proteínas específicas medeiam a entrada e a saída do DHA das células por difusão facilitada, sendo esta caracterizada pelo movimento do líquido apenas na direcção de um gradiente químico ou eletroquímico do soluto transportado. Nos intestinos, onde se dá a maior absorção da vitamina C, a *intake* do AA é inibido pela glicose proveniente da dieta o que leva a uma diminuição da entrada dessa forma da vitamina C nos enterócitos; contudo, essa inibição não se verifica para o DHA. Assim, o transporte do AA para o interior das células é feito de forma indirecta, através da oxidação do AA em DHA, em que este é transportado através dos GLUTs e, de seguida, é reduzido dentro da célula a AA. No entanto, o DHA que não é absorvido pelos enterócitos entra no plasma sanguíneo, onde poderá ser absorvido por outras células reduzindo-o a AA, ou ser filtrado nos capilares do glomérulo renal, e de seguida ser reabsorvido através da membrana luminal das células epiteliais que formam os túbulos

renais proximais (Wilson, 2005). Os GLUTs apresentam 14 isoformas, do GLUT1 ao GLUT14, e existem evidências que indicam que apenas 3 dessas isoformas é que apresentam afinidade para transportar o DHA (GLUT1, GLUT3 e GLUT4) (figura 3). Devido ao facto da glicose não inibir a captação do DHA existe uma grande competição entre essas duas moléculas pelos GLUT. Porém, verificam-se diferenças na competição entre as duas moléculas de acordo com o tipo de célula. São exemplo os astrócitos derivados do cérebro onde a captação do DHA (5-200 μ M) é parcialmente inibida pelo aumento da concentração da glicose (10mM). Para além da competição com a glicose, a captação do DHA pode ser afectada em casos de doenças em que afectam o sistema endócrino, pois os GLUTs são fortemente controlados por hormonas (Rivas, et al., 2008; Wilson, 2005).

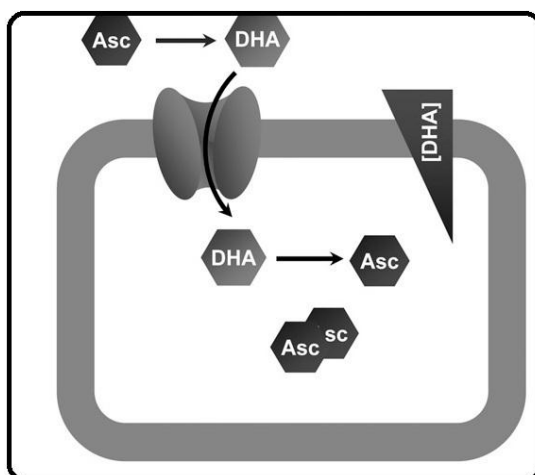


Figura 3: Esquema do sistema de transporte do DHA através dos GLUT. (Retirado de (Li and Schellhorn, 2007)

1.2.2. Transporte Activo (SVCTs)

O transporte activo de um soluto é caracterizado pelo transporte contra o gradiente de concentração com consumo de energia em forma de ATP (Adenosina trifosfato) derivados do metabolismo celular. O AA é a forma activa da vitamina C em pH fisiológico. Existem transportadores capazes de transportar directamente o AA para o interior das células aumentando a sua biodisponibilidade. Os SVCTs são proteínas membranares específicas para o transporte da vitamina C, pois apresentam maior afinidade para o AA do que os GLUTs. O

transporte para dentro das células é feito a favor do gradiente electroquímico do sódio que é mantido pela bomba sódio-potássio, por isso é um transporte secundário (figura 4). O AA é transportado através de duas isoformas dos transportadores dependentes de sódio o SVCT1 e SVCT2, em que para cada dois catiões de sódio entra um anião ascorbato, sendo que o excesso de sódio é excretado para fora da célula pela troca com o potássio. Essas duas isoformas apresentam diferenças nas suas propriedades e expressão em diferentes tipos de células e tecidos (Rivas, et al., 2008). Tem sido demonstrado que o SVCT1 tem maior capacidade de transportar o AA do que a outra isoforma, porém o SVCT2 apresenta uma maior afinidade. Não se sabe se esta diferença é uma característica intrínseca da proteína SVCT1, ou se é por existir mais SVCT1 do que SVCT2 nas membranas plasmáticas das células transportadoras. Para além desta diferença, estas duas isoformas possuem também distribuições e funções distintas: o SVCT1 expressa-se predominantemente nas células epiteliais, nomeadamente no intestino, rim e fígado, e pode transportar quantidades de ascorbato superiores às suas necessidades, enquanto que o SVCT2 poderá estar envolvido na manutenção dos níveis intracelulares de vitamina C para o funcionamento neuronal e protecção contra o stresse oxidativo, e encontra-se presente em células como, células do cérebro, olho e placenta (Wilson, 2005).

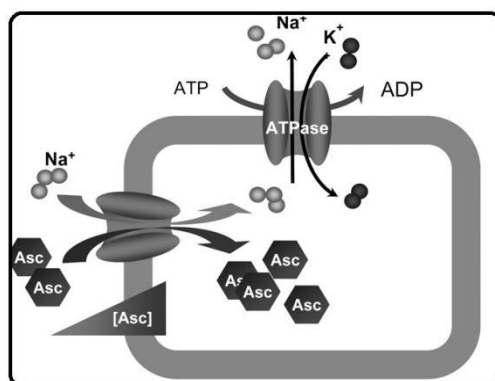


Figura 4: Esquema representativo do sistema de transporte do AA através dos SVCT.(Retirado de(Li and Schellhorn, 2007)

Os SVCTs, tal como os GLUTs são fortemente regulados o que altera a captação do AA e, conseqüentemente, a concentração intracelular do mesmo. Como o transporte do AA depende do fluxo de catiões de sódio, as alterações no potencial da membrana plasmática influenciam a captação do AA sendo que, as despolarizações têm um efeito atenuante pois, as sucessivas variações do potencial membranar levam à alteração no gradiente electroquímico e, conseqüentemente, da energia livre do sistema de transporte. Estas proteínas são também reguladas pela energia cinética envolvida nas variações de concentrações dos substratos. Os SVCT1 e SVCT2 são sensíveis ao aumento da concentração do AA no plasma e dentro da célula, respectivamente, logo há um controlo da concentração plasmática do AA por parte do SVCT1 e um outro na regulação e manutenção da homeostase dentro da célula feita pelo SVCT2. Verifica-se também uma regulação devido as alterações do pH. Todos os mecanismos de activação/inibição do transporte da vitamina C apresentam um papel preponderante no estabelecimento dos níveis fisiológicos normais do AA no organismo, uma vez que à medida que a concentração intracelular do AA aumenta a taxa de transporte do mesmo é atenuada, constituindo assim um obstáculo às estratégias de obtenção de doses elevadas de vitamina C tendo em vista a protecção antioxidante e/ou pró-oxidante para possível uso clínico em tratamento de doenças(Montel-Hagen, et al., 2008; Rivas, et al., 2008).

Resumindo, os GLUTs e os SVCTs que são os principais reguladores dos níveis da vitamina C no organismo, são considerados alvos de estudos para os mecanismos de tratamentos que têm como objectivo atingir níveis elevados de vitamina C intracelulares. Para atingir níveis farmacológicos intracelulares da vitamina C, tem-se comparado as diferentes vias de administração desta, tais como intravenosa (iv) oral (po) e intraperitoneal (ip). verificando-se que a iv é a ideal para aumentar temporariamente a concentração efectiva de vitamina C intracelular a níveis farmacológicos pois ultrapassa a filtração glomerular(Levine, et al., 2009).

2. Stresse Oxidativo

O stresse oxidativo geralmente é definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes. Os radicais livres são compostos que apresentam um ou mais electrões desemparelhados. Destes os derivados do oxigénio, são a classe mais importante dos radicais livres gerados no organismo, sendo estes conhecidos como espécies reactivas de oxigénio (ROS). Estas espécies incluem o radical anião superóxido (O_2^-), o oxigénio singleto (O_2^{\cdot}), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo (OH^{\cdot}), um anião muito reactivo. As ROS têm um importante papel na regulação de vários processos metabólicos na célula pela activação de várias cascatas enzimáticas e de factores de transcrição. Desse processo de activação, diferentes respostas podem ser desencadeadas dependendo do tipo de célula e da concentração celular das ROS, podendo estar envolvida no aparecimento de diversas patologias, como a diabetes tipo II, arteriosclerose, isquémia, doenças cardiovasculares e até mesmo o cancro. (Orrenius, et al., 2007; Schumacker, 2006; Wilson, 2002).

Outro tipo de resposta celular, que está relacionado com a produção de ROS é a regulação da morte celular, uma vez que em pequenas concentrações levam à morte celular por apoptose e em altas por necrose. As ROS são produzidas tanto por fontes exógenas como por endógenas. A maioria das ROS produzidas endogenamente têm origem na respiração mitocondrial (cerca de 1 a 2% do oxigénio consumido pela célula é convertido em radical superóxido), podendo actuar como bioprodutos prejudiciais para as células, bem como moléculas importantes na sinalização intracelular (Schumacker, 2006; Valko, et al., 2006).

As células possuem sistemas de defesas antioxidantes para restaurar o equilíbrio redox, entre as quais se destacam superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase, mas também é de extrema importância a contribuição das defesas antioxidantes exógenas como as vitaminas hidrossolúveis (vitaminas C e E) (Valko, et al., 2007). A sinalização celular é o

mecanismo celular que traduz a resposta ao estímulo externo, induzindo actividades biológicas como a contracção muscular, expressão génica, proliferação celular e até a morte celular. Como referido anteriormente, as ROS produzidas no stresse oxidativo desempenham um importante papel na sinalização celular bem como na regulação da transcrição do sinal. Assim sendo, as ROS podem influenciar positivamente como negativamente o funcionamento normal das células, uma vez que as ROS são naturalmente oxidantes e podem causar danos irreversíveis a nível do ADN, proteínas e alguns lípidos(Valko, et al., 2006).

2.1. Vitamina C e Cancro

As células normais possuem mecanismos de resposta a sinais externos através de sistemas bem regulados com o fim de manter a homeostase celular. Quando essa resposta apresenta defeitos pode levar a alterações genéticas conduzindo progressivamente o tecido normal a um estado alterado levando ao aparecimento de células com crescimento descontrolado, surgindo assim o cancro. Acredita-se que a oncogénese devido aos danos no ADN está relacionada com os danos das espécies reactivas de oxigénio como o H_2O_2 , o $O_2^{\cdot-}$ e o HO^{\cdot} . Deste modo, os antioxidantes aparecem como um potencial nutriente de protecção contra a incidência do cancro, pois ajuda na protecção contra os efeitos dos radicais livres no ADN (Lutsenko, et al., 2002).

O uso das vitaminas antioxidantes na prevenção do cancro é muito controversa mas nos últimos anos teve uma crescente e especial atenção. É sabido que o consumo regular de frutas e vegetais ricos em antioxidantes poderão diminuir o risco do aparecimento do cancro. Contudo, elevadas concentrações destes alimentos inibem o crescimento de várias células tumorais, reduzem a toxicidade nas células normais e melhoram o efeito dos agentes terapêuticos *in vitro* e *in vivo*. Os antioxidantes protegem o organismo da exposição a factores ambientais e a radicais livres, produzidos na respiração mitocondrial. O efeito dos antioxidantes no crescimento, diferenciação e morte das células tumorais tem sido estudado

em modelos de culturas celulares e em modelos animais com tumores. Estudos usando o ácido ascórbico como suplemento para os doentes com tumores malignos começou muito cedo, em que observaram uma melhoria na qualidade de vida em relação ao grupo controlo (Levine, et al., 2009; Levine, et al., 1999; Padayatty, et al., 2006). Paralelamente, estudos in vitro demonstraram que o AA em concentrações farmacológicas actuam como pró-oxidante, pois verificou-se a inibição de proliferação em muitas linhas celulares tumorais diferentes. Acredita-se que esse efeito se deve ao facto do AA se transformar em radical ascorbil (A^{\cdot}) reagindo com o H_2O_2 no espaço extracelular levando a um aumento dos radicais livre e conseqüentemente à morte celular (Albanes, 2009; Chen, et al., 2007b). Contudo, outros estudos in vitro com AA onde avaliaram a actividade antitumoral chegaram a conclusão que quando administrado sozinho esse efeito não se verifica (Hoffer, et al., 2008). Assim, o uso da vitamina C no tratamento do cancro passaria pela combinação desta com outras fármacos antitumorais, pois estudos epidemiológicos comprovaram que essa combinação pode potenciar o efeito citotóxico de certos fármacos, estimulando a apoptose celular e interrupção do ciclo celular. Assim, é possível concluir que a vitamina C pode actuar como um catalizador no tratamento do cancro. Porém, outros estudos demonstraram que para certos fármacos a concentração de vitamina C pode actuar como antioxidante inibindo assim o efeito antitumoral dos fármacos. Com isto pode-se dizer que a vitamina C pode ter um grande potencial no tratamento do cancro com prognóstico reservado e opções terapêuticas limitadas (Chen, et al., 2007b).

No que diz respeito aos mecanismos de acção dos antioxidantes, é sabido que muito ainda há para explorar contudo, existem dados consideráveis que permitem sugerir que determinados antioxidantes, administrados sob circunstâncias controladas, poderão significativamente aliviar os efeitos indesejáveis da quimioterapia e radioterapia e, longe de prejudicar os seus benefícios, poderão mesmo contribuir para a melhoria das mesmas. Cada

vez mais doentes têm usado suplementos nutricionais que incluem antioxidantes em associação com terapias convencionais.

Apesar dos resultados verificados até agora serem promissores, novos conhecimentos sobre a farmacodinâmica da vitamina C precisam ser adquiridos para uma melhor compreensão do modo de acção da vitamina C, tendo em conta a sua regulação, mecanismo de transporte bem como da evidência da sua eficácia terapêutica.

3. Potencial Terapêutico/Citotoxicidade

A selectividade do efeito citotóxico apresentado pela vitamina C em relação às células tumorais é uma das principais características para a sua eficácia terapêutica, pois neste tipo de células a concentração da vitamina não suprime o sistema imunitário, aumentando assim a resistência à infecção.

A vitamina C actua de forma selectiva nas células tumorais, devido à diminuição considerável das enzimas antioxidantes nestas células em relação as células normais; assim, quando expostas à vitamina C há um crescente aumento na produção do H_2O_2 e conseqüente aumento do stresse oxidativo. Por outro lado, na presença de metais de transição e, devido ao aumento da oxidação de AA em DHA, este efeito citotóxico selectivo é reforçado nas células tumorais (Chen, et al., 2007a; Chen, et al., 2009; Rozanova, et al., 2007).

Estudos para comprovar o potencial terapêutico da vitamina C têm seguido duas vertentes: os efeitos de elevadas concentrações de AA no desenvolvimento e progressão de tumores e os mecanismos de acção que poderão contribuir para o seu efeito anticancerígeno.

trabalho abordaremos principalmente a selectividade do AA, tendo em conta que vários estudos *in vitro* demonstraram que concentrações farmacológicas do AA matam preferencialmente as células tumorais e não matam as células normais, sendo esta resposta

dependente do tempo de exposição e da concentração do AA no meio extracelular. Como se sabe nas células tumorais verifica-se uma sobreexpressão dos GLUTs, pelo que a vitamina C será transportada para o interior das células somente pelos GLUTs. Contudo, a morte celular pode estar relacionada com a oxidação do AA em DHA, pois leva à formação de ROS no meio extracelular. Ao contrário do que se pensava, a concentração do AA extracelular tem maior contribuição no efeito antiproliferativo nas células tumorais do que a sua concentração intracelular (Chen, et al., 2007b; Li and Schellhorn, 2007; Zhao, et al., 2005).

No entanto, o mecanismo da citotoxicidade selectiva não está devidamente conhecido, mas acredita-se que pode estar relacionado com diferentes propriedades intrínsecas das células tumorais, como já mencionado, nomeadamente a redução da concentração de enzimas antioxidantes, o aumento da disponibilidade intracelular de metais de transição e uma maior acumulação do DHA dentro da célula devido ao aumento da expressão dos GLUTs (Li and Schellhorn, 2007).

Mais pesquisas são necessárias para compreender melhor os mecanismos de apoptose e vias de morte celular envolvidos na citotoxicidade relacionada com a produção de ROS, bem como, para determinar a melhor combinação de terapias do cancro (Fruehauf and Meyskens, 2007).

4. Medicina Nuclear

A Medicina Nuclear é uma técnica multidisciplinar que utiliza radiofármacos para estudar os processos fisiológicos e diagnosticar de forma não invasiva informações funcionais de diversas doenças. Consoante o tipo de emissores, assim os radiofármacos podem ser usados para fins de diagnóstico, quando os emissores são gama ou de positrões, ou para fins terapêuticos, quando os emissores são partículas beta, de electrões auger ou de partículas alfa. Para a obtenção de informação funcional imagiológica é necessário a administração de

um radiofármaco ao doente e, recorrendo a instrumentação específica para a detecção de radiação emitida, é possível visualizar a sua biodistribuição. A câmara-gama constitui um instrumento que permite detectar e localizar a distribuição de radiofármacos, através da emissão de fótons gama, resultantes do decaimento do radionuclídeo presente no radiofármaco, possibilitando assim obter informação funcional do tecido/órgão alvo. Os radiofármacos desempenham um papel muito importante no estudo e na formulação de novos fármacos e sistemas de distribuição de fármacos, que vão desde a descoberta à sua avaliação *in vitro* e *in vivo* (Perkins, 2002).

As imagens em medicina nuclear fornecem informações funcionais a nível celular e molecular que contribui para a determinação do estado de certas doenças através da medição da captação de radiofármacos no tecido alvo (Zolle, 2007). Neste trabalho a medicina nuclear teve um importante colaboração na formulação e avaliação de um radiofármaco.

4.1. Radiofármacos

Um radiofármaco é um composto radioactivo utilizado em medicina nuclear para diagnóstico e terapia em diversas patologias. Normalmente os radiofármacos usados para diagnóstico não têm efeito fisiológico, pois são administrados em pequenas quantidades. Esses compostos podem ser constituídos somente por um radionuclídeo, ou fármacos ligados quimicamente a um radionuclídeo. Os radiofármacos podem ser divididos em duas classes principais: aqueles cuja biodistribuição é determinada exclusivamente pelas suas propriedades físicas e químicas e aqueles cuja distribuição final é determinada pela sua ligação ao receptor ou outras interações biológicas. Esta última classe é conhecida como radiofármacos alvo-específicos (Liu and Edwards, 1999).

A escolha de um radionuclídeo para o desenvolvimento de um radiofármaco para a aplicação em diagnóstico ou terapia em medicina nuclear depende principalmente das suas características físicas, nomeadamente o tipo de emissão nuclear, do seu período de semi-

desintegração (tempo necessário para reduzir a metade a actividade inicial), sendo este suficiente para preparar, administrar ao doente e adquirir a imagem, e a energia das partículas, pois essa energia deve situar entre 80 e 300 keV (Saha, 2003).

Actualmente, cerca de 90% dos radiofármacos utilizados para diagnóstico na medicina nuclear usa como radionuclídeo o tecnécio-99m (^{99m}Tc), pois este apresenta um período de semi-desintegração (6 horas) curto o suficiente para reduzir o tempo da duração do exame bem como a irradiação ao doente, sem deixar de referir que a energia dos raios gama emitidos pelo ^{99m}Tc é adequada para a detecção pela câmara gamma (140keV). O tecnécio é um metal de transição pertencente ao grupo VIIB, tendo 43 como número atómico, existindo em 9 estados de oxidação (1- a 7+), sendo que os estados 4+ e 7+ são os mais estáveis em solução aquosa. Um composto radiofarmacêutico marcado com ^{99m}Tc tem uma particularidade que pode ser vista como uma vantagem, pois podem ser produzidos *in loco*, numa radiofarmácia. Esse processo consiste na adição de ^{99m}Tc -pertechnetato de sódio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$) eluído de um gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ a um *kit* frio com uma mistura farmacológica (Stapleton, et al., 1967). O ^{99m}Tc -pertechnetato de sódio depois de eluído encontra-se com o estado de oxidação 7+, sendo que é necessário que haja uma redução deste para que haja a marcação com um ligando, por isso é sempre utilizado um agente redutor na formulação radiofarmacêutica. Numa típica preparação de um radiofármaco com ^{99m}Tc existe sempre a possibilidade de conter impurezas químicas recorrentes do processo de marcação, assim sendo a presença do oxigénio pode diminuir a quantidade do agente redutor, pela oxidação através do O_2 , perdendo assim a capacidade de reduzir o $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Assim o aumento do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ no *kit*, aparece como uma impureza química. Outra impureza que normalmente está presente numa marcação com o ^{99m}Tc é a sua forma reduzida e hidrolizada ($^{99m}\text{Tc-RH}$), que numa solução aquosa, o tecnécio reduzido reage com a água formando várias espécies hidrolizadas (Liu and Edwards, 1999).

Por isso, é necessário o desenvolvimento de metodologias para determinar o controlo da qualidade de radiofármacos que usam o tecnécio para a avaliação a sua pureza radioquímica, ou seja, avaliar a relação entre o radionuclídeo presente na preparação e a espécie na forma química desejada.

4.2. Controlo de Qualidade

O processo do controlo de qualidade para os radiofármacos é necessário para garantir que o produto cumpre todos os requisitos e especificações estabelecidas para a administração em humanos. Os procedimentos de controlo de qualidade deve ser levado a cabo em todas as matérias-prima utilizadas na produção bem como no produto acabado. Esses processos envolvem vários testes e medidas que asseguram a pureza, integridade, a segurança biológica e a eficiência de marcação do radiofármaco. Contudo, um radiofármaco em que se usa um radionuclídeo de período de semi-desintegração curto, como é o caso do ^{99m}Tc , é necessário a formulação de um método rápido e eficiente de controlo de qualidade que possa ser feito *in-house*. Os testes de controlo de qualidade estão divididos em duas categorias: testes físico-químicos e testes biológicos. O conjunto de testes que avaliam o estado físico-químico do radiofármaco pretendem avaliar a pureza radioquímica e radionuclídica, determinar o pH e a força iónica, a osmolaridade e o estado físico da amostra.

A pureza radioquímica pode ser definida como a fracção de radioactividade presente na forma química pretendida em relação à radioactividade total. Como já referido, as impurezas químicas presentes numa formulação radiofarmacêutica onde se usa o ^{99m}Tc , podem resultar de reacções químicas entre os compostos usados, o que permite usar vários métodos para avaliar a presença dessas impurezas. Assim, têm sido desenvolvidos diferentes métodos tais como a cromatografia em papel, a cromatografia por gel, a electroforese em papel ou em gel de poliacrilamida, troca iónica, extração por solvente, e destilação, assim como, a técnica de *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) a qual tem sido usada

com muita frequência no processo de controlo de qualidade em radiofármacos usando ^{99m}Tc . Esta técnica será explicada com mais detalhe na sessão seguinte (Liu and Edwards, 1999).

4.2.1. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

O princípio geral do funcionamento do HPLC é o mesmo das cromatografias de camada fina e cromatografia de coluna convencional, sendo que a principal diferença está nas dimensões da coluna e do material de empacotamento desta, onde as amostras são forçadas a passar pelas bombas eléctricas que forçam a passagem do solvente sob elevadas pressões (cerca de 600 psi ou 400 bar). Neste trabalho escolheu-se o HPLC, pois ele apresenta vantagens em relação as outras técnicas de separação cromatográfica, pois a separação feita no HPLC apresenta uma melhor resolução, melhor sensibilidade, reproductividade e altas velocidades de separação.

Um método cromatográfico consiste na separação analítica de diferentes componentes constituintes numa amostra, em que estes interagem com uma fase móvel (solvente) e uma fase estacionária (coluna) através de forças intermoleculares, sendo que a separação é feita tendo em conta a afinidade que cada composto tem com a coluna ou com o solvente. Assim, a coluna retém os componentes que interagem mais fortemente com esta, enquanto que aqueles que possuem menor afinidade química são arrastados pelo solvente. Contudo, para que o processo se desenvolva é essencial que o solvente apresente características específicas. Assim sendo, é imprescindível que a fase móvel dissolva a amostra sem que ocorram quaisquer interacções químicas entre elas, também deve ter um elevado grau de pureza (para que se possam fazer análises de elevada sensibilidade), e que seja compatível com o detector utilizado e que possua polaridade adequada para a separação dos componentes da amostra.

Existem diferentes tipos de HPLC, através da combinação de diferentes solventes e de material de empacotamento da coluna, de modo a uma melhor separação de diferentes compostos, tendo em conta as características como a solubilidade da amostra em relação a

fases móveis específicas. Deste modo existem, a cromatografia de fase normal, de fase reversa e troca iónica. É de referir que todos eles estão orientados na optimização do método de separação clássica pelo aumento da resolução e velocidade e diminuição do tempo de análise (Li and Franke, 2009).

Entre esses tipos de HPLC, usamos o de fase reversa, pois apresenta vantagens inerentes à sua capacidade em discriminar compostos de baixo peso molecular com características muito semelhantes. Este método consiste em usar uma fase estacionária não polar e fases móveis hidro-orgânicas (polares). Assim, a retenção dos componentes químicos da amostra é devido à sua hidrofobia, devido às forças dispersivas – interações de Van der Waals. As fases estacionárias que geralmente são usadas no HPLC de fase reversa são constituídas por micropartículas porosas de sílica ligadas quimicamente a cadeias alquílicas hidrofóbicas (-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), sendo as mais usadas as C4, C8 e C18. As fases móveis que são combinadas com essas colunas favorece a separação e são constituídas principalmente por água, sendo que diferentes concentrações de solventes orgânicos são adicionados, estes solventes têm de ser miscíveis, normalmente os solventes orgânicos mais usados são o metanol e o acetonitrilo (Kazakevich, 2007, Saha, 2003).

Após a separação dos diferentes componentes de uma amostra é necessário fazer a sua detecção, a qual pode ser realizada por espectrofotometria, electroquímica, fluorescência, espectrofotometria de massa, detecção de eventos por cintilação, entre outros. A escolha do tipo de detector que se usa no HPLC, não tem uma tendência específica, pois nenhum detector possui propriedades que o tornem ideais, por isso, podemos dizer que não há detectores universais. A escolha deste, depende do tipo de detecção pretendida para uma certa separação. Na análise de radiofármacos, tanto o monitor ultravioleta (UV) como o detector de radiação são frequentemente usados para medir a concentração dos diferentes componentes da amostra. O monitor UV mede a absorvância de luz do eluato, a qual é proporcional à concentração do soluto presente no mesmo. O detector de radiação é usado

para medir a concentração dos componentes radioactivos no eluato. A maioria dos detectores de radioactividade possui cristais cintiladores entre dois fotomultiplicadores de elevada eficiência de contagem. Os sinais medidos por estes são amplificados e, posteriormente, quantificados. Esta quantificação é efectuada por um processo de integração gráfica das detecções, por cintilação, obtidas (cromatograma). O cromatograma é obtido pela relação entre o valor real da detecção da substância e o seu tempo de retenção. Por sua vez, o tempo de retenção é o tempo que o composto leva a percorrer a distância desde a coluna até ao detector, o qual se inicia no momento em que a amostra é injectada e termina no instante em que a altura do pico, referente a este composto, é máxima. O cromatograma é obtido em contagens por segundo (CPS) em função do tempo (min) e em milivoltes (mV) em função do tempo (min) para a detecção por radioactividade e UV, respectivamente. Na figura 5 é possível verificar esquematicamente os diferentes constituintes de um aparelho do HPLC (Clark and Mama, 1989).

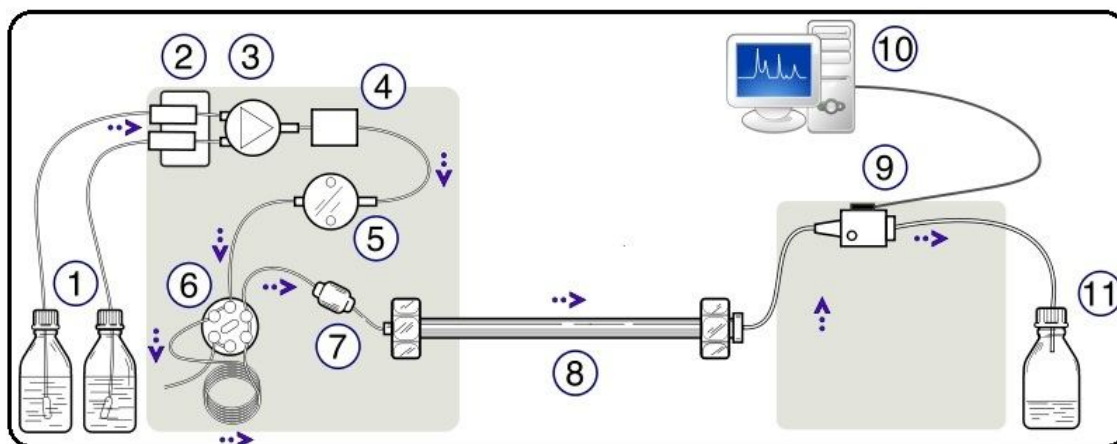


Figura 5: Esquema ilustrativo de um aparelho do HPLC. 1. Reservatório de solventes 2. Válvulas de abertura 3. Bomba 4. Misturador 5. Válvula interna 6. Injetor 7. Pré-coluna 8. Coluna 9. Detectores 10. Estação de aquisição de dados 11. Reservatório de resíduos. A seta azul, representa o sentido da progressão do solvente durante uma análise Adaptado de Meyer, 2004.

Antes de qualquer análise no HPLC temos de ter a certeza que o método funciona e que o equipamento se encontra em perfeitas condições para o desenvolvimento da mesma. Para isso temos à disposição vários parâmetros para avaliar a integridade do equipamento. Além disso, nesse trabalho o HPLC foi usado não só para a realização da separação analítica

como também para a quantificação analítica, logo é necessário determinar parâmetros como a resolução da coluna, a sua eficiência e selectividade. Outras características ligadas à separação e ao equipamento também devem ser conhecidas, como a linearidade, a exactidão e a precisão.

Tendo essas considerações em conta passo a definir esses parâmetros:

- a) *Resolução (R)* – a resolução entre dois picos adjacentes é definido pela a relação entre a distância entre os máximos dos picos, ou seja distância entre os tempos de retenção, tr , e a média aritmética das duas larguras do pico, w . O cálculo de R é obtido através da equação 5 (Snyder, 2002):

$$R = 2 \frac{tr_1 - tr_2}{w_1 + w_2}$$

Equação 5: Resolução

- a) *Eficiência (HETP- Height Equivalent to the Theoretical Plate)* – é a medida que nos dá o grau de dispersão do pico numa determinada coluna. Surge a partir da Teoria de Pratos da coluna e é expressa pela razão entre o comprimento da coluna (L) e o número de pratos teóricos (N) desta, assim como mostra a equação 6 B. Tendo tr como o tempo de retenção do pico e w a largura do pico (Meyer, 2004).

$$\mathbf{b) \quad N = 16 \left(\frac{tr}{w} \right)^2 \quad (A) \quad HETP = \frac{L}{N} \quad (B)}$$

Equação 6: A - Números de pratos teóricos (N). B – Eficiência (HETP)

- b) *Selectividade (α)* – é a capacidade que o sistema tem em discriminar analitos diferentes com características muito semelhantes. É definido como a relação entre os tempos de retenção dos dois picos (equação 7).

$$\alpha = \frac{tr_2}{tr_1}$$

Equação 7: Selectividade (α)

- c) *Linearidade* – a linearidade é a medida que transmite o quão bem a curva de calibração da concentração *versus* resposta se aproxima de uma linha recta, ou quão bem os dados se ajustam a uma equação linear do tipo: $y=mx+b$, onde o **y** é a resposta, o **x** a concentração, o **m** o declive e o **b** a linha de intersecção com da recta de ajustes.

- d) *Exactidão* – refere-se a reprodutibilidade que se verifica quando uma amostra homogénea é medida muitas vezes. Essas medidas podem ser feitas em dias diferentes como no mesmo dia.
- e) *Precisão* – é definida como a proximidade que os valores de uma medição possuem relativamente a um “valor verdadeiro”. Esse valor pode ser determinado por várias técnicas, como a calibração, de modo a minimizar as fontes de erros (Snyder, 2002).

Sendo assim, fica claro que a ideia de usar a vitamina C como um agente antitumoral não é recente e que cada vez mais estudos nesse sentido estão a ser feitos e recorrendo a novas técnicas de diagnóstico para perceber os mecanismos que até agora eram desconhecidos. A avaliação da citotoxicidade da vitamina C em células tumorais, tem revelado resultados promissores, mas é necessário a conjugação de outras técnicas para ajudar no esclarecimento das potencialidades que a vitamina C apresenta para a oncologia.

Assim, este trabalho tem como objectivo estabelecer a conjugação de métodos biológicos e da medicina nuclear, para avaliar a citotoxicidade e a estabilidade *in vitro* e *in vivo* desta vitamina.

Capítulo II - Materiais e Métodos

Desde muito cedo que o interesse em estudar as propriedades da vitamina C tem despertado interesse junto da comunidade científica. Como muito ainda está por descobrir é necessário o desenvolvimento de novas técnicas para o estudo desta molécula.

Neste trabalho, pretende-se avaliar a citotoxicidade da forma reduzida (AA) da vitamina C em dois tipos de linhas celulares diferentes, uma de adeno carcinoma colorectal (WiDr, ATCC) e outra de melanoma melanocítico (A 375, ATCC) bem como a sua estabilidade em culturas celulares. Foi também desenvolvida uma formulação farmacêutica através da marcação radioactiva do AA com ^{99m}Tc , sendo que a sua estabilidade foi avaliada através de estudos *in vitro* e *in vivo*.

1. Estudos de Química

1.1. Marcação do AA com tecnécio-99m (^{99m}Tc)

A formulação farmacêutica para a preparação do $^{99m}\text{Tc-AA}$, consiste em adicionar ao ^{99m}Tc -pertechnetato de sódio um agente redutor, pois o estado de oxidação do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ tem de ser reduzido do seu estado de oxidação (7+), para se poder complexar com o ligando.

Numa primeira fase, começou-se por usar uma actividade de 222 MBq de pertechnetato de sódio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$), num volume de 3 mL, seguidamente acrescentou-se 0,2 mL do agente redutor, FeCl_3 0,1 N (em HCl 0,1 N). Num frasco contendo 200 mg de ácido ascórbico (A5960, SIGMA), que foi previamente argonado e encapsulado acrescentou-se a solução inicialmente obtida, estando o frasco a 0°C e protegido da luz. Após uma leve agitação, o pH foi levado a 6,5 - 7 pela adição de 1,2 mL de NaOH 1 M. A confirmação do pH foi verificada pelo método de comparação de cores (pH-Fix 4,5-10,0, Macherey-Nagel). A marcação foi feita a 0°C e o *kit* foi mantido assim durante 3 horas.

1.2. Optimização da Marcação

Com o objectivo de alcançar sempre a melhor eficiência de marcação e estabilidade do kit, procedeu-se ao processo de optimização da marcação. A optimização da marcação do AA com o ^{99m}Tc , foi conseguida após a variação do volume do $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ e da temperatura de marcação. No método optimizado de marcação foi utilizada uma actividade de 222 MBq de $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ em 1,5 mL, usando o mesmo agente redutor (0,2 mL de FeCl_3). Todo o processo de marcação foi feito nas mesmas condições relativamente à anterior, excepto no facto do kit ser mantido à temperatura ambiente.

Este processo, permitiu que a actividade volúmica do *kit* ficasse mais concentrada, uma vez que diminuámos o volume total final, e pelo facto de não deixarmos o *kit* no gelo durante 3 horas a eficiência de marcação observada desde dos 0 minutos após a marcação até 24 horas manteve-se sempre superior aos 90%.

1.3. Controlo de Qualidade – Determinação da pureza radioquímica

Posteriormente ao processo de marcação da forma reduzida da vitamina C (AA), foi realizado o controlo de qualidade com o objectivo de determinar a pureza radioquímica do complexo. A pureza radioquímica de um radiofármaco é a fracção da radioactividade na forma química desejada em relação à radioactividade total. Numa marcação usando o tecnécio como radioisótopo as impurezas mais comuns de se encontrar são o tecnécio livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) e o tecnécio reduzido hidrolizado ($^{99m}\text{Tc-RH}$). A presença destes compostos na solução do radiofármaco resulta na diminuição da qualidade das imagens devido à diferente biodistribuição das impurezas radioquímicas em relação ao complexo marcado, donde resulta uma elevada actividade no sangue e nos tecidos, que constitui a actividade de fundo, revertendo assim num aumento da dosimetria para o doente. A pureza radioquímica foi

determinada recorrendo ao método cromatográfico de alta sensibilidade e resolução o HPLC – High Performance Liquid Chromatography .HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

Desta forma, tornou-se possível separar os vários componentes do radiofármaco preparado: o AA e o FeCl_3 por detecção UV e o $^{99\text{m}}\text{Tc-AA}$, e o $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ por detecção de radioactividade, sendo que o $^{99\text{m}}\text{Tc-RH}$ por ser colóide não passa para a coluna já que fica retido na pré-coluna do equipamento do HPLC e, conseqüentemente, não é detectado. Para a análise no HPLC foi utilizado um equipamento Gilson composto por UV/VIS-151 Detector, 321-PUMP e 506-C System Interface. A definição dos métodos de corrida e o processamento dos resultados foi realizado recorrendo ao software Gina-Star, cuja base de dados armazena automaticamente todos os dados obtidos.

O método de HPLC para o controlo de qualidade do $^{99\text{m}}\text{Tc-AA}$ foi desenvolvido usando como fase estacionária uma coluna Nucleosil com pré-coluna (Hichrom, NC-100-5C18-250AF), como fase móvel uma solução de KH_2PO_4 (0.025 M, pH 3) e metanol na proporção de 96/4 (v/v) e o fluxo constante de 1 mL/minuto. A detecção UV foi efectuada com o comprimento de onda de 210 nm.

Primeiramente, realizou-se uma lavagem da coluna em que se usou a fase móvel específica para a coluna C18 Nucleosil (Hichrom, NC-100-5C18-250AF) que consiste numa solução de metanol e água, numa proporção de 90/10 (v/v), durante 30 minutos com um fluxo constante de 1 mL/minuto e comprimento de onda de 254 nm. De seguida fez-se uma passagem pelo sistema durante 30 minutos com a solução a utilizar para realizar o controlo de qualidade nas mesmas condições usadas para o controlo de qualidade, mas sem a injeção de qualquer amostra. Esta passagem serve unicamente para estabilização do equipamento, nomeadamente, dos detectores UV e de radioactividade. Após estabilização, são injectados 25 μL de uma solução correspondente ao gradiente da fase móvel, para confirmar o desempenho do sistema e determinar o tempo morto do equipamento (t_0).

Aos 0, 30, 60, 90 minutos, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas, após a preparação do complexo $^{99m}\text{Tc-AA}$, foram retirados 25 μL do mesmo e transferida utilizando uma seringa apropriada (Hamilton) e injectada no loop, iniciando-se o método anteriormente descrito. Cada passagem tem a duração de 30 minutos. Obtiveram-se também cromatogramas de amostras padrão de $^{99m}\text{Tc-O4-}$, AA e FeCl_3 , para tornar possível a interpretação dos cromatogramas obtidos no controlo de qualidade do $^{99m}\text{Tc-AA}$ e o cálculo da eficiência de marcação.

Após a obtenção dos cromatogramas desejados efectuou-se uma outra passagem que constitui um método de lavagem, nas mesmas condições da primeira lavagem.

A quantificação dos componentes presentes no radiofármaco foi feita pela integração gráfica do cromatograma. A integração gráfica foi feita desenhando ROIs (regiões de interesse) do tipo BB, com o intuito de minimizar o erro resultante da proximidade dos diferentes componentes do *kit*. As ROIs do tipo BB são desenhadas quando os extremos do pico coincidem com a linha basal. Desta forma, obtiveram-se as áreas sob a curva que correspondentes à quantidade de radioactividade total de cada composto. Foi feita a avaliação das respectivas quantidades percentuais em função da radioactividade total detectada. A pureza radioquímica do radiofármaco preparado ($^{99m}\text{Tc-AA}$) traduz-se na equação 8. A percentagem definida nessa equação traduz a eficiência de marcação definindo assim a percentagem da actividade medida do composto marcado em relação à actividade das impurezas químicas presentes na formulação.

$$(\%^{99m}\text{Tc-AA})=100-(\%^{99m}\text{TcO}_4^- + \%^{99m}\text{Tc-RH})$$

Equação 8: Pureza radioquímica

Tendo em conta que a fracção da actividade do $^{99m}\text{Tc-RH}$ não é determinada no HPLC, na equação acima a % de $^{99m}\text{Tc-RH}$ será considerado como valor nulo.

Sendo o HPLC uma técnica baseada na separação de diferentes componentes de uma amostra é essencial que a separação seja feita da melhor forma possível para que a distinção desses componentes seja feita de uma forma mais credível. Para isso procedeu-se ao cálculo da resolução da coluna usada neste equipamento, bem como da sua eficiência e selectividade. Para tal, através de uma análise as amostras não radioactivas presentes no *kit*, o AA e o FeCl₃ procedeu-se a análise gráfica de um cromatograma, obtido pela detecção UV. Outros parâmetros para avaliar o bom funcionamento do equipamento foram determinados e vão ser apresentados mais a frente neste capítulo.

2. Estudos in Vitro

2.1. Culturas celulares

As linhas celulares, adenocarcinoma colorectal (WiDr) e melanoma (A375,) obtidas na American Type Culture Collection (ATCC), foram descongeladas e ampliadas em cultura em monocamada a 37 ° C, com 5% de CO₂ (incubadora Heracell 150) utilizando, para ambas as linhas celulares, o meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma D-5648) suplementado com 100 µM de piruvato de sódio (Gibco – 11360), 4,5 g/L de glicose, L-glutamina (2mM), 10% de soro bovino fetal (Gibco 2010-09) e 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 10 g/mL estreptomicina: Gibco 15140-122).

As duas linhas celulares foram usadas para compreender o comportamento in vitro das duas formas da vitamina C (AA e DHA). Foram realizados estudos de captação com ^{99m}Tc-AA, estudos de citotoxicidade da forma reduzida utilizado o método do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide] e avaliação da sobrevivência celular através dos ensaios clonogénicos, para as duas linhas celulares. Estudos de estabilidade das duas formas da vitamina C foram realizados por HPLC e estudos in vivo, usando a linha celular WiDr.

É de referir que todo o material de manipulação das culturas celulares foi devidamente e previamente esterilizado. Da mesma forma que todos os procedimentos foram efectuados nas condições de esterilização e assepsia necessárias.

2.2. Estudos de captação

Para a realização dos estudos de captação as células, ambas as linhas celulares foram incubadas com 3 mL de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco 25200) durante três minutos, para ocorrer a desagregação celular. Seguidamente, e para inactivar a tripsina, foram adicionados à suspensão celular cerca de 8 mL de DMEM, a qual foi posteriormente centrifugada a 1000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos (Heraeus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18,7 cm). As células foram então ressuspensas em meio de cultura, para obtenção de uma suspensão celular com a concentração de 2×10^6 células/mL. Com o intuito de recuperarem do stresse causado pela acção enzimática da tripsina, foram deixadas a repousar durante 60 minutos, em dois frascos de 25 cm², à temperatura de 37 °C e numa atmosfera contendo 5% de CO₂.

Após a preparação da suspensão celular foi adicionado um volume de ^{99m}Tc-AA a cada um dos frascos, de forma a obter uma concentração de cerca de 0,925 MBq/mL do radiofármaco. Tubos de *ependorf* contendo 500 µL de uma solução de tampão fosfato (Phosphate Buffer Solution – PBS – 0,5 mg/mL ajustado a pH 7,4), foram previamente colocados no gelo para que, ao colocar as amostras da suspensão, o metabolismo celular seja reduzido. Passados 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a adição do radiofármaco, retiraram-se três amostras de 200 µL da suspensão presente nos frascos. Para permitir a separação do *pellet* e do sobrenadante centrifugaram-se as amostras a 10000 rpm durante 60 segundos. O sobrenadante foi então transferido para um tubo RIA identificado. Adicionaram-se mais 500 µL de PBS gelado ao tubo de *ependorf* contendo o *pellet* e repetiu-se o procedimento de centrifugação para obter a completa rentabilização do sobrenadante.

Posteriormente, pela contagem de ambas as fracções (*pellet* e sobrenadantes) no contador de poço (DPC Gamma C12) em CPM, quantificou-se a captação em percentagem do $^{99m}\text{Tc-AA}$ traduzida pela equação (9):

$$\% \text{ Captação } ^{99m}\text{Tc} - \text{AA} = \frac{CPM_{\text{pellet}}}{CPM_{\text{pellet}} + CPM_{\text{sobrenadante}}} \times 100$$

Equação 8: Equação para a determinação da captação do radiofármaco

Para além deste estudo de captação, foi realizado outro com o mesmo procedimento, no entanto, com a incubação somente de $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$, para efectuar a comparação com a percentagem de captação obtida com a molécula marcada.

Na amostra incubada durante 120 minutos foi determinada a viabilidade celular da suspensão, pelo método descrito seguidamente.

2.3. Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada recorrendo ao método de exclusão do azul tripano. Este método é baseado no princípio de que as células viáveis possuem membranas celulares intactas e o corante não atravessa e portanto não ficam coradas. Nas células mortas, o corante atravessa a membrana celular, devido ao facto desta se encontrar destruída. Por conseguinte, observadas ao microscópio, as células mortas podem ser distinguidas pois aparecem coradas de azul, enquanto as vivas se encontram com aspecto brilhante. Este facto possibilita a determinação da percentagem de células viáveis, pela equação (10):

$$\% \text{ da viabilidade celular} = \frac{n^\circ \text{ de células vivas}}{n^\circ \text{ de células vivas} + n^\circ \text{ de células mortas}} \times 100$$

Equação 9: determinação da viabilidade celular

Foram adicionados 20µL azul tripano a um tubo de eppendorf, de seguida adicionou-se 20 µL da suspensão celular. A mistura foi homogeneizada utilizando uma micropipeta e colocada num hemocítmetro para observar ao microscópio óptico (Motic AE31) com

ampliação de 100x. Efectuou-se a contagem das células vivas (brilhantes) e das células mortas (coradas de azul) nos quatro quadrantes do hemocitómetro. Posteriormente, calculou-se a viabilidade das células de adenocarcinoma colorectal, em percentagem, utilizando a expressão acima referida.

2.4. Estudos de citotoxicidade

2.4.1. Avaliação da proliferação celular por colorimetria O método do MTT, foi usado para avaliar a proliferação das células de adenocarcinoma colorectal (WiDr) e de melanoma (A375), sendo este um método colorimétrico baseado na capacidade da enzima mitocondrial desidrogenase, presente nas células viáveis, clivar os anéis tetrazólio do MTT e formar cristais *formazan* de cor azul escura. Quando as membranas celulares estão íntegras, estes cristais atravessam-nas, o que induz à sua acumulação nas células viáveis. Consequentemente, o número de células vivas é proporcional à quantidade de cristais de *formazan* produzidos (Mosmann, 1983).

Para estes estudos, e à semelhança do descrito para os estudos de captação, foi necessária a preparação de uma suspensão celular com 50000 células/mL em meio de cultura. Esta suspensão foi distribuída por placas de 24 poços, contendo cada poço 500 μ L da suspensão, e após 24h as células foram incubadas com diferentes concentrações de AA. A linha celular WiDr foi incubada com as seguintes concentrações num intervalo de 0,05 a 50 mM. De igual modo as células A375 foram incubadas com concentrações do AA a partir do 0,05 até 10 mM, seguindo os mesmos valores usados na linha celular WiDr. As células foram incubadas com as referidas concentrações durante os tempos apresentados na tabela 1. Passados os tempos de incubação, os meios de cultura contendo a molécula foram retirados e acrescentado 500 μ L de meio novo a cada poço. A proliferação celular foi avaliada às 24 e 48 horas de forma a obter as curvas de dose-resposta. Depois de passado o respectivo tempo de repouso (24 e 48 horas), o meio de cultura foi retirado, adicionou-se 500 μ L de PBS para

lavagem e, posteriormente, 200 μ L de uma solução de MTT (M2128, Sigma) dissolvida em PBS foi adicionada a cada poço e as células ficaram a incubar por 3 horas. Passado esse tempo, acrescentou-se 200 μ L de uma solução de isopropanol ácido, com 0,04 M de ácido clorídrico (37 % fumante), e as células foram colocadas numa placa de agitação durante 30 minutos. O conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços e a absorvância foi quantificada a 570 nm com um filtro de referência de 620 nm, usando o espectrofotómetro ELISA (SLT - Spectra).

Tabela 1: Resumo dos tempos de incubação e respectivos tempos de repouso

	Tempo de incubação (horas)	Tempo de repouso (horas)
WiDr	1	24
	4	
	1	48
	4	
A375	1	24
	4	
	1	48
	4	

2.4.2. Avaliação da sobrevivência celular através do ensaio clonogénico

Para determinarmos o factor de sobrevivência das WiDr e A375 foram realizados ensaios clonogénicos de modo a avaliar a capacidade das células em formar colónias e em sobreviver após exposição ao AA. Para estes estudos, utilizaram-se as duas linhas celulares referidas anteriormente, onde depois de serem desagregadas dos frascos de cultura pela acção enzimática da tripsina pelo mesmo processo usado nos estudos de captação, foram semeadas 500 células por poço numa placa de 6 poços. Após 24 horas, tanto as WiDr, como as A375 foram incubadas com quatro concentrações diferentes do AA: 0,5, 2, 3 e 5 mM, durante 2 horas. Passadas as duas horas, o meio contendo o AA foi retirado e as células foram lavadas 2 vezes com 1ml de PBS tendo sido adicionado posteriormente 3 mL de meio novo. Estas células foram mantidas na incubadora, à temperatura de 37 °C e numa atmosfera contendo 5% de

CO₂, durante 10 dias com troca de meio no 5º dia. Após os 10 dias verificam-se formação de colónias macroscópicas. Cada colónia corresponde a uma célula semeada que aderiu à placa e se multiplicou posteriormente. Para proceder à contagem das colónias formadas, melhorou-se a visualização destas. Com esse objectivo, os poços foram lavados duas vezes com 1 mL de PBS e, de seguida, as células foram incubadas com 2 mL de metanol (Merck - K35192409) durante 5 minutos, tendo sido este procedimento repetido duas vezes. Passados os 5 minutos as placas ficaram a secar por mais 5 minutos, logo a seguir foi adicionado 2 mL do corante violeta de cristal (Sigma- C3886) (0,5 % diluído em metanol), o qual actuou durante 5 minutos. Posteriormente o corante foi aspirado, as placas lavadas em água tépida até a eliminação total do excesso do poços, sendo que para 6 poços, 3 são controlo. Destes resultados foi possível calcular o factor de sobrevivência das células [SF – *surviving factor* (%)] e a eficiência da placa [PE – *plate efficiency* (%)], através das seguintes equações:

$$PE = \left(\frac{N^{\circ} \text{ de colónias contadas}}{N^{\circ} \text{ de colónias semeadas}} \right) \times 100 \quad (A) \qquad SF = \left(\frac{PE_{\text{amostra tratada}}}{PE_{\text{amostra controlo}}} \right) \times 100 \quad (B)$$

Equação 10: A - Eficiência da placa. B - Factor de sobrevivência.

2.5. Estudos de Estabilidade da vitamina C

Para analisar a estabilidade das duas formas da vitamina C em culturas celulares procedeu-se à análise por HPLC. Neste estudos a linha celular usada foi a do adenocarcinoma colorectal (WiDr), desta feita a análise dos diferentes compostos presentes nas culturas celulares foi realizada no HPLC usando o mesmo método desenvolvido para o controlo de qualidade já descrito, assim, usou-se a mesma de fase estacionária, fase móvel e respectivo gradiente, fluxo, comprimento de onda, volume injectado e duração da detecção. Esta análise permitiu também estudar a estabilidade das duas formas da vitamina C (AA e DHA) em cultura, bem como os seus mecanismos de transporte para dentro da célula. Além disso, foi possível verificar se a reacção de oxidação que forma DHA a partir do AA, se dava num meio de cultura, bem como o efeito do pH do meio nas duas formas da vitamina C.

Para proceder ao estudo da estabilidade da vitamina C *in vitro*, 1 mL de meio DMEM foi adicionado em cada poço de uma placa de 12 poços. Após 24 horas, as células foram incubadas com 10 mM de AA e DHA (D8132, Sigma), durante os tempos de incubação referidos na tabela 2. A diferentes tempos de incubação as amostras foram filtradas usando filtros de 0,2 µM (Whatman FP30/0,2 Schleider & Schnell), e injectadas (25 µL) no HPLC. Os cromatogramas foram processados determinando o tempo de retenção de cada componente das amostras injectadas, e pelo desenho de ROIS do tipo DD determina-se a área de cada pico. De notar que, amostras padrão de AA, DHA, com uma concentração de 10 mM, e de DMEM foram injectados no HPLC previamente, tendo os seus cromatogramas e respectivos tempos de retenção como referência.

Tabela 2: Amostras injectadas no HPLC para o estudos da estabilidade da vitamina C.

Amostras	Tempo de Incubação (horas)					Concentração
DMEM+AA	1	24	48	72	96	10 mM
DMEM+DHA	1	24	48	72	96	10 mM
DMEM	1	24	48	72	96	-----

2.5.1. Avaliação do meio extracelular

Neste estudos, foi verificado comportamento do AA e DHA em cultura celular, na presença de metabolismo celular, pois pela análise no HPLC podemos determinar a quantidade consumida pelas células, bem como a influência que os metabolitos podem ter sobre as duas formas da vitamina C. Preparou-se uma suspensão celular com 50000 células/mL, e 1mL dessa suspensão foi distribuída por placas de 12 poços e deixadas na incubadora durante 24 horas. Nesta análise, a nossa amostra foi o meio extracelular, pois queremos verificar a evolução na alteração do AA e DHA *in vitro*. As WiDr foram preparadas de forma semelhante aos estudos de proliferação celular de modo a obter uma suspensão celular de 50000células/mL, e distribuídas por placas de 12 poços e após 24 horas foram incubadas com as concentrações e durante os tempos referidos na tabela 3. Passado o respectivo tempo de incubação, as amostras foram filtradas, usando filtros de 0,2 µM (Whatman FP30/0,2 Schleider & Schnell), e

injectadas no HPLC para obtenção dos respectivos cromatogramas. Amostras de meio, sem tratamento com o AA e DHA, com os mesmos tempos de incubação e na presença de metabolismos celular foram injectadas para servir de controlo.

Tabela 3: Amostras injectadas no HPLC na presença de metabolismo celular para avaliar o meio extracelular.

Amostras	Tempo de incubação (horas)					Concentração
	1	24	48	72	96	
AA+Meio	1	24	48	72	96	3 mM
AA+Meio	1	24	48	72	96	7 mM
AA+Meio	1	24	48	72	96	10 mM
DHA+Meio	1	24	48	72	96	3 mM
DHA+Meio	1	24	48	72	96	7 mM
DHA+Meio	1	24	48	72	96	10 mM
Meio	1	24	48	72	96	3 mM
Meio	1	24	48	72	96	7 mM
Meio	1	24	48	72	96	10 mM

Com o objectivo de determinar a linearidade do equipamento de detecção UV foram injectados várias amostras de uma solução de AA em várias concentrações diferentes (1, 3, 5, 7 e 10 mM) a fim de construir a curva de calibração. O detector deve apresentar uma sensibilidade tal que, a curva de calibração da área de integração *versus* a concentração se aproxima de uma linha recta ou se ajusta a uma equação linear:

$$y = mx + b$$

Equação 11: Linearidade (retirado de Snyder, 2002)

Onde o **y** é a resposta (área do pico), o **x** a concentração, o **m** o declive da recta e o **b** a intercepção com a linha de ajustes dos dados.

3. Estudos in Vivo

Com vista a avaliar a eficiência do método usado para o controlo de qualidade bem como o potencial imagiológico do ^{99m}Tc-AA e de certa forma confirmar os resultados observados

nos estudos in vitro, foram realizados estudos em ratinhos Balb/c nu/nu. A escolha destes animais justifica-se pelo facto de serem animais atímicos e deficientes em células T, pelo que permitem o desen-volvimento de tumores após a implantação de células tumorais. Pelo desconhecimento do comportamento biológico da molécula em estudo, levou a que tivéssemos de realizar estudos de biodistribuição em animais normais. Estes estudos permiti-ram-nos inferir acerca das vias de excreção assim como dos órgãos-alvo do $^{99m}\text{Tc-AA}$. Os resultados farmacocinéticos obtidos serviram para análise comparativa com os obtidos em animais com xenotransplantes.

3.1. Estudos de biodistribuição em ratinhos normais com $^{99m}\text{Tc-AA}$

Os ratinhos *Balb/c nu/nu* normais foram primeiramente anestesiados com uma solução de ketamina (77 %) e clorpromazina (23 %) (ketamina, Ketalar®, Porke-Davis e clorpromazina, Largactil®, Laboratórios Vitória), administrada por via subcutânea. Posteriormente, para proceder aos estudos de biodistribuição, foi-lhes administrada uma actividade de $^{99m}\text{Tc-AA}$ de cerca de 1,64 MBq por injeção intravenosa (iv) na veia dorsal da cauda, sobre o colimador de uma câmara-gama. Após a administração do radiofármaco, os ratinhos foram sacrificados, por deslocamento cervical, de acordo com a legislação em vigor, aos 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300 e 360 min após a administração do radiofármaco. Em cada tempo, realizou-se a autópsia dos animais, com colheita de vários órgãos (coração, pulmão, tiróide, vesícula biliar, fígado, baço, estômago, intestino delgado, intestino grosso, genitais, bexiga, cérebro e cerebelo), assim como de alguns tecidos (cartilagem, músculo, osso e sangue) e fluidos de excreção (bilis e urina). Cada um dos órgãos, tecidos ou fluidos foi colocado num tubo de RIA, previamente pesado. Cada tubo, agora com o respectivo conteúdo da autópsia, foi pesado (em gramas) e posteriormente contado num contador de poço para quantificação da actividade presente (em CPM).

Tornou-se então possível a determinação da percentagem de dose de radiofármaco

$^{99m}\text{Tc-AA}$ injectado/grama de órgão, tecido ou fluido. Este cálculo é traduzido na equação 13.

$$\% \text{ Actividade administrada/grama} = \frac{CPM_{\text{totais do órgão}}/massa_{\text{órgão}}}{CPM_{\text{atividade total administrada}}} \times 100$$

Equação 12: Percentagem de dose do radiofármaco injectado por grama de órgão.

3.2. Desenvolvimento de Xenotransplantes

O modelo animal foi desenvolvido em xenotransplantes em ratinhos *Balb/c nu/nu* machos, obtido através de injeção de cerca de 6×10^6 células da linha celular de adenocarcinoma do cólon (WiDr) no cavado axilar direito. A escolha dessa zona deve-se ao facto deste ser contralateral ao coração, ficar longe do fígado, do rim e da bexiga, evitando assim a sobreposição com as projecções das áreas cardíaca, hepática, renal ou vesical, circunstâncias muito importantes para uma boa visualização. Tendo também uma boa área para expansão e apresenta boa vascularização, o que permite um desenvolvimento rápido do xenotransplante.

3.3. Estudos de biodistribuição em ratinhos com xenotransplantes com

$^{99m}\text{Tc-AA}$

Um protocolo semelhante ao realizado para os estudos de biodistribuição em ratinhos normais *Balb/c nu/nu*, foi realizado para os estudos de biodistribuição realizados em ratinhos *Balb/c nu/nu* portadores de xenotransplantes. Deste modo, todos os órgãos/tecidos/fluidos referidos anteriormente foram colhidos, bem como o tumor. Após a excisão deste, foi pesado e contado no contador de poço e calculado o seu volume através a seguinte equação:

$$V = \frac{L \times S^2}{2}$$

Equação 13: Cálculo do volume do tumor

onde **L** corresponde ao diâmetro maior do tumor e **S** ao diâmetro menor.

Com o objectivo de estabelecer uma relação entre as captações observadas *in vivo* do $^{99m}\text{Tc-AA}$ foram calculadas as razões tumor/osso, que consistem na razão entre a % de actividade administrada/grama do tumor e a % de actividade administrada/grama do osso e a razão tumor/sangue, que consiste na razão entre a % de actividade administrada/grama do tumor e a % de actividade administrada/grama do sangue.

3.4. Imagiologia com $^{99m}\text{Tc-AA}$

Os estudos de imagiologia nuclear incluíram a aquisição de imagens dinâmicas e estáticas. A aquisição dinâmica foi concretizada para assegurar a entrada e a progressão do radiofármaco. As características das aquisições, dinâmica e estática, estão sumariadas na tabela 4. Ambas foram feitas usando uma câmara-gama (GE 400 AC) controlada por um computador de aquisição GenieAcq e incorporando um colimador paralelo de baixa energia e alta resolução (LEHR – *low energy and high resolution*).

Tabela 4: Características das imagens dinâmicas e estáticas.

Imagens	Zoom	Matrizes (pixels)	Nº de Imagens	Duração
Dinâmicas	2	128X128	10	300
Estáticas	2	256X256	1	120

Os ratinhos *Balb/c nu/nu* foram anestesiados segundo o protocolo supramencionado nos estudos de biodistribuição. Seguidamente, estes foram injectados com 1,64 MBq de $^{99m}\text{Tc-AA}$ na veia dorsal da cauda sobre o colimador da câmara gama e imediatamente iniciou-se a aquisição dinâmica, com o intuito de confirmar a entrada e progressão do radiofármaco. Passados os 5 minutos da aquisição dinâmica foram adquiridos imagens estáticas aos 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 e 360 minutos após a injeção do radiofármaco.

Depois de adquiridas as imagens estáticas, estas foram transferidas para uma estação de trabalho *Xeleris*, para posterior processamento e análise. Para o processamento das imagens

estáticas desenharam-se regiões de interesse (ROIs) para os vários órgãos, nomeadamente, tiróide, estômago, fígado, rim, bexiga. As ROIs foram desenhadas em órgãos a partir dos quais se poderia obter informação sobre a existência de impurezas radioquímicas, presentes no radiofármaco. Sabendo-se que normalmente a acumulação de $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$ se dá ao nível da tiróide e estômago, e que, por sua vez, a acumulação de $^{99m}\text{Tc-RH}$ se verifica ao nível do fígado e baço, tornou-se possível inferir e comprovar os valores de pureza radioquímica do $^{99m}\text{Tc-AA}$ obtidos por HPLC. Por outro lado, as ROIs foram também desenhadas em zonas de maior actividade, para permitir a análise das vias de metabolização e excreção do complexo injectado.

3.5. Avaliação do crescimento tumoral *in vivo* após tratamento com AA

Ratinhos *Balb/c nu/nu* portadores de xenotransplantes, foram usados para desenvolver esse estudo. Após sete dias de injeção de aproximadamente 4×10^6 células por rato, sendo que foi realizada uma monitorização contínua do peso e do volume dos ratinhos diariamente, a terapia com 150mg/Kg de AA, começou-se quando o volume do tumor atingiu os 300 a 350 mm^3 . O protocolo de tratamento consistiu numa injeção diária da referida solução do AA intraperitonealmente. Esse período foi de 12 dias em que as injeções tiveram dois dias de descanso a cada 5 de injeção. Os ratinhos que serviram de controlo também foram pesados diariamente e o volume dos seus tumores medidos. Após os 12 dias de tratamento os ratinhos foram sacrificados, e os tumores foram retirados, medidos e pesados.

4. Análise estatística

Através dos precedimentos descritos anteriormente obteve-se resultados em que para aumentar o seu rigor interpretativo procedeu-se a análise usando aplicações do SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 16.

Nos estudos de captação e estudos clonogénicos foram feitos testes não paramétricos visto

que as amostras de dados são reduzidas e não seguem uma distribuição normal. Em casos em que se pretendia fazer a comparação de valores emparelhados, isto é, por exemplo duas variáveis (p.ex. WiDr e A375) ao longo do tempo, utilizámos o teste de Wilcoxon. Por outro lado, usámos o teste de Mann-Whitney para comparar duas amostras independentes (p.ex. WiDr e A375) dentro da mesma variável (p.ex. concentração do AA). Também, foi usado o teste de Friedman para análise de variância entre dois ou mais grupos relacionados (p.ex. % Captação e o tempo).

Capítulo III- Resultados

1. Estudos de química

1.1. Preparação e controlo de qualidade do $^{99m}\text{Tc-AA}$

O primeiro protocolo desenvolvido para a preparação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ consistia em adicionar, 222 MBq de pertecnetato de sódio (em 3mL de NaCl 0,9%) e 0,2 mL de FeCl_3 0,1 N (em HCl 0,1 N) a 200 mg de AA, acertando o pH a 6,5 - 7 (com uma solução de NaOH 1M), a temperatura de 0°C durante 3 horas e mantida em atmosfera de árgon e protegido da luz. Procedeu-se a realização do controlo de qualidade para determinar a pureza radioquímica, por HPLC, do composto $^{99m}\text{Tc-AA}$. Previamente, as amostras de AA, FeCl_3 e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foram injectadas no HPLC para determinanr os respectivos tempos de retenção (gráfico 1, gráfico 2 e gráfico 3 respectivamente).

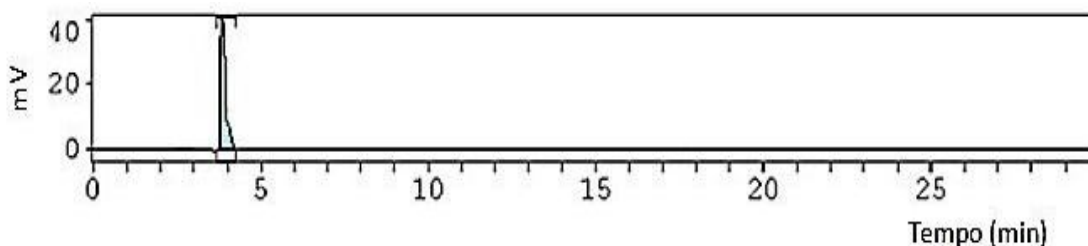


Gráfico 1 : Cromatograma da amostra do AA (10mM) injectada no HPLC, sendo o seu tempo de retenção determinado por integração gráfica.

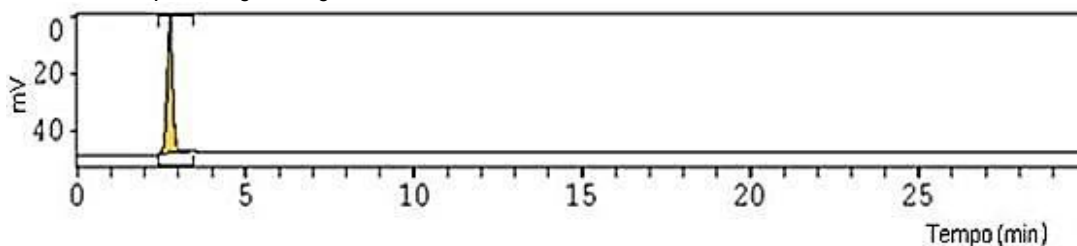


Gráfico 2: Cromatograma da amostra de FeCl_3 (0,1N) injectada no HPLC, sendo o seu tempo de retenção determinado por integração gráfica.

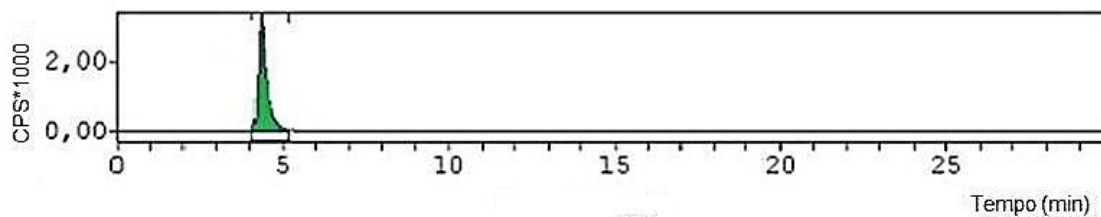


Gráfico 3: Cromatograma da amostra do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ injectada no HPLC, sendo o seu tempo de retenção determinado por integração gráfica.

De referir que não foi possível visualizar o pico referente ao $^{99m}\text{Tc-RH}$, uma vez que este fica retido na pré-coluna (sendo que o poro da pré coluna só deixa passar partículas com diâmetro igual ou menor a 0,1nm e o $^{99m}\text{Tc-RH}$ é um colóide com 130 nm de diâmetro, sendo que as partículas que constituem os agregados coloidais apresentam um diâmetro de 2 a 3 nm). Com estes estudos obtiveram-se os respectivos tempos de retenção evidenciados nos gráfico 1, gráfico 2 e gráfico 3 e que estão sumariados no quadro 1.

Quadro 1: Tempo de retenção das amostras padrão injectadas no HPLC. Os valores referentes às amostras padrão representam a média de três injeções

Composto	Tempo de retenção (minutos)	Tipo de detecção
AA	$3,85 \pm 0,03$	UV
FeCl_3	$2,75 \pm 0,01$	UV
$^{99m}\text{Tc-O}_4^-$	$4,36 \pm 0,03$	Radioactividade

Baseado nos dados do gráfico foi então possível determinar os diferentes constituintes do composto marcado por comparação dos tempos de retenção. Também foi possível calcular a eficiência de marcação pela relação entre as áreas do $^{99m}\text{TcO}_4^-$, cujo tempo de retenção já era conhecido, e do $^{99m}\text{Tc-AA}$. Por exclusão de partes, o pico do $^{99m}\text{Tc-AA}$ é aquele que aparece aos 3,05 minutos ($3,05 \pm 0,12$ minutos). O gráfico 4 representa um cromatograma obtido a partir da detecção por radioactividade de uma formulação obtida com o protocolo de marcação supra citado. A partir deste podem observar-se claramente os tempos de retenção dos diferentes compostos radioactivos presentes no complexo, distinguindo-se claramente o $^{99m}\text{Tc-AA}$ do $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$. Os compostos não radioactivos (detecção UV) e os radioactivos (detecção por radioactividade) estão representados no gráfico 4A e gráfico 4B, 4C e 4D, respectivamente. O controlo de qualidade foi realizada logo após a marcação bem como aos 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 2,5 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h e 24 h após a marcação.

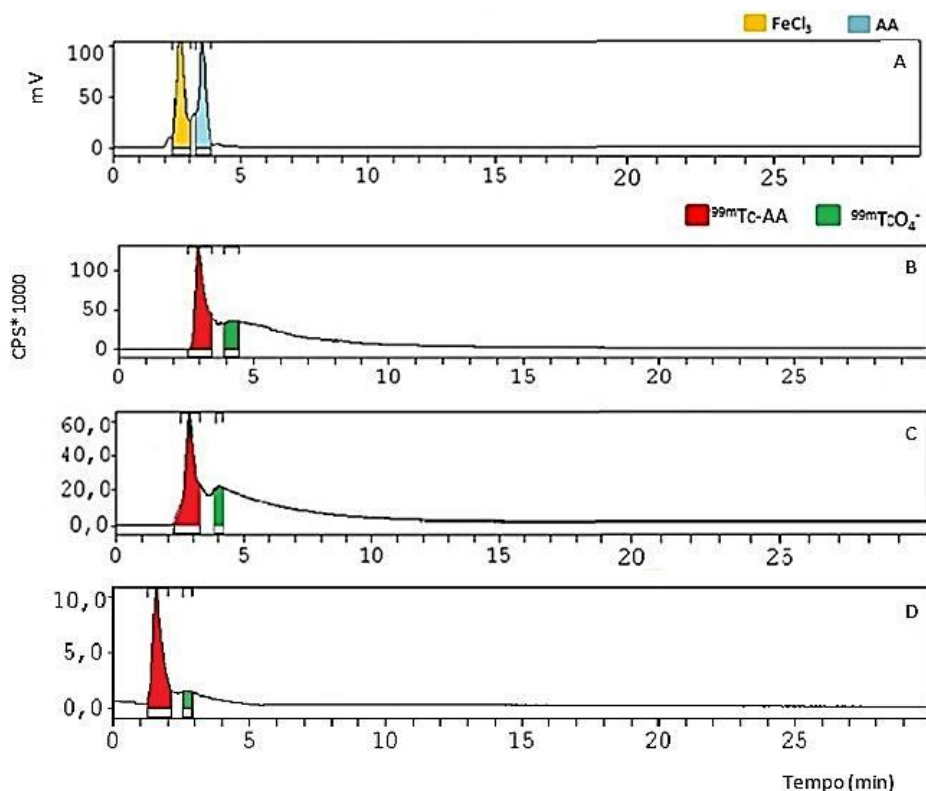


Gráfico 4: Cromatogramas do controlo de qualidade do *Kit*, resultante de uma formulação farmacêutica. A – Cromatograma resultante da detecção UV, representando os compostos não radioactivos presentes na formulação. B – Cromatograma resultante da detecção de radioactividade correspondente ao controlo de qualidade do *kit* aos zero minutos após a marcação observando uma eficiência de marcação igual a 74,16%. C – Cromatograma resultante da detecção de radioactividade correspondente ao controlo de qualidade do *kit* a 4 horas após a marcação observando uma eficiência de marcação igual a 81,84%. D – Cromatograma resultante da detecção de radioactividade correspondente ao controlo de qualidade do *kit* as 24 horas após a marcação observando uma eficiência de marcação igual a 90,40%.

Como se pode verificar a eficiência de marcação do *kit* teve um melhoramento contínuo desde do momento da marcação até as 24 horas depois, sendo que a maior eficiência verificada a essa hora. Como prática clínica essa formulação seria inviável uma vez que seria necessário uma alta actividade do ^{99m}Tc-pertecnetato de sódio para a realização de uma análise médica. Com vista a melhorar a eficiência de marcação, procedeu-se ao desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica consistindo em manter todas as condições anteriores, excepto a temperatura do *kit*. Desta feita a marcação foi feita a temperatura ambiente e o *kit* foi mantido assim durante todo o tempo que foi feito o controlo de qualidade. Assim como na anterior formulação o controlo foi realizado após os mesmos tempos. De facto, como se verifica no gráfico 5, houve uma melhoria significativa na eficiência

de marcação ao longo do tempo e manteve-se sempre acima dos 90% durante todo o tempo que foi feito o controlo de qualidade.

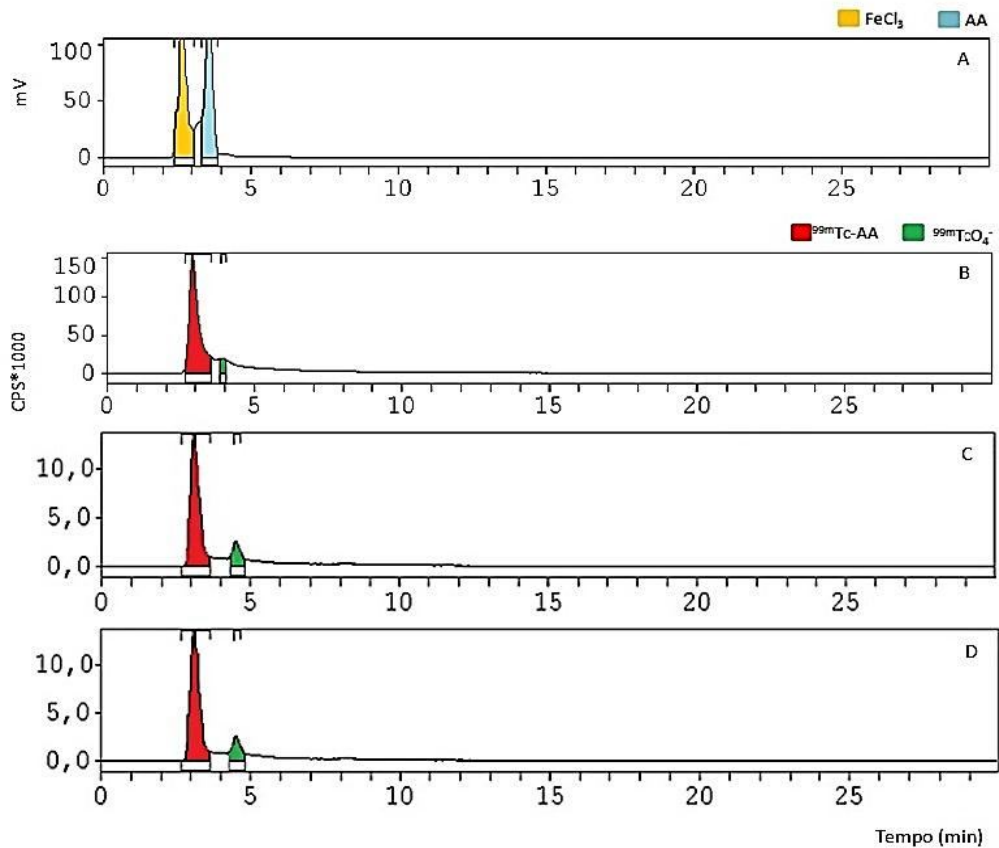


Gráfico 5: Cromatogramas do controlo de qualidade do *Kit*, resultante de uma formulação farmacêutica. A – Cromatograma resultante da dectecção UV, representando os compostos não radioactivos presentes na formulação. B – Cromatograma resultante da detecção de radioatividade correspondente ao controlo de qualidade do *kit* aos zero minutos após a marcação observando uma eficiência de marcação igual a 94,24%. C – Cromatograma resultante da detecção de radioatividade correspondente ao controlo de qualidade do *kit* a 4 horas após a marcação observando uma eficiência de marcação igual a 95,80%. D – Cromatograma resultante da detecção de radioatividade correspondente ao controlo de qualidade do *kit* as 24 horas após a marcação observando uma eficiência de marcação igual a 90,91%.

Após várias tentativas no sentido de otimizar o processo de marcação, a maior eficiência de marcação foi observada quando a formulação farmacêutica teve a seguinte composição: 222 MBq de pertecnato (em 1,5mL de NaCl 0,9 %), 0.2 mL de FeCl_3 0,1 N (em HCl 0,1 N), 200 mg de AA, pH acertado a 6,5 - 7 (com solução de NaOH 1M), à temperatura

ambiente e a formulação continuamente mantida em atmosfera de árgon e protegida da luz. O controlo de qualidade foi realizado durante todos os tempos referidos anteriormente.

No gráfico 6 podemos ver os cromatogramas de um *kit* com uma elevada eficiência de marcação (> 99%), determinada a partir da formulação farmacêutica supra citada.

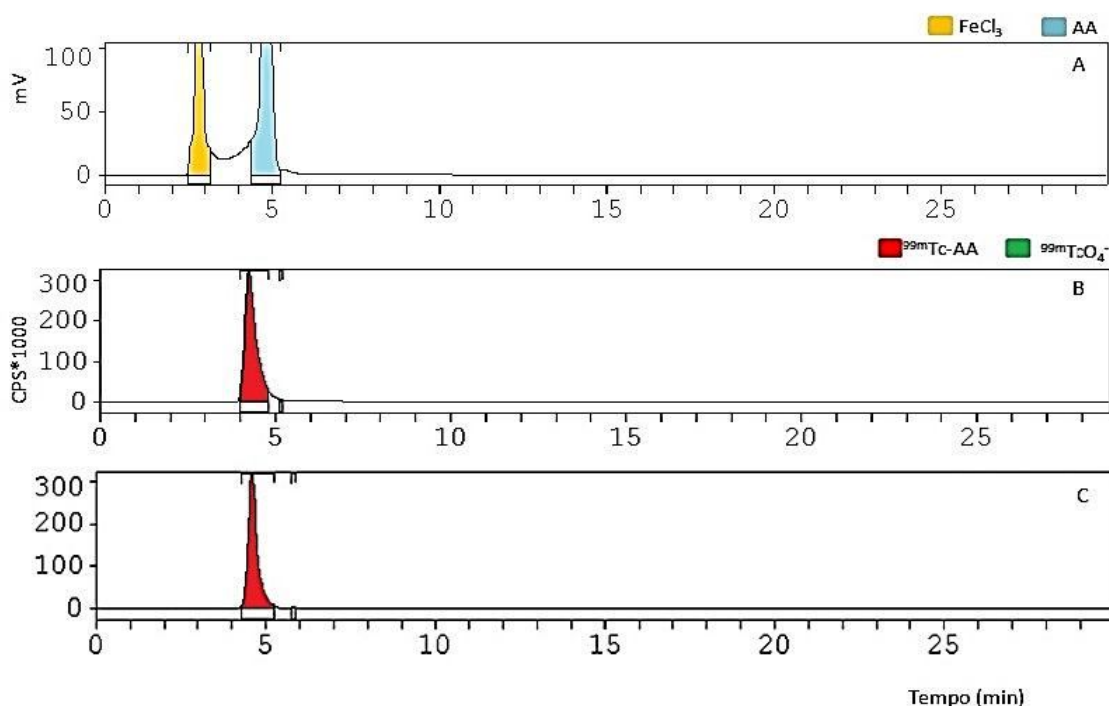


Gráfico 6: Cromatogramas de uma formulação farmacêutica de elevada eficiência de marcação. A – Cromatograma resultante da detecção UV, representando os compostos não radioactivos presentes na formulação. B – Cromatograma resultante da detecção de radioactividade correspondente ao controlo de qualidade do *kit* aos zero minutos após a marcação observando uma eficiência de marcação igual a 99,45%. C – Cromatograma resultante da detecção de radioactividade correspondente ao controlo de qualidade do *kit* a 6 horas após a marcação observando uma eficiência de marcação igual a 99,51%.

A tabela 5 representa o valor da média da eficiência de marcação de quatro formulações radiofarmacêuticas obtidas durante os tempos em que o controlo de qualidade foi realizado no HPLC.

Da análise dos diversos resultados obtidos podemos verificar que a eficiência de marcação se manteve estável ao longo do tempo, sinal revelador da elevada estabilidade da formulação radiofarmacêutica. De notar que a maior eficiência de marcação foi alcançada após seis horas, sendo de ressaltar que a eficiência de marcação manteve-se sempre acima do 95%

durante todos os tempos em que foi realizado o controlo de qualidade. Relativamente à determinação do pH, verificou-se que ao longo do tempo este parâmetro se mantém constante entre valores de 6.5 e 7.

Tabela 5: Médias das eficiências de marcação de quatro formulações farmacêuticas ao longo do tempo

Tempo (Horas)	Eficiência de Marcação	pH
0,00	97,46 ± 1,48	6,5 - 7
0,50	95,76 ± 2,49	6,5 - 7
1,00	97,26 ± 1,39	6,5 - 7
3,00	96,97 ± 2,19	6,5 - 7
4,00	97,72 ± 1,30	6,5 - 7
6,00	98,36 ± 1,07	6,5 - 7

Sendo assim, o HPLC aparece como o método escolhido por excelência para a realização do controlo de qualidade do nosso composto, contudo fica por desenvolver um método complementar para a determinação da presença do ^{99m}Tc -RH no ^{99m}Tc -AA.

Antes de considerar os resultados obtidos no HPLC, válidos procedeu-se a análise de parâmetros de avaliação da integridade da coluna, para que tenhamos a certeza que a separação dos componentes da amostra é feita de forma a poderem ser distinguíveis.

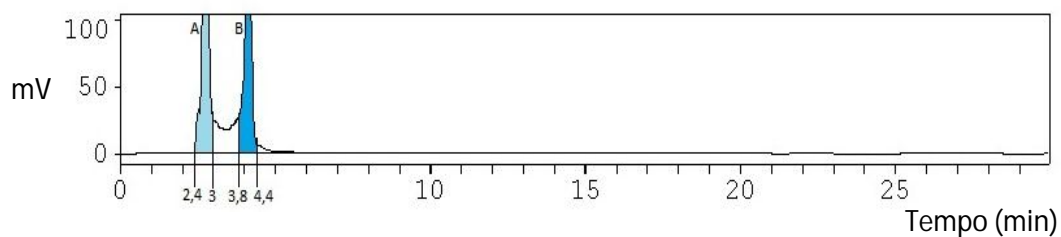


Gráfico 7: Cromatograma referente aos picos de AA (pico B) e FeCl_3 (pico A) detetados por UV.

A resolução da coluna foi calculada tendo em conta os dados do gráfico 7, referente a uma detecção UV de um controlo de qualidade.

Sendo assim a resolução da coluna é:

$$R = 2 \frac{tr_B - tr_A}{w_A + w_B} = 2 \times \frac{3,85 - 2,75}{0,6 + 0,6} = 1,83333$$

Os valores dos tempos de retenção de cada pico foram referidos no quadro 1, o w_A e w_B são a largura de cada pico representado no gráfico 7. Desta feita, podemos dizer que a separação entre os picos A e B é boa, pois considera-se que valores de resolução iguais ou superiores a 1,5 são suficientes para haver uma boa distinção entre dois picos adjacentes (Snyder, 2002)

Para além da resolução, a selectividade da coluna também foi calculada em relação aos valores do quadro 1 e do gráfico 7.

$$\alpha = \frac{tr_B}{tr_A} = \frac{3,85}{2,75} = 1,4$$

Uma coluna apresenta uma boa selectividade quando esta é superior a 1, para que a separação seja boa, pois a selectividade depende das propriedades do analito e das interações deste com a coluna (Kazakevich, 2007).

Também os valores de eficiência foram calculados para cada um dos picos (AA e $FeCl_3$), baseada na teoria dos pratos, em que a coluna é dividida num número hipotético de pratos de altura finita (HETP- *height of effective theoretical plate*). E a maior eficiência observa-se quando maior é o numero de pratos ou quanto menor é a altura o prato (HETP). Deste modo uma boa eficiência caracteriza-se quando o valor do HETP for menor que um (Kazakevich, 2007).

Número de pratos:

$$N_{AA} = 16 \left(\frac{tr_{AA}}{w_{AA}} \right)^2 = 16 \times \left(\frac{3,85}{0,6} \right)^2 = 658,78 \quad N_{FeCl_3} = 16 \left(\frac{tr_{FeCl_3}}{w_{FeCl_3}} \right)^2 = 16 \times \left(\frac{2,75}{0,6} \right)^2 = 336,11$$

Em relação à selectividade, como a nossa coluna tem um comprimento de 20 cm:

$$HETP_{AA} = \frac{L}{N_{AA}} = \frac{20}{658,78} = 0,03$$

$$HETP_{FeCl_3} = \frac{L}{N_{FeCl_3}} = \frac{20}{336,11} = 0,059$$

Sendo os valores de $HETP_{AA}$ e $HETP_{FeCl_3}$ menores que a unidade podemos confiar nos resultados obtidos no HPLC, pois os parâmetros que influenciam a separação analítica estão todos dentro do considerado óptimo

2. Estudos *in vitro*

Após a realização dos estudos de química procedeu-se à realização dos estudos *in vitro* de modo a estudar a estabilidade do nosso composto marcado em culturas celulares de WiDr e A375, estudando o seu influxo nestas, pelos estudos de captação, bem como avaliar a citotoxicidade da forma reduzida da vitamina C (AA) pela avaliação da proliferação e sobrevivência celular, também efectuou estudos no HPLC para avaliar a estabilidade do AA e do DHA *in vitro*.

2.1. Estudos de captação

Os estudos de captação foram feitos nas linhas do adenocarcinoma colorectal (WiDr) e nas do melanoma melanocítico (A375) com o intuito de comparar a captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$, nessas duas linhas. Primeiramente, foi realizado estudo captações do $^{99m}\text{Tc-Livre}$ ($^{99m}\text{TcO}_4$), para servir como referência numa concentração de 0,925 MBq/mL. Posteriormente a percentagem de captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ para a mesma concentração foi determinada nas duas linhas celulares. No que diz respeito a captação nas células WiDr, podemos observar no gráfico 8, que a percentagem de captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ é inferior à do ^{99m}Tc livre ao longo do tempo, excepto aos 5 e aos 120 minutos sendo, no entanto, esta diferença pouco significativa ($p > 0,05$). Ao longo do tempo o $^{99m}\text{Tc-AA}$ comporta-se de forma semelhante ao $^{99m}\text{Tc-livre}$, sendo que o seu pico de captação ocorre aos 120 minutos com um valor de 0,45%, enquanto o do $^{99m}\text{Tc-livre}$ ocorre aos 60 minutos com um valor 0,64%. Como evidenciado no gráfico, os valores de captação encontrados para o $^{99m}\text{Tc-AA}$ não diferem significativamente dos valores

obtidos para o ^{99m}Tc -livre, sendo por este motivo considerados baixos, apresentando valores que variam entre 0,36 e 0,45%.

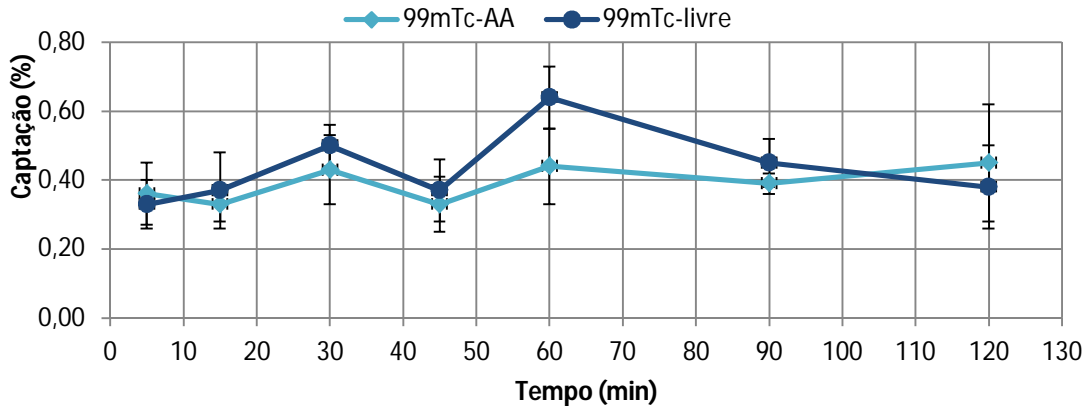


Gráfico 8: Captação do ^{99m}Tc -AA e do ^{99m}Tc -livre nas WiDr. As células foram incubadas com a mesma concentração de ^{99m}Tc -AA e do ^{99m}Tc -livre e a capturação foi determinada pelos estudos de influxo. Os dados expressam a média de oito experiências independentes

Por outro lado as A375, ao contrário das WiDr, apresentam um aumento na capturação do ^{99m}Tc -AA em relação à capturação do ^{99m}Tc -livre excepto durante os primeiros vinte e cinco minutos do estudo, como evidenciado no gráfico 9. De notar que aos 90 minutos a capturação do ^{99m}Tc -AA é semelhante à do ^{99m}Tc -livre (0,26 e 0,25%, respectivamente). Do gráfico podemos observar que o pico de capturação do ^{99m}Tc -AA ocorre aos 120 minutos com um valor de 0,36%, bem como o do ^{99m}Tc -livre com um valor de 0,26%. A capturação das A375 varia entre 0,22 e 0,36%. Verifica-se que aos 45, 60 e 120 minutos existem diferenças entre a capturação do ^{99m}Tc -AA e do ^{99m}Tc -livre, contudo essa diferença não é estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

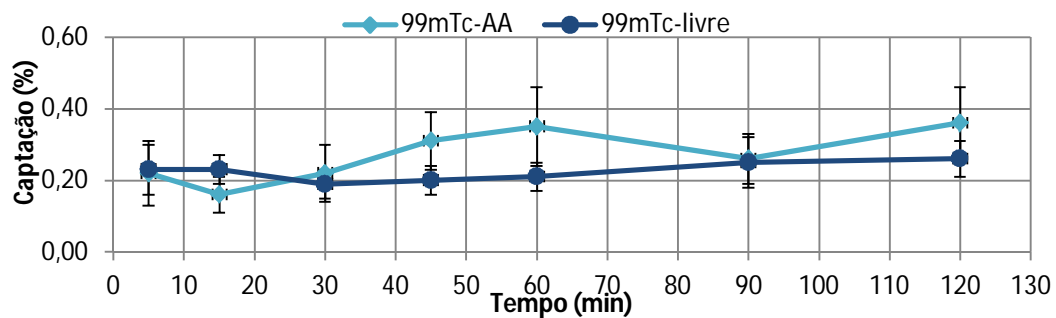


Gráfico 9: Captação do ^{99m}Tc -AA e do ^{99m}Tc -livre nas A375. As células foram incubadas com a mesma concentração de ^{99m}Tc -AA e do ^{99m}Tc -livre e a capturação foi determinada pelos estudos de influxo. Os dados expressam a média de oito experiências independentes.

Ao comparar a captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ nas duas linhas celulares verificamos que as WiDr têm uma maior captação do que as A375, como se pode observar no gráfico 10, excepto aos 45 minutos em que a captação é semelhante. Essa diferença é estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para 15, 30, 60 e 90 minutos, com valor p igual a 0,028, 0,015, 0,010 e 0,021 respectivamente. Por outro lado, é de notar que ambas as linhas celulares têm o mesmo comportamento ao longo do tempo, excepto no intervalo entre os trinta e os quarenta e cinco minutos. O pico de captação das WiDr e A375 ocorre aos 120 minutos e têm o valor de 0,45% e 0,36%, respectivamente. De notar ainda que, ao compararmos a captação das duas linhas celulares com a captação do Tc livre, conclui-se que estas possuem uma baixa captação.

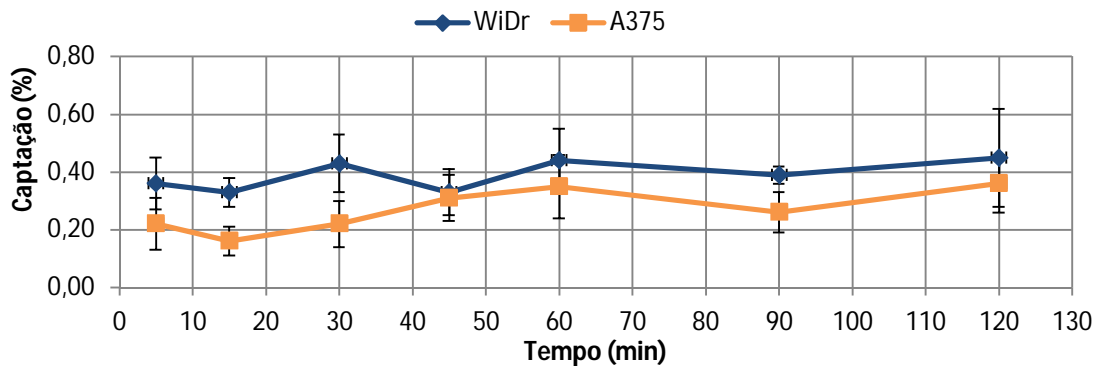


Gráfico 10: Captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ nas WiDr e A375. As duas linhas celulares foram incubadas com a mesma concentração do $^{99m}\text{Tc-AA}$ e a captação foi determinada pelos estudos de influxo. Os dados expressam a média de oito experiências independentes.

Ao fim dos 120 minutos de captação, em todos os estudos foi determinada a viabilidade celular recorrendo ao método de exclusão do azul tripano em que se verificou uma viabilidade celular sempre acima do 95%. Os resultados são a média de oito estudos independentes para o $^{99m}\text{Tc-Livre}$, e $^{99m}\text{Tc-AA}$ em cada linha.

2.2. Estudos de citotoxicidade

2.2.1. Avaliação da proliferação celular por colorimetria

O efeito da forma reduzida de vitamina C na proliferação celular das WiDr e A375 foi feita através do método colorimétrico do MTT. Foram analisadas diferentes concentrações do

AA nas duas linhas celulares bem como o tempo de exposição e o tempo de repouso das células após a exposição, podendo esse tempo ser crucial para a recuperação ou não das células.

Após efectuados os estudos, as curvas de dose-resposta foram feitas de modo a determinar o IC_{50} para cada linha celular, sendo esta a concentração que inibe a proliferação celular em 50% das células da amostra. De notar que a proliferação é calculada em relação ao controlo em que não foi-lhe adicionado nenhuma concentração do AA.

No gráfico 11A e 10 B estão representadas as curvas dose-resposta referente a linha celular WiDr, para 24 e 48 horas, respectivamente, sendo este tempo o de repouso. Os resultados foram tratados utilizando a ferramenta OriginPro versão 8, em que se avaliou-se a tendência dos dados tendo feito uma aproximação sigmoidal, em que posteriormente se calculou o IC_{50} de para cada linha, tendo em conta o tempo de exposição e o tempo de repouso.

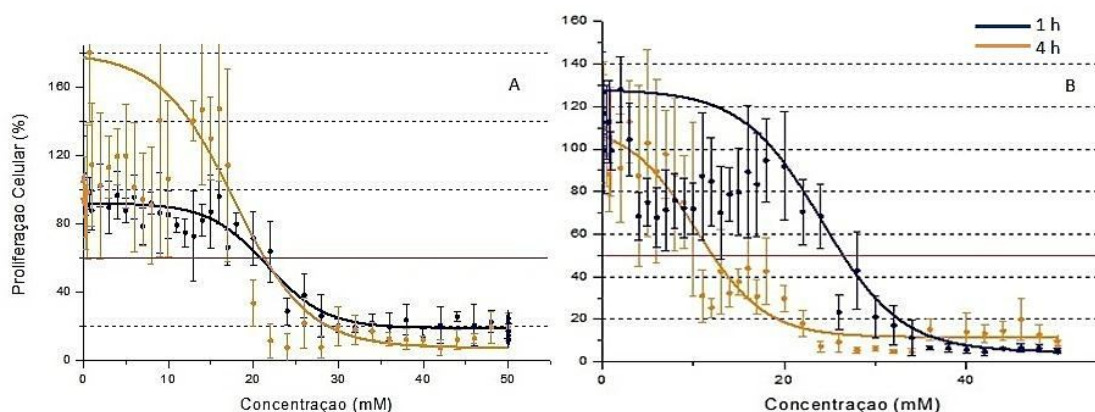


Gráfico 11: Curvas de dose-resposta do AA nas WiDr. A – Gráfico representando o efeito do AA com uma e quatro horas de exposição com 24 horas de descanso. B – Gráfico representando o efeito do AA com uma e quatro horas de exposição com 48 horas de descanso. Os resultados expressam a média de seis experiências independentes.

Pela análise dos gráficos e recorrendo aos dados da aproximação sigmoidal, foi possível verificar que para 24 horas o IC_{50} para 1 e 4 horas é de 22,734 mM e 23,98 mM respectivamente. Enquanto que para 48 horas e 1 hora de exposição o IC_{50} observa-se aos 25,09 mM, e para quatro horas houve uma diminuição do IC_{50} apresentando o valor de 12,2 mM. Podendo estar implícito o papel do tempo de repouso após a exposição com o AA,

nesses resultados, contudo o IC_{50} observada aos 48 horas com 1 hora de exposição é inferior ao observado aos 24 horas com uma hora de exposição.

Em relação à avaliação da proliferação das A375, os gráficos também foram feitos comparando os dois tempos de exposição (1 e 4 horas) para 24 e 48 horas de descanso, representados no gráfico 12.

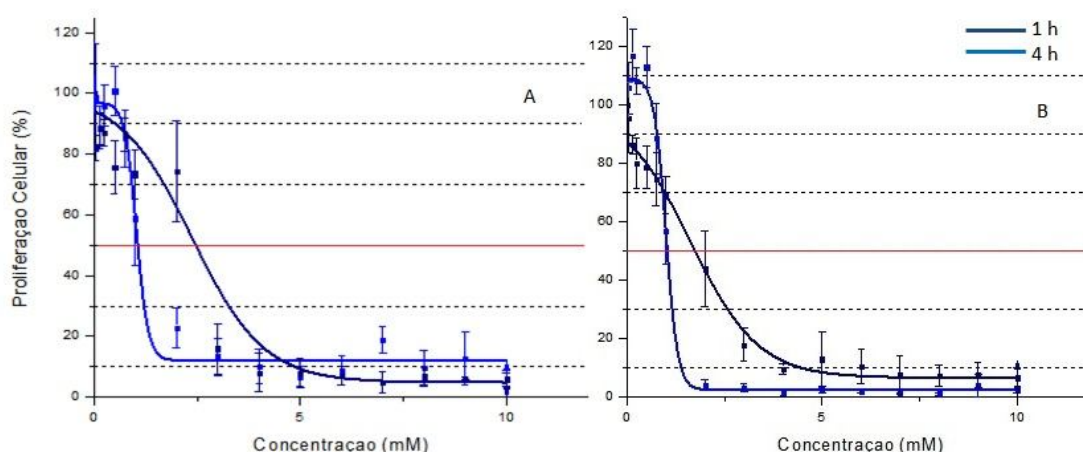


Gráfico 12: Curvas de dose-resposta do AA nas A375. A – Gráfico representando o efeito do AA com uma e quatro horas de exposição com 24 horas de descanso. B – Gráfico representando o efeito do AA com uma e quatro horas de exposição com 48 horas de descanso. Os resultados expressam a média de seis experiências independentes

O que pode tirar da análise do gráfico 12, é que o comportamento dessas células é semelhante independente do tempo de repouso, mas no que diz respeito ao tempo de exposição essa semelhança não se verifica. Essa conclusão pode ser comprovada pela análise dos IC_{50} , que mostra que para 1 hora é igual a 2,42 mM para 24 e 48 horas. O mesmo se verifica para a exposição de 4 horas em que o IC_{50} é ao 1,06 mM tanto para 24 e 48 horas. Comparando a percentagem de proliferação entre as WiDr e as A375, observa-se que o IC_{50} é maior para as WiDr, assim sendo é de salientar que o AA evidenciou um efeito antiproliferativo mais cedo nas A375 visto que o IC_{50} aparece antes dos 5 mM. Para ambas as linhas celulares baixas doses do AA leva a um aumento significativo na proliferação celular, sendo que essas doses diferem entre essas duas linhas.

2.2.2. Avaliação da sobrevivência celular por ensaios clonogênicos

A avaliação da sobrevivência foi feita a fim de confirmar os efeitos pró-oxidantes da vitamina C em células tumorais. Assim os efeitos que poderão surgir, devido à exposição ao AA, são avaliados depois de um longo período de tempo. O gráfico 13, mostra a relação entre a percentagem de sobrevivência das células e a concentração do AA.

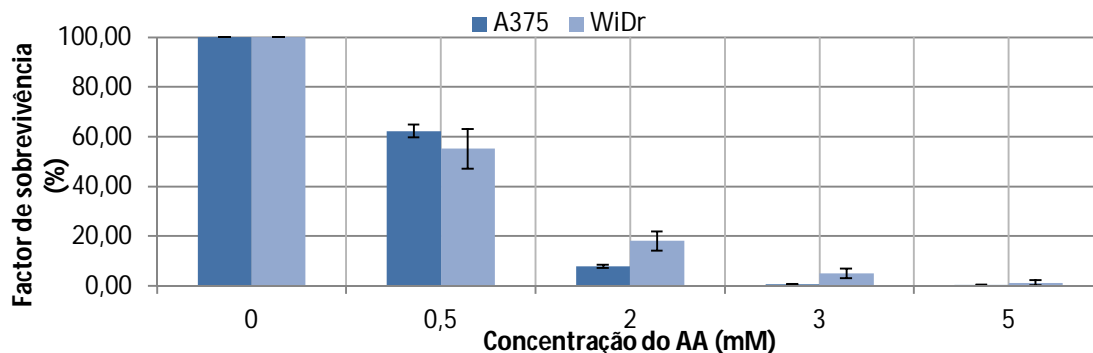


Gráfico 13: Relação entre a percentagem do factor de sobrevivência e a concentração do AA, nas WiDr e A375. As linhas celulares foram tratadas com as concentrações referidas no gráfico. Os resultados são a média de três estudos independentes.

Observa-se que à medida que a concentração do AA aumenta, o factor de sobrevivência diminui consideravelmente em relação ao controlo. Essa diminuição verifica-se para as duas linhas celulares usadas.

Deste modo, quando as células são tratadas com 0,5 mM do AA a diminuição é de cerca de 40%, tendo as WiDr um valor de 55% e as A375 de 62%. No entanto, esta diferença não é estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Nas concentrações de 2, 3 e 5 mM, a redução do factor de sobrevivência é evidente, sendo sempre superior a 80%. As A375 apresentam uma maior sensibilidade ao AA quando são incubadas com concentrações de 2 e 3 mM em relação às WiDr. Quando as células são incubadas com 5 mM, o factor de sobrevivência das A375 é $0,42 \pm 0,18\%$ e das WiDr é $1,26 \pm 1\%$. As diferenças observadas entre as duas linhas celulares apresentam resultados estatisticamente significativos para concentrações de 2, 3 e 5 mM, sendo que as A375 aparecem como as células mais sensíveis ao aumento de concentração do AA em relação às WiDr. A redução do factor de sobrevivência observada para as A375 varia

entre 37,4% a 99,58% e nas WiDr entre 44,88% a 98,74% quando a concentração vai de 0,5 a 5 mM. Na figura 6 podemos observar a diferença entre o número de colónias observadas nas placas de WiDr e A375 tratadas com AA e nos poços controlos. É visível a redução do número de colónias formado entre o controlo e o poço com 2mM.

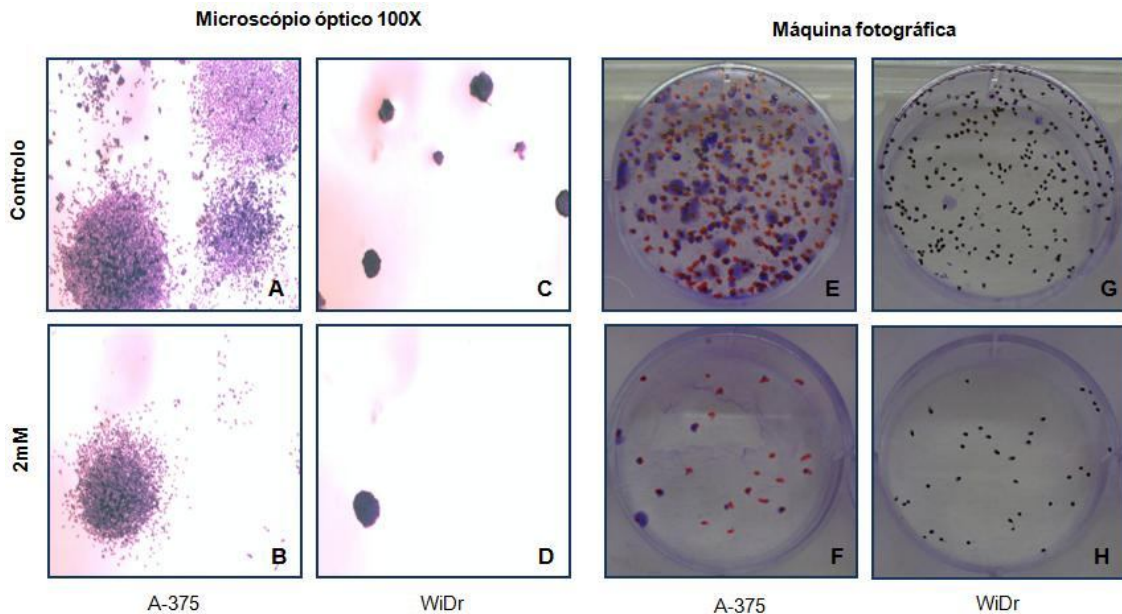


Figura 6: Visualização das colónias formadas. Controlo visualizado no microscópio óptico - A375 (A) e WiDr (C) e o número de colónias formadas após a exposição das células a 2 mM de AA - A375 (B) e WiDr (D). Visualização macroscópica das colónias referentes ao controlo - A375 (E) e WiDr (G) e colónias formadas após exposição das células a 2 mM de AA - A375 (F) e WiDr (H).

2.3. Estudos de estabilidade da vitamina C

Os resultados obtidos no HPLC pela detecção UV de diferentes amostras de modo a avaliar a estabilidade das duas formas de vitamina C foram feitos em culturas celulares de adenocarcinoma colorectal (WiDr). Esses estudos permitiu-nos de certa forma avaliar o influxo das duas formas da vitamina C (AA e DHA) e o seu comportamento *in vitro*. Amostras padrão de DMEM, AA e DHA foram injectadas no HPLC, onde pela integração gráfica foi possível determinar os tempos de retenção correspondentes. No gráfico 14 estão representados os cromatogramas correspondentes a essas injeções e os seus tempos de retenção estão descritos na tabela 6, onde está representada a média de 3 injeções independentes.

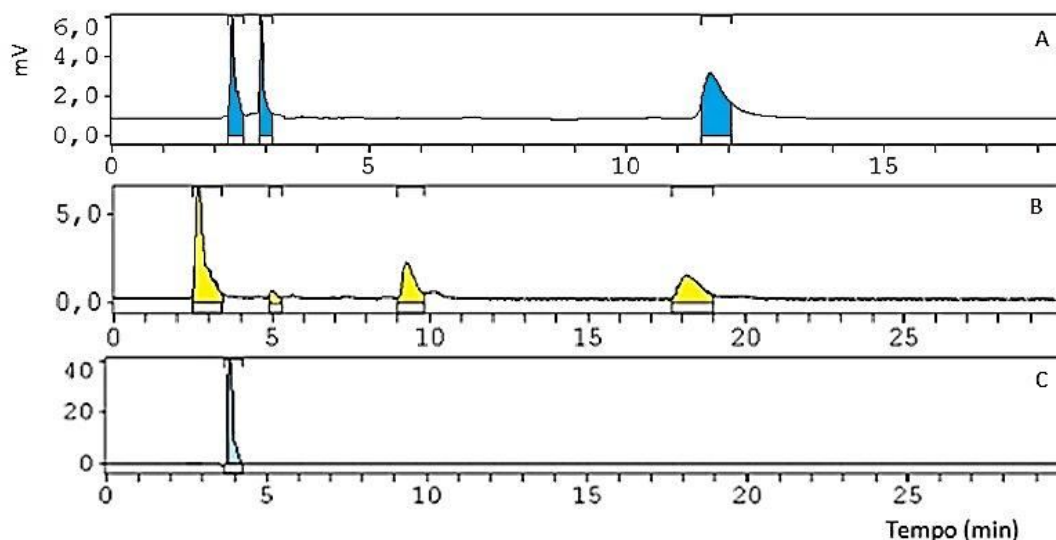


Gráfico 14: Cromatogramas das amostras padrão injectadas no HPLC. A – Amostra do DHA (10 mM). B – Amostra DMEM. C – Amostra do AA (10mM).

Na tabela 6, os diferentes picos do DMEM e DHA foram identificados por DMEM1, até DMEM4, e DHA1 até DHA3 por desconhecimento dos compostos individuais destes. Desta feita, verifica-se que o DMEM apresenta vários picos de detenção devendo-se ao facto de ser constituído por uma mistura de vários compostos diferentes. Pela injeção das amostras padrão, foi possível ver que tal como o DMEM, o DHA apresenta mais do que pico de retenção demonstrando que é composto por várias substâncias, podendo também ser devido a sua alta instabilidade em solução, mas também como a suas propriedades ainda são poucas conhecidas o cromatograma pode sofrer alterações ao longo do tempo.

Tabela 6: Médias dos tempos de retenção referentes a 3 amostras de AA, DHA e DMEM analisadas por HPLC.

Amostras	Tempos de retenção	Deteccção
AA	3,99±0,05	UV
DHA 1	2,33±0,02	UV
DHA 2	2,92±0,01	UV
DHA 3	11,64±0,06	UV
DMEM 1	2,52±0,13	UV
DMEM 2	4,34±0,68	UV
DMEM 3	8,11±0,82	UV
DMEM 4	14,69±1,71	UV

A determinação dos referidos tempos de retenção foi de extrema importância para a distinção entre cada composto presente na amostra injectada. A análise da estabilidade das duas formas da vitamina C foi feita incubando células de WiDr com 10 mM de AA e DHA, em que os seus resultados foram obtidos após 1, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. O pH das amostras foi determinado para todos os tempos, assim podemos verificar se o pH do meio leva a oxidação do AA em DHA ou a redução deste em AA. No gráfico 15 estão representados os cromatogramas das amostras de todos os tempos de incubação com o AA. De igual modo o DMEM foi incubado para todas as horas que foram feitas o estudo, contudo os cromatogramas foram todos semelhantes com o passar do tempo pelo que se apresentou um deles, somente para comparação.

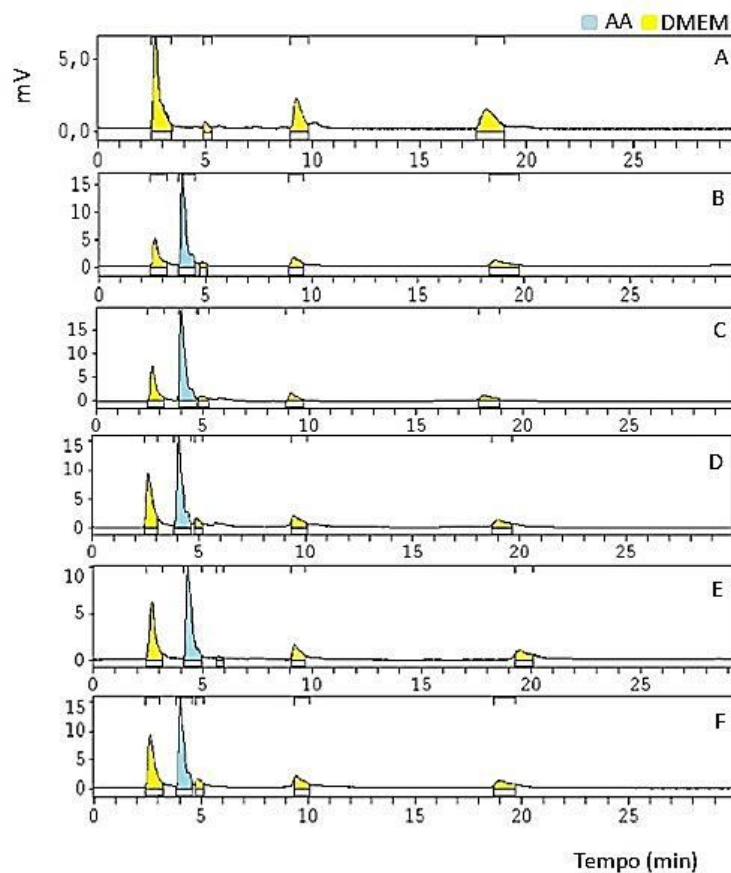


Gráfico 15: Cromatogramas de amostras de DMEM com 10 mM de AA. A – Cromatograma correspondente à injeção do DMEM com 24 horas de incubação. B – Cromatograma de DMEM e AA para 1 hora de incubação. C - Cromatograma de DMEM e AA para 24 hora de incubação. D - Cromatograma de DMEM e AA para 48 hora de incubação. E - Cromatograma de DMEM e AA para 72 hora de incubação. F - Cromatograma de DMEM e AA para 96 hora de incubação.

O AA, apresenta um tempo de retenção de $3,85 \pm 0,03$ minutos, valor determinado anteriormente no controlo de qualidade do $^{99m}\text{Tc-AA}$ (gráfico 1).

Como referido anteriormente o DHA apresenta 3 picos de detenção podendo estas variar ao longo do tempo, dificultando assim a análise gráfica. Além disso, pela análise dos tempos de retenção representados na tabela 6, podemos ver que o 1º pico do DHA e o 1º pico do DMEM apresentam tempos de retenção muito próximos, como $2,33 \pm 0,05$ e $2,52 \pm 0,13$ minutos respectivamente, o que poderá levar a sobreposição destes quando fizerem parte da mesma amostra. No gráfico 16, podemos verificar que de facto os primeiros picos de DMEM e do DHA aparecem sobrepostos.

Pela análise dos gráficos 15 e 16, verifica-se que não há nenhum indício da formação do DHA a partir do AA, e nem do DHA para o AA, pois nos cromatogramas em que apresentam a incubação com AA não há picos com tempos de retenção semelhante ao do DHA e nos em que foram incubadas com DHA também não existem picos com tempo de retenção semelhante ao AA. No que diz respeito a variação do pH do meio verificou-se que na incubação do DMEM sem tratamento com a vitamina C, o pH diminuiu da 1 hora para 96 horas de 7,07 para 6,63. Quando o DMEM foi incubado com o AA verificou-se também uma diminuição do pH de 6,93 para 5,92, do mesmo modo quando o DMEM foi incubado com DHA, o pH diminuiu de 6,85 para 6,34, ao longo do tempo. Contudo, para ambos os casos a variação do pH não teve consequências no processo de oxidação/redução das duas formas da vitamina C.

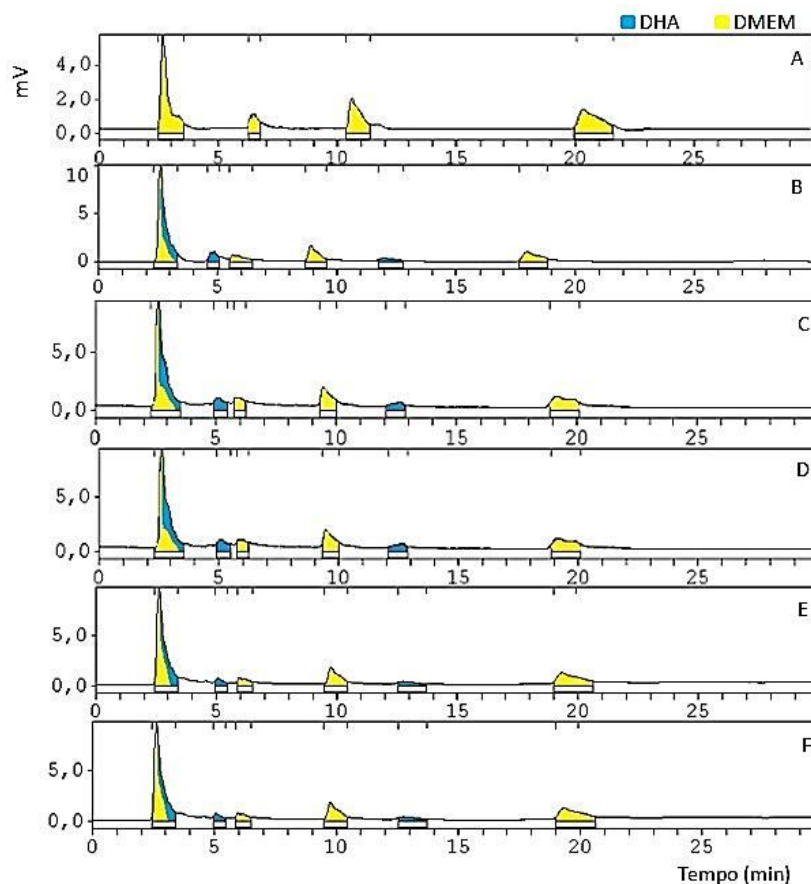


Gráfico 16: Cromatogramas de amostras de DMEM com 10 mM de DHA. A – Cromatograma correspondente à injeção do DMEM com 24 horas de incubação. B – Cromatograma de DMEM e DHA para 1 hora de incubação. C – Cromatograma de DMEM e DHA para 24 hora de incubação. D – Cromatograma de DMEM e AA para 48 hora de incubação. E – Cromatograma de DMEM e DHA para 72 hora de incubação. F – Cromatograma de DMEM e DHA para 96 hora de incubação.

2.3.1. Avaliação do meio extracelular

Após a avaliação da estabilidade das duas formas da vitamina C em culturas celulares e por não haver transformação de uma forma noutra, os estudos de avaliação do meio permitem determinar indirectamente os mecanismos de transporte destas. Nestes estudos, avalia-se o meio extracelular, após incubação com três concentrações diferentes de AA e DHA, para 1, 24, 48, 72 e 96 horas.

Os resultados correspondentes à incubação com o AA estão representados no gráfico 18 e para o DHA no gráfico 19. Para termo de comparação as células foram incubadas com DMEM para todos os tempos, tendo assim identificados os diferentes tempos de retenção

representados no quadro 2. Para diferenciar os picos desses estudos foram identificados com C (de controlo) e enumerados conforme o número de picos observados.

Quadro 2: Média dos tempos de retenção (com n=6) referentes à amostras controlo analisadas no HPLC.

Amostras Controlo	Tempo de retenção (min)
C1	2,61±0,11
C2	4,04±0,25
C3	5,77±0,67
C4	12,44±1,49

Os controlos foram incubados durante 1 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, para servir de referência para a comparação com os tempos de retenção das amostras que foram tratadas com AA e DHA. O gráfico 17 A e 17 B representa dois cromatogramas de duas amostras controlo relativa a 1 h e 96 horas, respectivamente. Como se verifica a incubação do DMEM sem tratamento com a vitamina não apresenta variações a nível cromatográfico.

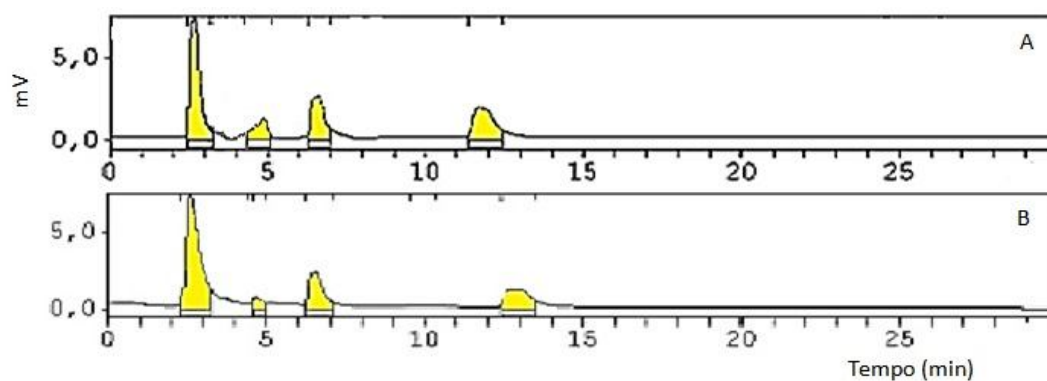


Gráfico 17: Cromatograma de amostras controlo. A – 1 hora de incubação. B – 96 horas de incubação.

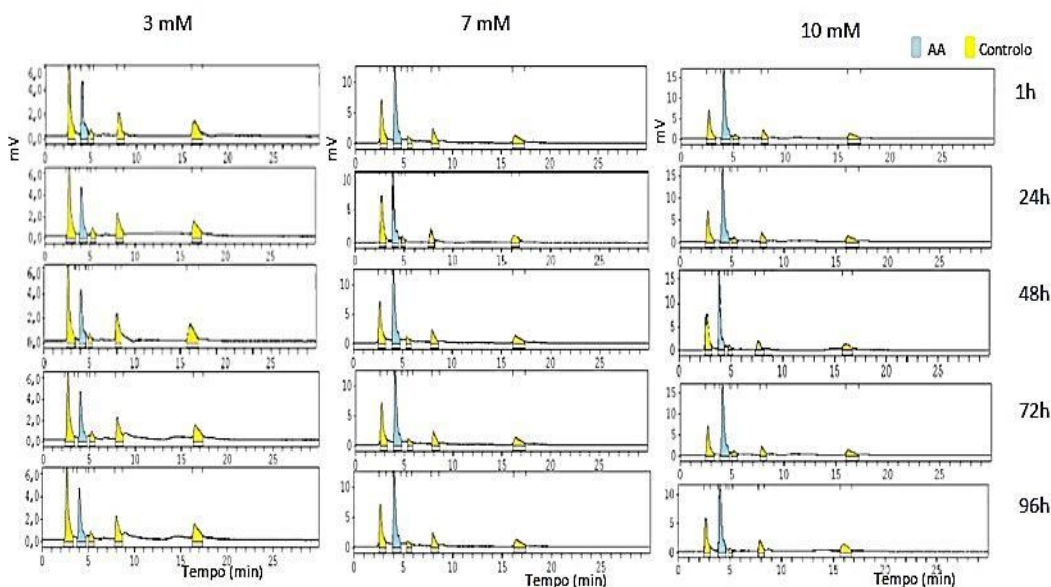


Gráfico 18: Estudo comparativo para a valiação do meio extracelular após incubação com AA. A WiDr foram tratadas durante 1, 24, 48, 72 e 96 na presença do AA e na ausência (C) com três concentrações referidas no gráfico. Após injeção no HPLC os respectivos tempos de retenção foram comparados bem como as áreas por integração gráfica.

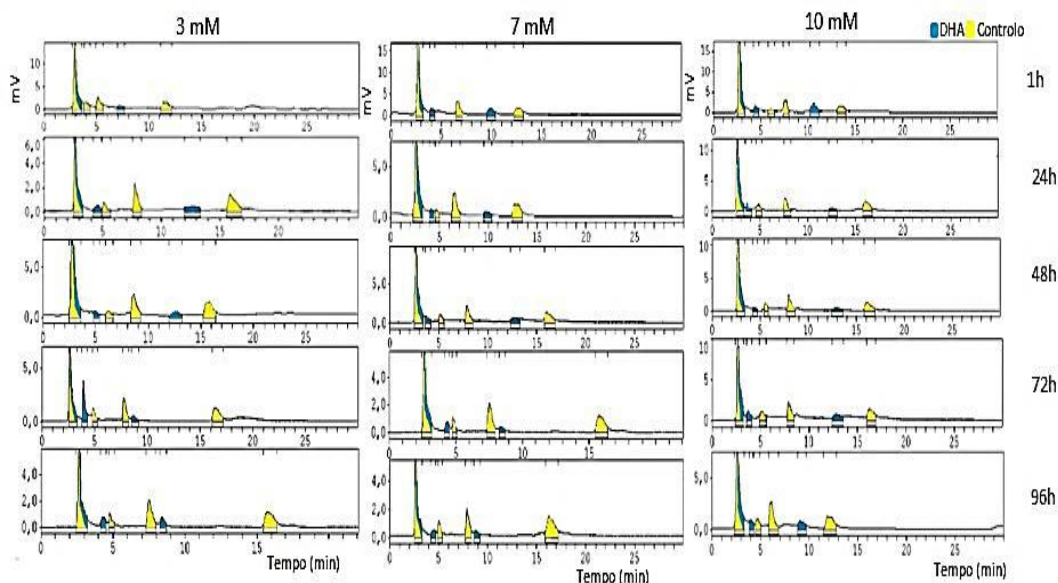


Gráfico 19: Estudo comparativo para a valiação do meio extracelular após incubação com DHA. A WiDr foram tratadas durante 1, 24, 48, 72 e 96 na presença do DHA e na ausência (C) com três concentrações referidas no gráfico. Após injeção no HPLC os respectivos tempos de retenção foram comparados bem como as áreas por integração gráfica.

Através da integração gráfica foi possível determinar os tempos de retenção de cada pico bem como a área destes. Pelo estudo da linearidade do HPLC, em que se injectaram 5 amostras de AA em concentrações diferentes verificou-se que a área do pico é proporcional à concentração das amostras injectadas. Como pode-se ver no gráfico 20, os dados da

concentração *versus* área aproxima-se de uma equação linear igual a $y=85,17x+ 4,7927$, sendo o valor de $R^2 = 0,998$.

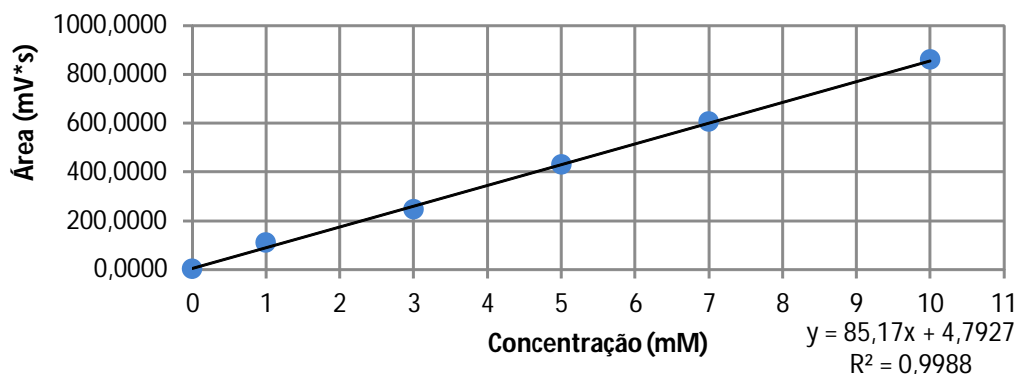


Gráfico 20: curva de calibração para determinar a linearidade da detecção UV. Foram injectadas cinco amostras de AA com as concentrações apresentados no gráfico.

Tendo em conta que a área do pico é proporcional à concentração do analito presente na amostra e como nos estudos de avaliação do meio queremos avaliar a entrada ou não das duas formas de vitamina C nas células WiDr, torna prescindível a avaliação das áreas dos picos correspondentes ao AA e DHA ao longo do tempo. Assim os gráficos 21, 22, e 23 representam a evolução das áreas dos picos de AA e DHA para 3, 7 e 10 mM respectivamente.

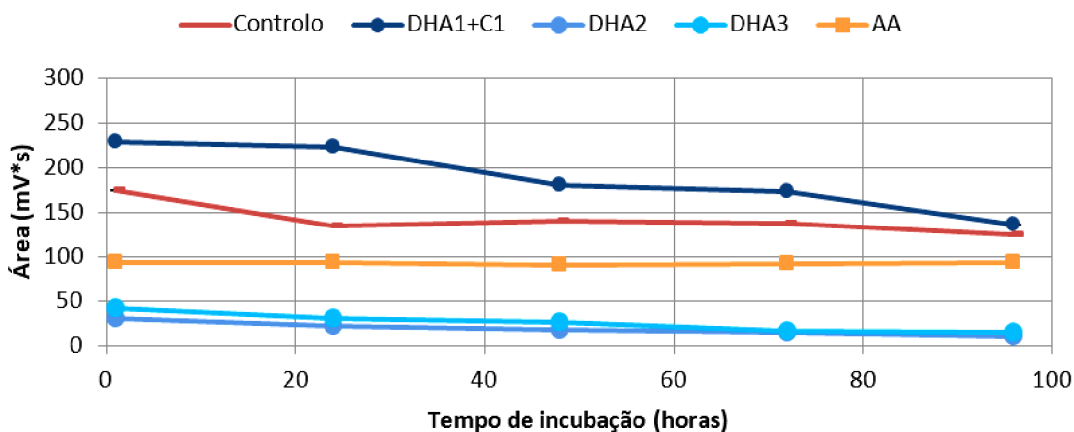


Gráfico 21: Análise do comportamento do AA e DHA no meio extracelular para concentração de 3 mM. Após integração gráfica dos cromatogramas evidenciados nos gráficos 17, 18 e 19, foi feita a análise comparativa entre as áreas dos picos do AA e DHA ao longo do tempo.

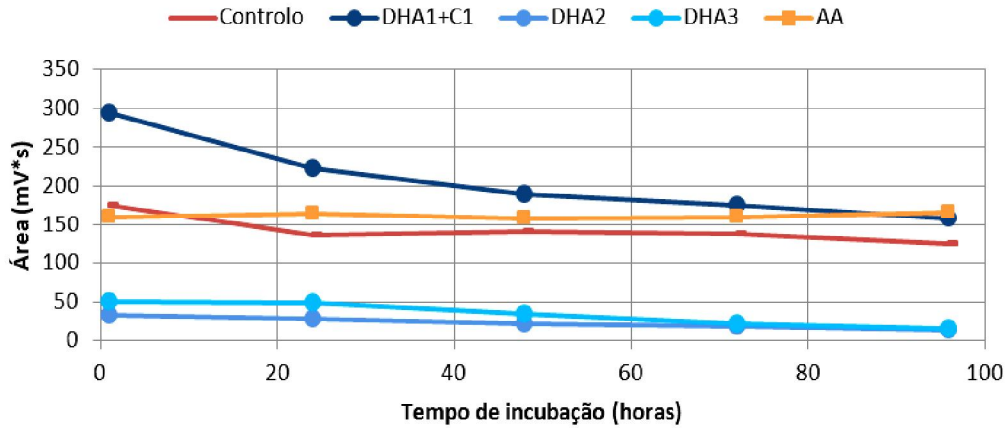


Gráfico 22 : Análise do comportamento do AA e DHA no meio extracelular para concentração de 7 mM. Após integração gráfica dos cromatogramas evidenciados nos gráficos 17, 18 e 19, foi feita a análise comparativa entre as áreas dos picos do AA e DHA ao longo do tempo.

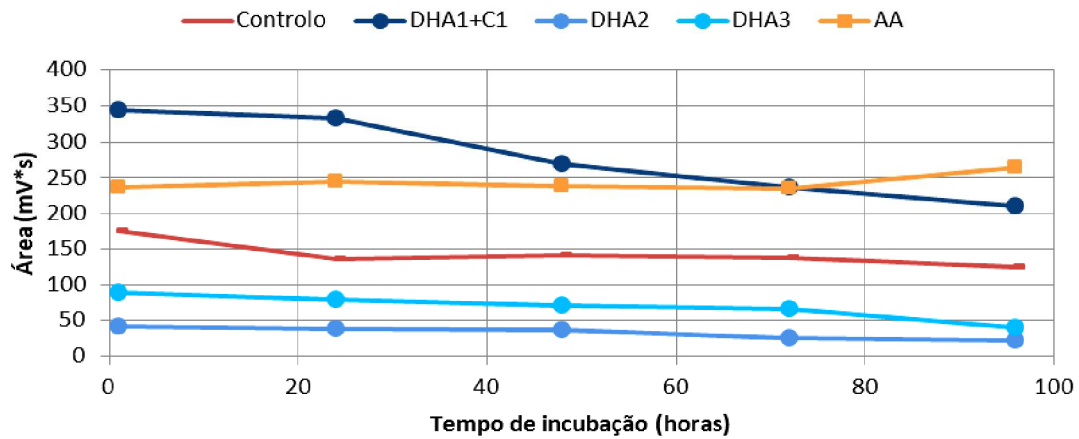


Gráfico 23: Análise do comportamento do AA e DHA no meio extracelular para concentração de 10 mM. Após integração gráfica dos cromatogramas evidenciados nos gráficos 17, 18 e 19, foi feita a análise comparativa entre as áreas dos picos do AA e DHA ao longo do tempo.

Pelo que foi observado nos cromatogramas do gráfico 19, o pico DHA1 aparece sobreposto ao do controlo (C1). Pelo que se confirma, a partir da análise dos gráficos 21, 22 e 23, visto que para todas as concentrações a área do pico identificado como DHA1+C1 apresenta sempre um valor máximo superior a detecção correspondentes ao controlo, o que nos leva a crer que realmente os DHA1 e C1 aparecem sobrepostos. Além disso verifica-se uma ligeira diminuição nas áreas do DHA2 e DHA3, para todas as concentrações ao longo do tempo, e essa mesma diminuição verifica também para o pico DHA1+C1, podendo ser a diminuição do DHA1 o responsável. Assim podemos dizer que houve consumo celular do DHA

ao longo do tempo. De notar que nesses gráficos o controlo só é relevante para a comparação com a área do A1+C1.

Por outro lado ao comparar a área dos picos do AA, verifica-se que para todas as concentrações a área do pico permanece semelhante ao longo do tempo, podendo estar a incapacidade que as células tumorais apresentam em transportar essa forma da vitamina C envolvida

3. Estudos *in vivo*

A realização dos estudos *in vivo* foi com o intuito de comprovar/esclarecer os resultados obtidos tanto no controlo de qualidade do composto marcado como os obtidos nos estudos de captação realizados *in vitro*. Nesta via procedeu-se ao desenvolvimento do modelo de xenotransplante de células de adenocarcinoma de cólon (WiDr) em ratinhos atímicos *Balb/c nu/nu*, fez-se também estudos de biodistribuição e farmacocinética do $^{99m}\text{Tc-AA}$, em ratinhos normais e portadores de xenotransplantes. Além disso, a avaliação da inibição do crescimento tumoral pela acção da forma reduzida da vitamina C (AA), foi realizada.

3.1. Estudos de Biodistribuição em ratinhos normais com $^{99m}\text{Tc-AA}$

Para uma melhor análise e compreensão dos resultados obtidos a partir da biodistribuição do radiofármaco em ratinhos *Balb/c nu/nu* portadores de xenotransplantes é fundamental conhecer a sua biodistribuição em ratinhos *Balb/c nu/nu* normais para poderem apreciar eventuais diferenças nos modelos. Além disso, estes estudos fornecem-nos a informação acerca das vias de excreção do radiofármaco.

De acordo com o gráfico 24(A e B), obtido após os estudos de biodistribuição com $^{99m}\text{Tc-AA}$ e respectiva quantificação de dose injectada por grama de órgão, mostra, essencialmente, excreção por via urinária (rim, urina e bexiga) e, também, via ciclo entero-hepático (fígado, vesícula biliar e biliar).

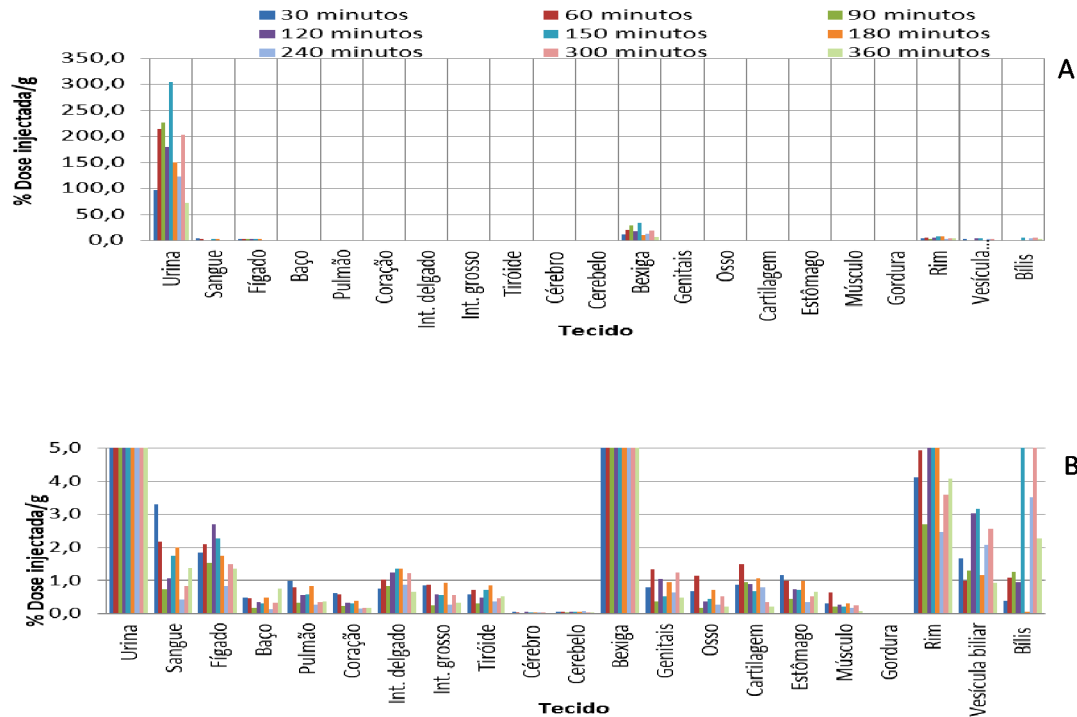


Gráfico 24: A - Biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-AA}$. Depois de passados os tempos, descritos nos gráficos, da administração do radiofármaco, os ratinhos foram sacrificados, os órgãos colhidos e a percentagem de dose injectada por grama de tecido quantificada. B - Fracção percentual do gráfico A.

Para além dos órgãos onde se dão a excreção não se verifica nenhuma captação preferencial do $^{99m}\text{Tc-AA}$ por nenhum órgão em particular. Contudo verifica-se a % de captação no intestino delgado vai aumentando ao longo do tempo até aos 150 minutos onde se dá a maior captação (1,37%).

3.2. Estudos de Biodistribuição em ratinhos normais com $^{99m}\text{Tc-AA}$

De notar que os resultados referentes aos estudos de biodistribuição em ratinhos portadores de xenotransplantes foram surpreendentemente diferentes aos obtidos na biodistribuição em ratinhos normais. Como se pode ver no gráfico 25 A e B, existem órgãos que captam preferencialmente o $^{99m}\text{Tc-AA}$, como é o caso da tiróide do estômago do músculo e da cartilagem, em que nos normais não se verificam.

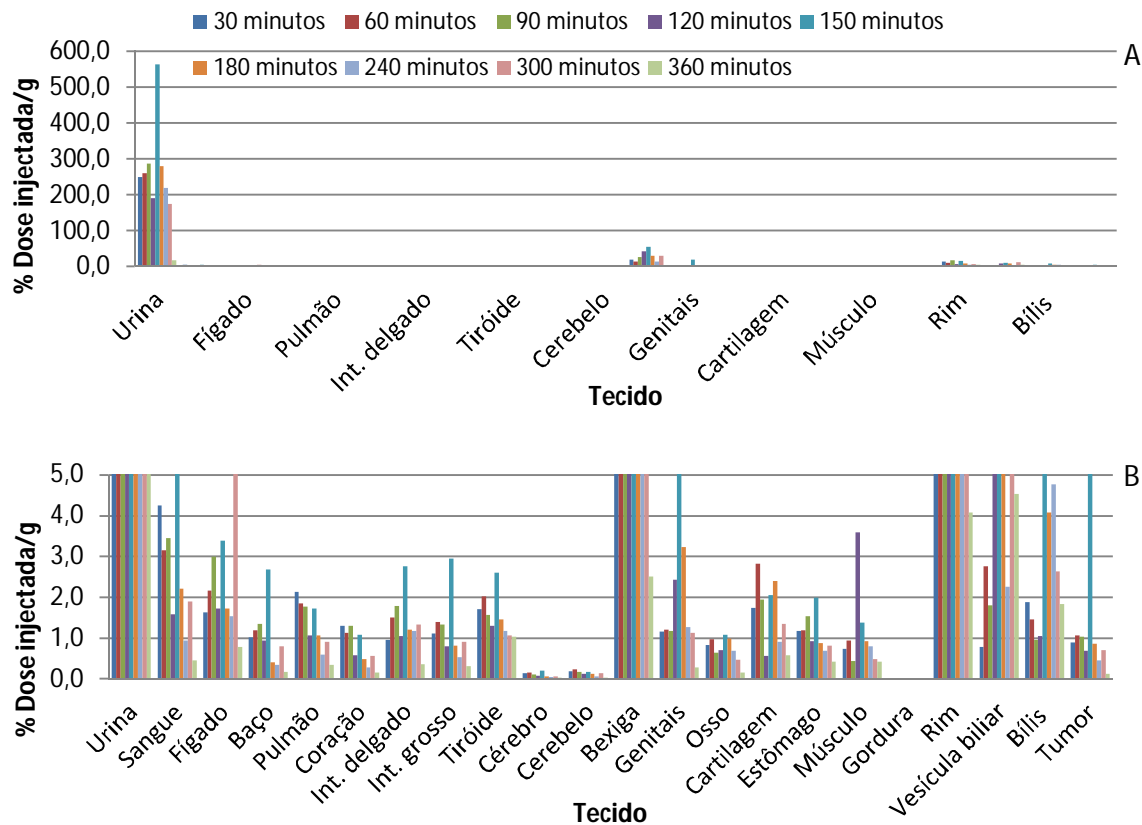


Gráfico 25: A - Biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-AA}$ em ratinhos portadores de xenotransplantes. Depois de passados os tempos, descritos nos gráficos, da administração do radiofármaco, os ratinhos foram sacrificados, os órgãos colhidos e a percentagem de dose injectada por grama de tecido quantificada. B - Fração percentual do gráfico A

Contudo os órgãos com maior captação continuam a ser os responsáveis pela excreção. Estes resultados puseram em causa a veracidade do valor da eficiência de marcação obtida no controlo de qualidade, pois um radiofármaco tendo o tecnécio como radionuclídeo, ao ter uma baixa eficiência de marcação, ou seja presença de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (^{99m}Tc -livre), este, numa biodistribuição, vai preferencialmente para a tiróide, plexus e estômago. Contudo essa hipótese foi posta de lado porque com a mesma formulação farmacêutica, apresentando uma elevada eficiência de marcação obtida no HPLC, foi realizada um estudo de biodistribuição em ratinhos *Balb/c nu/nu* normais e com xenotransplantes e os resultados permaneceram iguais.

Deste modo e como os ratinhos *Balb/c nu/nu* normais e os atímicos poderão ter diferenças que influenciam a biodistribuição da vitamina C, procedeu-se a realização de

estudos de biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-AA}$ em ratinhos *Balb/c nu/nu* atímicos sem xenotransplantes para servir de comparação.

De facto observou-se muita diferença na captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ entre esses dois grupos. Como se pode verificar no quadro 3 nos tecidos (não sendo de excreção) como pulmão, coração, tiróide, cérebro, estômago, cartilagem, cerebelo e intestino grosso a captação dos ratinhos *Balb/c nu/nu* atímicos é sempre o dobro da captação dos ratinhos *Balb/c nu/nu* normais, apresentando como 4 vezes mais para a tiróide. Essa razão aumenta para sete vezes até 11 vezes mais para tecidos como os genitais, osso e músculo respectivamente.

Quadro 3: Análise da razão entre a captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ em ratinhos *Balb/c nu/nu* atímicos e normais.

Tecido	<i>Balb/c nu/nu</i> normais	<i>Balb/c nu/nu</i>	Razão
Urina	96,3281	472,0481	4,900418
Sangue	3,3046	5,4023	1,634809
Fígado	1,8336	1,4215	0,775278
Baço	0,4859	0,8312	1,71077
Pulmão	1,0057	2,6575	2,642326
Coração	0,6140	1,7214	2,803415
Int. delgado	0,7688	1,4915	1,940118
Int. grosso	0,8462	1,8590	2,196964
Tiróide	0,5844	2,5816	4,417282
Cérebro	0,0559	0,1396	2,496118
Cerebelo	0,0675	0,2123	3,146048
Bexiga	10,4954	33,6897	3,20995
Genitais	0,8081	5,9786	7,398365
Osso	0,6846	5,2630	7,688063
Cartilagem	0,8797	3,3600	3,819301
Estômago	1,1783	2,7918	2,369302
Músculo	0,3043	3,4582	11,36341
Rim	4,1172	12,4359	3,020515
Vesícula biliar	1,6798	1,7258	1,02735
Bílis	0,4019	0,4455	1,108548

Desta feita procedeu-se à análise dos resultados obtidos na biodistribuição de $^{99m}\text{Tc-AA}$ em ratinhos *Balb/c nu/nu*, uma vez que os dados não foram influenciados pela qualidade do nosso composto, mas sim pelo próprio metabolismo do animal.

Para a avaliação da captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ pelo tecido tumoral foi calculada a % percentagem de captação por grama de tecido tumoral, sendo que o seu valor foi sempre inferior 1,5 % excepto aos 150 minutos tendo como a captação 5,3% por grama do tecido tumoral, de acordo com o gráfico 26.

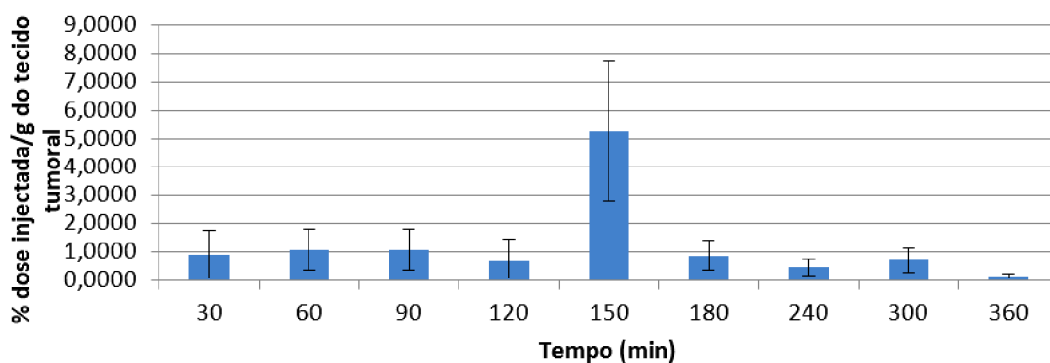


Gráfico 26: Percentagem da actividade administrada por grama de tecido tumoral.

Para além da percentagem de actividade administrada por grama de tecido tumoral, também foi determinado para cada tumor as razões entre as captações do tumor e do osso e entre o tumor e o sangue. Para cada tumor, após o sacrifício dos animais, foi calculado o volume através da medição dos seus eixos maior e menor.

De acordo com os resultados obtidos, para as razões entre as percentagens de captação da actividade administrada por grama de tecido tumoral, e representados gráfico 27. Verifica-se que a razão tumor/osso é sempre maior do que a razão tumor/sangue, sendo que este último apresenta valores sempre a baixo de um, o que significa que ao longo do tempo a captação tumoral foi sempre menor que a do sangue. No que diz respeito a razão tumor/osso,

a captação tumoral é consideravelmente superior à do osso aos 90, 150 e 300 minutos, sendo que aos 150 minutos ela é de cerca de 5 vezes superior.

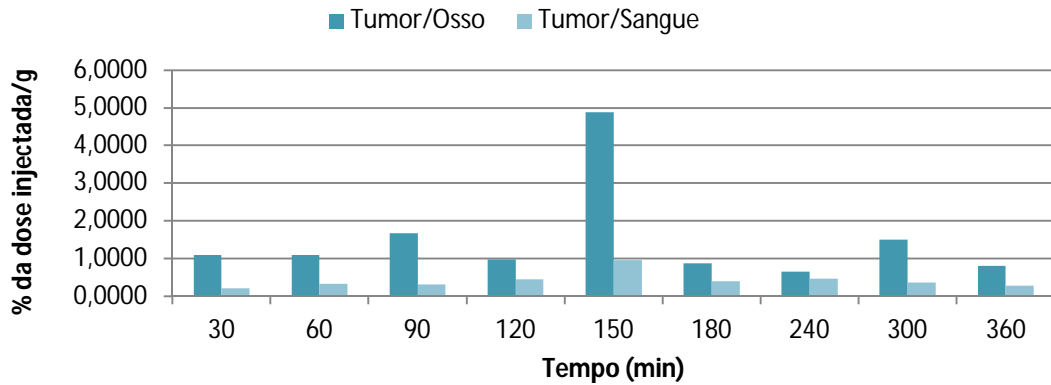


Gráfico 27: Razão entre as captações tumor/osso e tumor/sangue.

Tendo em conta os resultados das razões calculadas verifica-se que a captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ pelos tumores é mínima, apresentando valores inferiores aos sanguíneos.

3.3. Imagiologia com $^{99m}\text{Tc-AA}$

As imagens adquiridas através da câmara de raios gama, imediatamente após a injeção do $^{99m}\text{Tc-AA}$, e visualizadas na estação de trabalho *Xeleris*, após normalização para uma escala de cores apropriada, permitiram identificar o tumor xenotransplantado, bem como as vias de excreção através de uma imagem de um ratinho *Balb/c nu/nu* normal, como pode ser observado na figura 7 A e 7 B respectivamente.

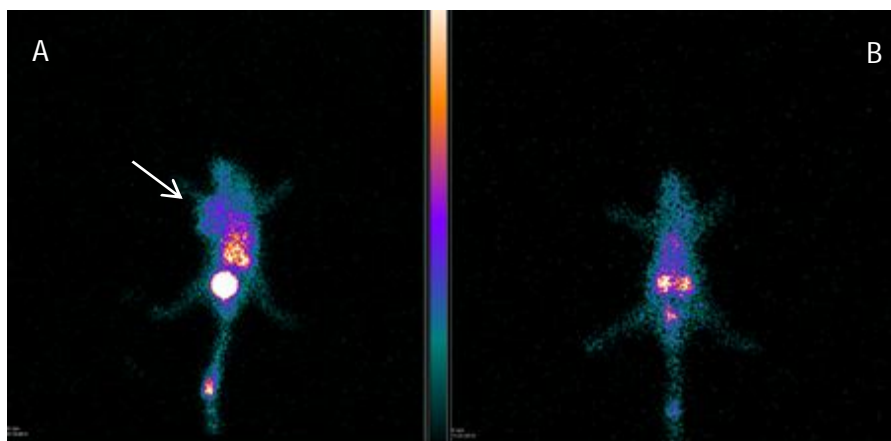


Figura 7: Imagens obtidas através da câmara de raios gama. A - Imagem estática aos 60 minutos após a injeção do $^{99m}\text{Tc-AA}$, de um ratinho com xenotransplante. A seta aponta para a localização do tumor. B - Imagem estática aos 30 minutos após a injeção do $^{99m}\text{Tc-AA}$, de um ratinho normal, onde podem ser vistos os dois rins. Todas as imagens estão referenciadas à mesma escala de cores mostrada.

Estes estudos ao fim ao cabo veio confirmar os estudos de captação realizados *in vitro* relativo às células WiDr, visto que a captação tumoral *in vivo* do tecido tumoral é considerada baixa e pela visualização da figura 7A, o radiofármaco não é captado o suficiente para a evidente visualização deste.

3.4. Avaliação do crescimento tumoral *in vivo* após tratamento com AA

Após a avaliação da citotoxicidade da vitamina C *in vitro* que apresentou alguma função antineoplásica, diminuindo a proliferação celular, logo despertou a curiosidade para avaliar essa citotoxicidade *in vivo*. Para isso, fez-se um estudo durante um período de vinte dias em que se procedeu ao tratamento com AA de ratinhos *Balb/c nu/nu* portadores de xenotransplantes.

Ao fim desse tempo foi possível traçar-se uma curva da taxa de crescimento tumoral comparando o grupo controlo, em que não recebeu tratamento e o grupo que recebeu tratamento. Os resultados estão apresentados no gráfico 28.

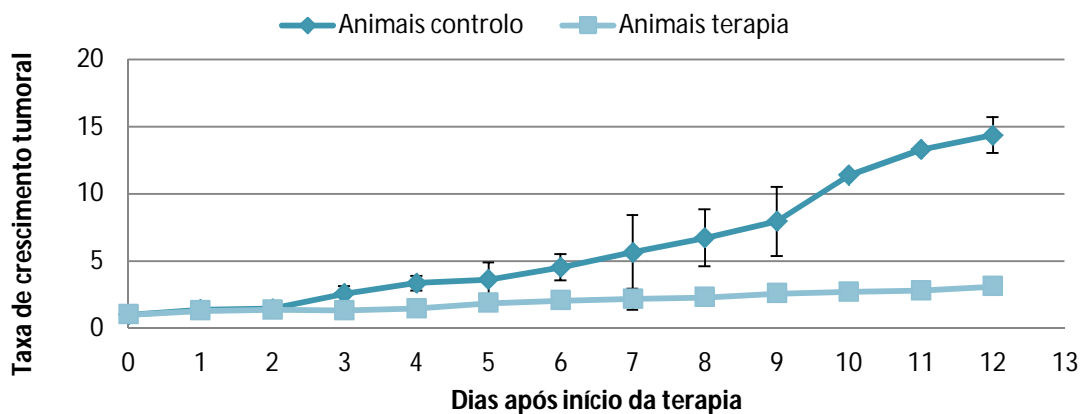


Gráfico 28: Resposta *in vivo* das WiDr ao tratamento com o AA. O resultado é uma média de n=6 para cada grupo.

Como se observa no gráfico 28, a partir do 3º dia após o tratamento começou uma atenuação no crescimento tumoral do grupo com tratamento, mas essa atenuação no crescimento tumoral só é significativa a partir do 8º dia após o início de tratamento.

Capítulo IV – Discussão

No presente trabalho foi avaliado o papel da vitamina C no tratamento e prevenção do cancro através de estudos recorrendo a técnicas como a medicina nuclear e biologia molecular. Os resultados obtidos poderão ter um contributo de grande importância no desenvolvimento de novas metodologias relacionando a vitamina C e o cancro, que ainda continua a ser algo controverso.

O desenvolvimento do radiofármaco, tendo a forma reduzida da vitamina C (AA) como ligando e o tecnécio-99m (^{99m}Tc) como radionuclídeo, foi possível devido a outros autores que desenvolveram protocolos de marcação semelhantes (Stapleton et. al., 1967, Yigit, 2006).

Para a marcação radioactiva da forma reduzida da vitamina C (AA), foi necessário ter em conta alguns aspectos químicos dos diferentes compostos em questão. O pertecnetato de sódio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$), eluído a partir de um gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, é o composto a partir do qual se obtém tecnécio no estado de oxidação +7 e, por isso, fortemente deficiente em electrões. Para o desenvolvimento de uma formulação radiofarmacêutica, sendo que o ^{99m}Tc tem que ser reduzido a estados de oxidação inferiores (III ou IV), daí a necessidade de um agente redutor. Deste modo, o agente redutor usado foi o cloreto de ferro (III) (FeCl_3) com a função de ceder electrões ao ^{99m}Tc e assim diminuir o seu estado de oxidação.

Assim, depois de ter em conta os aspectos químicos, as condições físicas do processo de marcação foram testadas de modo a obter uma boa eficiência de marcação. Assim, como primeiro passo procedeu-se a adição do FeCl_3 ao ^{99m}Tc , nessa junção não se espera que haja reacção entre eles pois o FeCl_3 (III) não possui electrões para ceder ao ^{99m}Tc . Só posteriormente, quando é adicionado o AA, é que irá ocorrer a oxidação do cloreto de ferro (III) com a formação de cloreto de ferro (II). Por sua vez, o cloreto de ferro (II) cede electrões ao $^{99m}\text{Tc(VII)}$ reduzindo-o a $^{99m}\text{Tc(III)}$ ou $^{99m}\text{Tc(IV)}$. Nestes estados de oxidação torna-se então possível a formação do complexo de $^{99m}\text{Tc-AA}$, que poderá, ou não, incluir o cloreto de ferro na sua constituição. Assim, é necessário ter as quantidades óptimas de todos os constituintes do

kit, principalmente entre o agente redutor e o ligando, tendo sido estas optimizadas e chegando às quantidades de 0,2 ml de FeCl₃ e 200 mg do AA. Para além disso, a temperatura em que se realiza a marcação e o tempo de incubação do *kit* é importante ter em conta. Nesse sentido, a primeira tentativa foi de marcação a 0°C o que revelou uma baixa estabilidade da solução em que a maior eficiência se observou 24 horas após a marcação, o que é inviável quando se trata de um composto de tecnécio, por ter 6 horas de período de semi-desintegração. Por cauda desta particularidade do tecnécio, espera-se que uma marcação radiactiva com ele tenha um tempo de incubação entre 10 a 30 minutos e que a sua estabilidade seja de pelo menos 6 horas (Liu and Edwards, 1999). Contudo, quando a marcação passou a ser feita a temperatura ambiente o tempo de incubação diminuiu para 30 minutos, e o *kit* manteve-se estável até 24 horas após a marcação. A relativa complexidade da reacção de formação do complexo ^{99m}Tc-AA pode ser a razão pela qual se verificam diferenças na eficiências de marcação quando há alterações na temperatura.

Após a marcação, a determinação da pureza radioquímica foi necessária para confirmar se as condições são óptimas para a obtenção de elevado grau de pureza do ^{99m}Tc-AA. A técnica cromatográfica HPLC permitiu identificar os diferentes componentes do composto, bem como determinar a eficiência de marcação alcançada. O protocolo desenvolvido no HPLC, mostrou ser eficiente para a realização da separação analítica uma vez que das análises feitas, a resolução da coluna, a sua selectividade e a eficiência com que dois compostos são separados mostraram estar dentro dos valores padrão. Apesar do HPLC permitir a determinação da eficiência de marcação pelo cálculo da percentagem de radioactividade pertencente ao ^{99m}Tc-AA em relação a actividade total detectada, não foi totalmente suficiente para a determinação exacta dessa pureza, por não quantificar a presença do ^{99m}Tc-RH. Isso deve-se ao facto do equipamento ter uma pré-coluna que tem poros com 0,1 nm de diâmetro não deixando passar partículas de tamanho superior como é o caso dos constituintes de agregados coloidais, como por exemplo o ^{99m}Tc-RH.

Para além do controlo de qualidade também foram realizados estudos *in vitro* e *in vivo* a fim de estudar a estabilidade do $^{99m}\text{Tc-AA}$ nessas condições. Nos estudos *in vitro*, a captação observada em células de adenocarcinoma colorectal (WiDr) e melanoma melanocítico (A375) não é significativa para nenhuma das linhas celulares, pois apresentam captações de 0,45% e 0,36%, respectivamente, tendo estes a mesma ordem da captação do $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Por outro lado, quando comparamos a captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ nas WiDr verificamos que esta é sempre inferior à captação do $^{99m}\text{TcO}_4^-$, só não o é, aos 5 e aos 120 minutos onde é ligeiramente superior (gráfico 8). Em relação às células de melanoma melanocítico utilizadas (A375), a captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ apresenta valores superiores à captação do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em alguns tempos (45, 60 e 120 minutos) mas, no entanto, a diferença não é significativa por apresentar um desvio-padrão grande, tornando assim estatisticamente não significativo (gráfico 9). No entanto, ao comparar a captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ nas WiDr esta é superior à das A375.

Com isso pode-se concluir que o radiofármaco por nós desenvolvido, tem uma baixa captação nestas linhas celulares o que poderá ser justificado pela baixa afinidade que as células tumorais apresentam em transportar o AA através da membrana para dentro da célula, pois a expressão dos SVCT nas células tumorais é baixa. A captação observada, uma vez que a formulação usada para este estudo tinha elevada eficiência de marcação, poderá ser devido a dissociação do composto e só entrar dentro da célula o $^{99m}\text{TcO}_4^-$, justificando assim a semelhança entre as captações de $^{99m}\text{Tc-AA}$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ observadas nas duas linhas celulares. Essa conclusão foi fundamentada pelos estudos de biodistribuição realizados posteriormente.

Ainda relativamente aos estudos *in vitro* os estudos de avaliação da proliferação celular revelaram que a forma reduzida da vitamina C possui um grande potencial na terapia do cancro.

Sabe-se que a vitamina C é um potente antioxidante protegendo as células dos efeitos dos radicais livres, mas também tem um efeito pró-oxidante em concentrações farmacológicas,

sendo essa a função fundamental para o seu potencial terapêutico (Verrax and Calderon, 2008).

Assim sendo, verificamos que ao expor células tumorais ao AA em diferentes concentrações, variando o tempo de exposição e o tempo de repouso destas, a molécula apresenta uma citotoxicidade já que inibe a proliferação nas duas linhas celulares a altas concentrações, sendo estas concentrações diferentes para cada linha celular.

Em relação às células do cólon (WiDr), existem diferenças visíveis quando o tempo de exposição e o tempo de repouso variam. Quando as células foram expostas durante 1 e 4 horas e estiveram a repousar durante 24 horas a diferença entre os IC₅₀ não é significativa, sendo portanto possível de aferir que o tempo de exposição não seria relevante. No entanto, para os mesmos tempos de exposição, mas com 48 horas de repouso as células mostraram um comportamento diferente (gráfico 11). Na exposição de uma hora houve um ligeiro aumento do IC₅₀, podendo estar relacionada com o tempo de repouso onde as células poderão ter desenvolvido um mecanismo de defesa, no entanto, quando expostas as 4 horas e tendo 48 de repouso o IC₅₀ diminuiu de cerca de 50% do observado com 24 horas de repouso para o mesmo tempo de exposição o que leva a crer que, tanto o tempo de exposição como o tempo de repouso é preponderante para desencadear reacções pró-oxidantes nestas linhas celulares. Em relação às A375, estas apresentam um comportamento igual quando varia o tempo de repouso, mas nas 4 horas de exposição verifica-se maior citotoxicidade (gráfico 12).

Para além dos estudos de proliferação celular, uma avaliação mais exaustiva foi feita para avaliar a sobrevivência das células após 12 dias de repouso com duas horas de exposição ao AA. Nesse estudo o objectivo não é só de avaliar o poder anti-proliferativo da vitamina C, mas também verificar se as células que foram expostas ao AA, mesmo não apresentando sinais de lesão ao fim de poucas horas, são capazes de sobreviver. O que se verificou é que para concentrações inferiores ao IC₅₀, obtido nos estudos de proliferação, para as WiDr houve

diminuição na sobrevivência de cerca de 80% (gráfico 13), enquanto que para as A375 essa diminuição ocorre para valores próximos do IC_{50} observado. Neste caso, podemos reforçar a conclusão anterior na citotoxicidade do AA nas A375 não depende do tempo de repouso das células, mas nas WiDr o efeito pró-oxidante é maior quanto maior for o tempo que células têm para repousar. Contudo, o efeito pró-oxidante ocorre por dois processos, dentro da célula pela oxidação do AA em DHA, e fora das células na presença de metais de transição, e pelo pH, em que forma o radical ascorbil que ao reagir com o H_2O_2 e leva à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS)(Li and Schellhorn, 2007; Zhao, et al., 2005). Para verificar qual dos métodos prevalece foram realizados estudos no HPLC a fim de avaliar indirectamente o mecanismo de entrada das duas formas da vitamina C nas células tumorais, bem como o processo oxidação/redução das mesmas em cultura. Verificámos que, em meio de cultura sem actividade metabólica das células, o AA não oxida para o DHA e nem este reduz para o AA, nem mesmo pela acção do pH. Assim, nas células tratadas com AA, detectámos a existência de um pico referente ao AA, mas nenhum relativo ao DHA (gráfico 18). Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados que sugerem que o AA não é capaz de atravessar a membrana das células tumorais, o que justifica a sua permanência no meio extracelular (Verrax and Calderon, 2008). Por outro lado, nas células tratadas com DHA não detectámos a presença de AA (gráfico 19), o que nos leva a concluir, como seria de esperar, que não ocorre formação de AA por redução do DHA no meio extracelular. No entanto, apesar dos cromatogramas apresentarem os picos de retenção do DHA, as áreas destes diminuíram ao longo do tempo, sendo este o facto resultado das células tumorais possuírem uma elevada expressão dos GLUTs e, conseqüentemente, são capazes de transportar o DHA através da membrana pelos GIUT1 e 3. Contudo, a presença do DHA nos cromatogramas é um indicador da saturação ao nível dos transportadores de membrana que, na presença de elevadas concentrações do composto, deixam de o poder transportar (Corpe, et al., 2005; Fransson and Mani, 2007; Verrax and Calderon, 2008). Deste modo, poderá hipoteticamente ser explicado o

efeito citotóxico observado nas células devido a presença extracelular do AA sendo esta responsável pelo maior efeito pró-oxidante.

O efeito pró-oxidante do AA foi também verificado *in vivo* avaliando a taxa do crescimento tumoral em ratinhos *Balb/c nu/nu* portadores de xenotransplantes confirmando o efeito pró-oxidante do AA em concentrações farmacológicas. Ao fim do 3º dia do início de tratamento observou-se uma diminuição no crescimento tumoral sendo esse crescimento considerável quando comparado com o crescimento tumoral do grupo controlo, o que nos leva a inferir que a vitamina C poderá ter um papel importante no tratamento dos determinados tipos de cancro (gráfico 28).

Observamos a partir dos estudos de biodistribuição que o tecido tumoral não apresentou uma captação de forma a ser evidenciado numa imagem de diagnóstico. Essa captação observada *in vivo* é considerada de má qualidade pois apresenta valores muito inferiores aos apresentadas pelo sangue (gráfico 27). Contudo, os estudos de biodistribuição permitiram identificar as vias de excreção e metabolização do radiofármaco, sendo a excreção feita essencialmente pela via renal e hepatobiliar (gráfico 24 A e figura 7B). Após análise dos resultados obtidos e verificando-se diferenças na biodistribuição em ratinhos *Balb/c nu/nu* normais e atímicos é possível concluir que a presença ou não do timo no nosso modelo animal influencia na captação do AA marcado com ^{99m}Tc .

Sendo assim, é certo dizer que a marcação do AA com o ^{99m}Tc , pode não ser útil como traçador para imagem uma vez que não é captada pelas células tumorais *in vitro* nem *in vivo*, sendo por isso considerado um fraco agente imagiológico para diagnóstico. Essa consideração pode ser resultado do desconhecimento da estereoquímica molecular do $^{99m}\text{Tc-AA}$, pois não se sabe a que carbono do AA é que o ^{99m}Tc se liga, sendo essa característica muito importante, na medida em que os carbonos 2 e 3 são os responsáveis em doar os electrões que estão envolvidos na função redutora do AA, bem como na oxidação do AA em DHA (Deutsch, 1998).

Se por acaso o ^{99m}Tc estiver ligado a um destes carbonos, o $^{99m}\text{Tc-AA}$ não apresentará as mesmas funções do AA. O ideal seria uma ligação ao carbono 6 da molécula do AA.

Conclusão

A partir da análise dos resultados obtidos neste trabalho é possível retirar as seguintes conclusões:

No que diz respeito à marcação radioactiva do ácido ascórbico (AA) com o tecnécio-^{99m}, podemos dizer que o protocolo desenvolvido, se mostrou eficiente tendo em conta os elevados valores de eficiência de marcação obtidos assim como a alta estabilidade da formulação farmacêutica. Também o protocolo de controlo de qualidade no HPLC foi eficiente na medida em que a separação dos compostos constituintes do radiofármaco foi feita em condições de alta resolução e sensibilidade do equipamento. Contudo, uma outra técnica complementar ao HPLC deve ser desenvolvido para a detecção do ^{99m}Tc-RH.

Após a marcação, os estudos *in vitro* revelaram que o composto desenvolvido (^{99m}Tc-AA) apresenta fraca captação em células tumorais, comprovando assim, o pressuposto de que as células tumorais, por terem uma baixa expressão dos SVCT, não transportam o AA através da membrana e conseqüentemente não transportam o ^{99m}Tc-AA.

Foi comprovado que a reacção de oxidação/redução do AA em DHA e do DHA em AA, não se verifica *in vitro*, nem mesmo pela acção das alterações do pH.

Comprovou-se também que o AA não atravessa a membrana das células tumorais ao contrário do DHA, isto deve-se ao facto da sobreexpressão dos GLUTs nestas células e ao transporte ser feito por difusão facilitada estando sujeito à saturação dos transportadores com o aumento da concentração do DHA extracelular.

Concentrações fisiológicas (0,5 mM) do AA tem efeito proliferativo nas células tumorais e concentrações farmacológicas apresentam uma acção anti-proliferativa pelo aumento da produção de ROS extracelular, visto que o AA não entra na célula.

A avaliação do efeito pró-oxidante do AA nas células de adenocarcinoma colórectal (WiDr) e melanoma (A375) revelou que nas A375 o efeito citotóxico é proporcional ao tempo de exposição enquanto que nas WiDr, o efeito citotóxico é proporcional ao tempo de repouso após a exposição, facto que pode ser importante no tratamento de cancro. No entanto, são necessários estudos em células normais a fim de avaliar se a citotoxicidade é ou não selectiva, pois os estudos apontam para que altas concentrações do AA não são citotóxicas para células normais ao contrário do que acontece para as células tumorais (Chen, et al., 2007b).

Nos estudos de biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-AA}$, este apresentou excreção pelas vias renal e hepatobiliar.

O potencial imagiológico apresentado pelo composto é considerado fraco, pois a captação do tecido tumoral é baixa. Contudo, sendo os ratinhos *Bab/c nu/nu* uma espécie capaz de produzir a vitamina C endogenamente talvez não seja o modelo animal adequado para o estudo da farmacocinética desta molécula.

Desta forma o complexo $^{99m}\text{Tc-AA}$ aparece como um radiofármaco de elevada eficiência de marcação mas, no entanto, não apresenta aplicações clínicas favoráveis, já que a ligação entre o ^{99m}Tc e a molécula de AA ser desconhecida quimicamente. Desta forma, é necessária a realização de estudos complementares para perceber o funcionamento *in vitro* e *in vivo* do $^{99m}\text{Tc-AA}$.

Além das conclusões *in vitro* sobre o efeito pró-oxidante do AA, com a realização dos estudos da avaliação do crescimento tumoral podemos concluir que o AA reduz o crescimento tumoral levando a uma diminuição do volume tumoral, podendo ser este resultado de elevada importância.

Prespectivas futuras

Os resultados obtidos neste trabalho despertou a curiosidade em descobrir mais potencialidades da vitamina C no tratamento de cancro, que de certa forma as técnicas existentes actualmente são deficientes. Assim, já que a marcação radioactiva do AA com ^{99m}Tc apresenta deficiências em termos de aplicação, poderá ser desenvolvido um protocolo de marcação com isótopos naturais pertencentes aos átomos que fazem parte da molécula do AA, (por exemplo carbono-11) de modo a não haver modificação nos grupos funcionais da molécula que poderão interferir na farmacocinética desta.

No seguimento deste trabalho poderão ser realizados estudos de captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ em células normais a fim de verificar se a captação neste caso seria superior nestas células pelo facto de possuírem SCVTs o que não se verifica nas tumorais. Assim, poderá ser feita a análise por HPLC dos mecanismos de entrada das duas formas da vitamina C, em células normais. Para além de todos estes experimentos, estudos de proliferação em células normais seria importante também a fim de comprovar a citotoxicidade selectiva do AA nas células tumorais.

Por fim, a procura de novas metodologias terapêuticas para o tratamento do cancro tem levado muitos autores a publicarem estudos em que combinam fármacos antineoplásicos com doses farmacológicas do AA. Assim e com o objectivo de aprofundar ainda mais as potencialidades podem ser realizados estudos nesse sentido do efeito do AA (Heaney, et al., 2008; Kuroiwa, et al., 2008).

Bibliografia

Albanes, D., (2009). 'Vitamin Supplements and Cancer Prevention: Where Do Randomized Controlled Trials Stand?'. *Journal of the National Cancer Institute*, 101 (1):2-3.

Chen, Q., Espey, M.G., Sun, A.Y., Lee, J.H., Krishna, M.C., Shacter, E., Choyke, P.L., Pooput, C., **Kirk, K.L.**, Buettner, G.R. and Levine, M., (2007a). 'Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (21):8749-8754.

Chen, Q., Espey, M.G., Sun, A.Y., Pooput, C., Kirk, K.L., Krishna, M.C., Khosh, D.B., Drisko, J. and Levine, M., (2009). 'Pharmacologic Doses of Ascorbate Act as a Prooxidant and Decrease Growth of Aggressive Tumor Xenografts in Mice Editorial Comment'. *Journal of Urology*, 181 (5):2384-2385.

Chen, Q., Lee, J.H., Zhang, L.Q., Sun, A., Krishna, M.C., Espey, M.G., Pooput, C., Kirk, K., Choyke, P., Buettner, G.R., Shacter, E. and Levine, M., (2007b). 'Pharmacologic ascorbate concentrations selectively kill cancer cells: Ascorbic acid as a prodrug for ascorbate radical or H₂O₂ delivery to tissues'. *Journal of Nutrition*, 137 (1):293s-293s.

Clark, B.J. and Mama, J.E., (1989). 'Resolution of chiral compounds by HPLC using mobile phase additives and a porous graphitic carbon stationary phase'. *J Pharm Biomed Anal*, 7 (12):1883-1888.

Corpe, C.P., Lee, J.H., Kwon, O., Eck, P., Narayanan, J., Kirk, K.L. and Levine, M., (2005). '6-Bromo-6-deoxy-L-ascorbic acid: an ascorbate analog specific for Na⁺-dependent vitamin C transporter but not glucose transporter pathways'. *J Biol Chem*, 280 (7):5211-5220.

Deutsch, J.C., (1998). 'Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide'. *Anal Biochem*, 255 (1):1-7.

- Engel, R.H.** and Evens, A.M., (2006). 'Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer'. *Front Biosci*, 11:300-312.
- Fransson, L.A.** and Mani, K., (2007). 'Novel aspects of vitamin C: how important is glypican-1 recycling?'. *Trends Mol Med*, 13 (4):143-149.
- Fruehauf, J.P.** and Meyskens, F.L., (2007). 'Reactive oxygen species: A breath of life or death?'. *Clinical Cancer Research*, 13 (3):789-794.
- Heaney, M.L.,** Gardner, J.R., Karasavvas, N., Golde, D.W., Scheinberg, D.A., Smith, E.A. and O'Connor, O.A., (2008). 'Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs'. *Cancer Research*, 68 (19):8031-8038.
- Hoffer, L.J.,** Levine, M., Assouline, S., Melnychuk, D., Padayatty, S.J., Rosadiuk, K., Rousseau, C., Robitaille, L. and Miller, W.H., (2008). 'Phase I clinical trial of i.v. ascorbic acid in advanced malignancy'. *Annals of Oncology*, 19 (11):1969-1974.
- Kazakevich, Yuri,** and Rosrio Lobruto, HPLC for pharmaceutical Scientists [livro], USA, Wiley, 2007.
- Kuroiwa, Y.,** Yamada, M., Matsui, K., Okamura, T., Ishii, Y., Masumura, K., Tasaki, M., Umemura, T., Mitsumori, K., Nohmi, T., Hirose, M. and Nishikawa, A., (2008). 'Combined ascorbic acid and sodium nitrite treatment induces oxidative DNA damage-associated mutagenicity In vitro, but lacks initiation activity in rat forestomach epithelium'. *Toxicological Sciences*, 104 (2):274-282.
- Levine, M.,** Espey, M.G. and Chen, Q., (2009). 'Losing and finding a way at C: New promise for pharmacologic ascorbate in cancer treatment'. *Free Radical Biology and Medicine*, 47 (1):27-29.
- Levine, M.,** Rumsey, S.C., Daruwala, R., Park, J.B. and Wang, Y., (1999). 'Criteria and recommendations for vitamin C intake'. *JAMA*, 281 (15):1415-1423.
- Li, X.** and Franke, A.A., (2009). 'Fast HPLC-ECD analysis of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and uric acid'. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877 (10):853-856.
- Li, Y.** and Schellhorn, H.E., (2007). 'New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C'. *J Nutr*, 137 (10):2171-2184.

- Liu, S.** and Edwards, D.S., (1999). '99mTc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals'. *Chem Rev*, 99 (9):2235-2268.
- Lutsenko, E.A.,** Carcamo, J.M. and Golde, D.W., (2002). 'Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress'. *J Biol Chem*, 277 (19):16895-16899.
- Meyer, R.** Veronika, Practical High-Performance Liquid Chromatography [livro], Switzerland, Wiley, 4^a Edition, 2004.
- Montel-Hagen, A.,** Kinet, S., Manel, N., Mongellaz, C., Prohaska, R., Battini, J.L., Delaunay, J., Sitbon, M. and Taylor, N., (2008). 'Erythrocyte Glut1 triggers dehydroascorbic acid uptake in mammals unable to synthesize vitamin C'. *Cell*, 132 (6):1039-1048.
- Orrenius, S.,** Gogvadze, V. and Zhivotovsky, B., (2007). 'Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death'. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47:143-183.
- Padayatty, S.J.,** Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K. and Levine, M., (2003). 'Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention'. *J Am Coll Nutr*, 22 (1):18-35.
- Padayatty, S.J.,** Riordan, H.D., Hewitt, S.M., Katz, A., Hoffer, L.J. and Levine, M., (2006). 'Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases'. *Canadian Medical Association Journal*, 174 (7):937-942.
- Perkins, A.** and Frier, M., Nuclear Medicine in pharmaceutical research [Livro], UK, Taylor & Francis, 2002.
- Rivas, C.I.,** Zuniga, F.A., Salas-Burgos, A., Mardones, L., Ormazabal, V. and Vera, J.C., (2008). 'Vitamin C transporters'. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 64 (4):357-375.
- Rozanova, N.,** Zhang, J.Z. and Heck, D.E., (2007). 'Catalytic therapy of cancer with porphyrins and ascorbate'. *Cancer Letters*, 252 (2):216-224.
- Schumacker, P.T.,** (2006). 'Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword'. *Cancer Cell*, 10 (3):175-176.
- Snyder, R.** Lloyd, Practical HPLC Method development, USA, Wiley, 2002.

Stapleton, J.E., Odell, R.W. and McKamey, M.R., (1967). 'Technetium-iron-ascorbic acid complex. A good brain scanning agent'. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*, 101 (1):152-156.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. and Telser, J., (2007). 'Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease'. *Int J Biochem Cell Biol*, 39 (1):44-84.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M., (2006). 'Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer'. *Chem Biol Interact*, 160 (1):1-40.

Verrax, J. and Calderon, P.B., (2008). 'The controversial place of vitamin C in cancer treatment'. *Biochemical Pharmacology*, 76 (12):1644-1652.

Wilson, J.X., (2002). 'The physiological role of dehydroascorbic acid'. *FEBS Lett*, 527 (1-3):5-9.

Wilson, J.X., (2005). 'Regulation of vitamin C transport'. *Annu Rev Nutr*, 25:105-125.

Zhao, H., Joseph, J., Fales, H.M., Sokoloski, E.A., Levine, R.L., Vasquez-Vivar, J. and Kalyanaraman, B., (2005). 'Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (16):5727-5732.

Zolle, Ilse, Technetium-99m Pharmaceuticals preparation and quality control in nuclear medicine, Austria, Springer, 2007.