



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

VITAMINA C E QUIMIOTERAPIA: UMA POTENCIAL SINERGIA CONTRA O CARCINOMA COLO-RETAL

Cláudia Raquel Ferreira Marques

2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

VITAMINA C E QUIMIOTERAPIA: UMA POTENCIAL SINERGIA CONTRA O CARCINOMA COLO-RETAL

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

Cláudia Raquel Ferreira Marques

2013

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

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

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Ricardo Reis

AGRADECIMENTOS

No final desta etapa da minha vida académica não posso deixar de expressar os meus sentidos agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte deste percurso.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, diretora do Instituto de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e orientadora deste projeto, agradeço a sua orientação, o precioso apoio na elaboração deste manuscrito e a partilha de conhecimentos científicos e disponibilidade demonstrada ao longo de todo o período de desenvolvimento deste trabalho.

À Mestre Margarida Abrantes, a pessoa que me recebeu pela primeira vez na Unidade de Biofísica, sempre divertida e disposta a ajudar em qualquer situação e um exemplo a seguir de dedicação e empenho. Um muito obrigada por todos os ensinamentos transmitidos e pelo tempo que me disponibilizou.

À Mestre Salomé Pires, por toda a disponibilidade ao longo deste ano, muitas vezes em detrimento próprio, pela constante partilha de conhecimento e acima de tudo, um muito obrigada pela amizade, pela confiança depositada em mim e no meu trabalho, pela contribuição imensurável na realização desta dissertação e por ter sido a melhor mentora que poderia desejar.

Ao Mestre João Casalta pela disponibilidade e pela ajuda valiosa e indispensável na análise estatística dos resultados deste trabalho. À Mestre Mafalda, também um exemplo de dedicação, pela disponibilidade e sugestões sempre pertinentes e valiosas. Às Mestres Catarina e Ana Brito pela constante disponibilidade e amizade e por todos os conselhos e críticas que tiveram um contributo fundamental no meu desempenho. Aos Mestres Rita, Sara e Fernando, por todo o apoio e momentos animados que tornaram os dias mais leves.

À Cláudia Caridade pelo seu contributo em pequenos mas valiosos gestos diariamente. À Mestre Cristina Gonçalves pela disponibilidade demonstrada no auxílio aos estudos de citometria de fluxo.

À Kathleen, Ricardo, Telmo, Patrícia e a todos os outros colegas de laboratório na Unidade de Biofísica, agradeço por todos os momentos de companheirismo e descontração.

Às minhas queridas amigas, Inês Sebastião, Joana, Inês Simões, Tatiana, Mafalda, Tânia, Diana, Inês Pita, Catarina e Guida um muito obrigada por me terem acompanhado ao longo deste percurso, pela amizade, por todos os momentos passados juntas. Sem dúvida que, sem vocês, não teriam sido cinco anos inesquecíveis. Um agradecimento em especial à Marina, que além de uma amiga foi uma companheira de todos os dias neste último ano, obrigada por todas as gargalhadas, conversas e confidências, por estares sempre disponível para me ouvir e aconselhar e por me ensinares a ser uma pessoa mais positiva face aos obstáculos. À Catarina Ferreira, minha amiga de sempre e um exemplo de força, agradeço a confiança e o orgulho que tem em mim e por me proporcionar amizade eterna.

Ao meu Rui, a quem não tenho palavras para agradecer a paciência e apoio constantes, obrigada por estares sempre presente com uma palavra de força e incentivo, por me tornares uma pessoa melhor e por acreditares nas minhas capacidades. Obrigada por transformares as minhas tristezas em sorrisos e por me ensinares que a felicidade existe.

Aos meus pais e irmão, palavras não são suficientes para expressar a importância que têm na minha vida, obrigada por todos os valores que me transmitiram, todo o amor, dedicação e confiança depositada em mim e, acima de tudo, por me deixarem seguir o meu sonho. O que hoje sou, a vocês devo.

Resumo

A Vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, é uma vitamina essencial que atua como antioxidante e cofator de várias enzimas. Em concentrações farmacológicas, o ácido ascórbico (AA) exerce efeitos citotóxicos seletivamente em células tumorais devido à citotoxicidade induzida pelo peróxido de hidrogénio (H_2O_2) formado por reações mediadas pelo AA, o que pode levar à morte celular. Tem vindo a ser demonstrado que o AA não protege as células tumorais dos efeitos da quimioterapia mas consegue exercer esse efeito em células normais. Ao mesmo tempo, o AA em combinação com terapias convencionais induz o aumento do efeito inibitório do crescimento tumoral conferido pelas mesmas, independentemente do tipo de tumor. O 5-Fluorouracilo (5FU) é um dos compostos mais usados no tratamento de primeira linha do cancro colo-retal. Atendendo aos resultados positivos relativos à utilização de AA com a quimioterapia, o objetivo deste trabalho é avaliar especificamente a existência de efeito sinérgico e potencial terapêutico da combinação de AA e 5FU em três linhas celulares humanas de cancro do cólon.

Numa primeira fase avaliou-se o efeito citotóxico do AA através do ensaio colorimétrico do SRB, ensaios clonogénicos, citometria de fluxo, sendo também analisada a ocorrência de danos ao nível do DNA através do ensaio cometa. O efeito do 5FU na proliferação celular foi avaliado através do ensaio SRB. Depois de confirmada a citotoxicidade induzida pelo AA e 5FU quando administrados isoladamente, foi avaliada a citotoxicidade induzida pela combinação de ambos os compostos através do ensaio SRB, ensaios clonogénicos e citometria de fluxo. O desenho experimental utilizado permitiu avaliar a presença de efeito sinérgico entre os dois compostos através do cálculo do índice de combinação.

Os resultados demonstram que o AA isoladamente inibe a proliferação e induz morte celular nas linhas de cancro do cólon. Este facto foi associado com alterações ao nível das espécies reativas de oxigénio nas células C2BBe1 e WiDr. A terapia combinada resultou num efeito sinérgico em algumas condições e permitiu a diminuição da concentração de 5FU necessária para reduzir a proliferação celular em 50% (IC50). Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas ao nível da viabilidade e morte celular com as combinações de doses estudadas, verificou-se que a terapia

combinada induz um atraso do ciclo celular diferente do atraso que se observa com a administração de cada composto individualmente.

Abstract

Vitamin C, also known as ascorbic acid, is an essential vitamin acting as antioxidant and cofactor for various enzymes. At pharmacological concentrations, ascorbic acid (AA) exerts cytotoxic effects selectively on tumor cells due to hydrogen peroxide (H_2O_2) production mediated by AA, which can induce cancer cell death. It has been proved that AA doesn't protect cancer cells from chemotherapy but plays a protective role in normal cells. At the same time AA can enhance tumor growth inhibitory effect conferred by usual therapies regardless tumor type. 5-Fluorouracil (5FU) is one of the most widely used agents in the first-line therapy of colorectal cancer. Giving the positive feedback in turn of the use of AA with chemotherapy, the aim of this study is to specifically evaluate the existence of synergistic effect and therapeutic potential in the combination of AA and 5FU in three human colon cancer cell lines.

First of all the cytotoxicity effect of AA was evaluated by the SRB colorimetric and clonogenic assays, flow cytometry, as well as the occurrence of DNA damage in WiDr cell line through comet assay. It was also analysed the effect of 5FU on cell proliferation by SRB assay. After confirming AA and 5FU induced cytotoxicity when administered alone, it was evaluated the cytotoxicity induced by the combination of both compounds by the SRB assay, clonogenic assays and flow cytometry. The experimental design allowed to evaluate the presence of synergistic effect between both compounds by combination index determination.

The results demonstrate that AA as a single agent inhibits cell proliferation and induces cell death in the colon cancer cell lines. This fact was associated with changes in reactive oxygen species in C2BBel and WiDr cells. The combination therapy resulted in a synergistic effect in some conditions and allowed the reduction of the 5FU half maximal inhibitory concentration (IC_{50}). Although no significant were observed in cell viability and death for the studied conditions, the combination therapy led to cell cycle arrest different from that observed with both compounds alone.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----------|
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. Cancro colo-retal..... | 3 |
| 1.1.1. Terapêutica do cancro colo-retal | 5 |
| 1.1.1.1. 5-Fluorouracilo | 6 |
| 1.2. Vitamina C..... | 9 |
| 1.2.1. Química e Bioquímica | 9 |
| 1.2.2. Síntese e metabolismo..... | 11 |
| 1.2.2.1. Absorção, armazenamento e excreção | 11 |
| 1.2.3. Transporte | 12 |
| 1.2.3.1. Difusão Facilitada..... | 13 |
| 1.2.3.2. Transporte Ativo..... | 15 |
| 1.2.4. Funções biológicas..... | 16 |
| 1.3. A Vitamina C e o Cancro..... | 18 |
| 1.3.1. Administração intravenosa vs. Oral | 19 |
| 1.3.2. Stresse oxidativo | 20 |
| 1.3.2.1. Efeito Antioxidante | 22 |
| 1.3.2.2. Efeito Pró-oxidante | 23 |
| 1.3.3. Mecanismo de ação da vitamina C..... | 25 |
| 1.4. Terapia combinada..... | 27 |
| 1.5. Objetivos do presente trabalho | 29 |

CAPÍTULO 2

| | |
|---|-----------|
| MATERIAIS E MÉTODOS..... | 31 |
| 2.1. Estudos <i>in vitro</i> | 33 |
| 2.1.1. Culturas celulares..... | 33 |
| 2.2. Estudos de citotoxicidade | 35 |
| 2.2.1. Vitamina C..... | 35 |
| 2.2.2. 5-Fluorouracilo | 35 |
| 2.2.3. Vitamina C e 5-Fluorouracilo | 36 |
| 2.2.4. Determinação da proliferação e sobrevivência celular | 39 |

| | |
|--|----|
| 2.2.4.1. Avaliação da síntese proteica pelo ensaio SRB | 39 |
| 2.2.4.2. Avaliação da sobrevivência celular através de ensaios clonogénicos..... | 40 |
| 2.2.5. Citometria de fluxo..... | 42 |
| 2.2.5.1. Avaliação da viabilidade celular | 44 |
| 2.2.5.2. Avaliação da produção intracelular de peróxidos..... | 46 |
| 2.2.5.3. Avaliação da produção intracelular de radical superóxido..... | 47 |
| 2.2.5.4. Avaliação da produção intracelular de glutathiona | 48 |
| 2.2.5.5. Avaliação do ciclo celular | 48 |
| 2.2.6. Avaliação da presença de danos ao nível do DNA | 49 |
| 2.3. Análise estatística | 51 |

CAPÍTULO 3

RESULTADOS 53

| | |
|---|----|
| 3.1. Estudos <i>in vitro</i> | 55 |
| 3.1.1. Monoterapia com Vitamina C e 5-Fluorouracilo | 55 |
| 3.1.1.1. Avaliação da proliferação celular | 55 |
| 3.1.1.2. Avaliação da sobrevivência celular | 60 |
| 3.1.1.3. Citometria de fluxo..... | 62 |
| 3.1.1.4. Avaliação de danos no DNA pelo ensaio cometa | 67 |
| 3.1.2. Terapia combinada | 69 |
| 3.1.2.1. Avaliação da proliferação celular | 69 |
| 3.1.2.2. Avaliação da sobrevivência celular | 76 |
| 3.1.2.3. Citometria de fluxo..... | 78 |

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO 85

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES..... 105

BIBLIOGRAFIA 111

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|--|
| % DNA | Percentagem de DNA na cauda do cometa |
| 5FU | 5-Fluorouracilo |
| AA | Ácido Ascórbico |
| ABPF | Agarose de baixo ponto de fusão |
| APC | <i>Adenomatous polyposis coli</i> |
| APFN | Agarose de ponto de fusão normal |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| AV | Anexina 5 |
| BCA | <i>Bicinchoninic acid</i> |
| BSA | <i>Bovine serum albumin</i> |
| CAP | Capecitabina |
| CAT | Catalase |
| CC | Comprimento da cauda do cometa |
| CCR | Cancro colo-retal |
| c-MYC | <i>Myelocytomatosis cell oncogene</i> |
| DCF | 2',7'-Diclorofluoresceína |
| DCFH | 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína |
| DCFH ₂ -DA | 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato |
| DHA | Ácido Dehidroascórbico |
| DHE | Dihidroetídeo |
| DHFU | Dihidrofluorouracilo |
| DMEM | <i>Dubelcco's Modified Eagle's Medium</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DPD | Dihidropirimidina desidrogenase |
| dTMP | Timidina 5'-monofosfato |
| dUMP | 2'-desoxiuridina 5'-monofosfato |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| FBS | Soro fetal bovino |
| FCS | <i>Forward scatter</i> |
| FdUMP | 5-fluoro-2'-desoxiuridina |
| FdUTP | 5-fluoro-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato |
| FITC | Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína |

| | |
|------------------|--|
| FUTP | 5-fluoridina 5'-trifosfato |
| G | Unidade de força centrífuga relativa |
| GLUT | Transportador de Glicose |
| Gp-P | Glicoproteína P |
| GSH | Glutaciona/Glutatião reduzido |
| GSSG | Glutaciona dissulfeto |
| IC50 | Concentração que inibe a proliferação de culturas celulares em 50% |
| IP | Iodeto de Propídeo |
| K-ras | <i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i> |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| MC | Momento da cauda do cometa |
| MIF | Média de intensidades de fluorescência |
| NAD ⁺ | Forma oxidada do dinucleótido de nicotinamida e adenina |
| NADH | Forma reduzida do dinucleótido de nicotinamida e adenina |
| NADPH | Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina |
| p53 | proteína p53 |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| RNase | Ribonuclease |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNS | Espécies reativas de hidrogénio |
| ROS | Espécies reativas de oxigénio |
| RPMI | <i>Rooswell Park Memorial Institute</i> |
| SOD | Superóxido Dismutase |
| SRB | Sulforrodamina B |
| SSC | <i>Side scatter</i> |
| SVCT | Transportador de Vitamina C dependente de sódio |
| Tcf | <i>T-cell factor</i> |
| TNF α | <i>Tumor necrosis factor-α</i> |
| TP53 | <i>Tumor protein p53</i> |
| TS | Timidilato sintase |
| VSOAC | Canais aniónicos sensíveis à variação do volume |

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.1. CANCRO COLO-RETAL

O cancro é a maior causa de morte mundialmente a seguir às doenças cardiovasculares. Em 2005 morreram cerca de 7,6 milhões de pessoas vítimas de cancro. Estima-se que em 2015 o número de mortes suba para 9 milhões e que aumente para 11,5 milhões em 2030 [1].

A palavra “cancro” é um termo genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do organismo. O cancro surge quando uma célula, por várias razões, escapa aos mecanismos normais de paragem do seu desenvolvimento e começa a dividir-se de uma forma descontrolada, fazendo com que as células invadam tecidos adjacentes e se disseminem para outros órgãos [2].

Várias mutações genéticas estão associadas com o aparecimento de diferentes tipos de cancro. Estas mutações levam ao desenvolvimento do cancro, por um processo conhecido como carcinogénese. Carcinogénese é uma sequência de processos que levam a célula de um estado saudável para um estado pré-cancerígeno até ao desenvolvimento de cancro [2, 3].

De entre as características das células tumorais, duas delas têm particular interesse: a sua capacidade glicolítica (comum a quase todos os tipos de cancro) e a sua sensibilidade ao stresse oxidativo [2].

Os carcinomas colo-rectais, tumores epiteliais malignos do cólon ou do reto, são a terceira causa de morte relacionada com cancro no mundo [4]. A incidência desta doença aumenta com a idade, sendo que o seu aparecimento antes dos 40 anos é pouco comum, exceto em pessoas com doenças que possam evoluir para carcinoma ou com predisposição genética [5]. O risco de desenvolver este tipo de cancro varia entre países e também com a dieta, estilo de vida e fatores genéticos de cada indivíduo. De facto, a dieta e o estilo de vida são variáveis importantes, já que a incidência de carcinoma colo-retal é maior em regiões com dieta ocidental (alimentos calóricos ricos em gorduras animais) e com um estilo de vida sedentário. Por outro lado, a suscetibilidade genética está relacionada com síndromas hereditárias tais como a polipose adenomatosa familiar. Os mecanismos genéticos na origem do carcinoma colo-retal são diversos, sendo que um dos principais se relaciona com a existência de mutações envolvendo genes supressores tumorais tais como o *APC* (do inglês, *adenomatous polyposis coli*) [5].

Existem diversos tipos de carcinoma nomeadamente, adenocarcinoma, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células escamosas, entre outros [5]. No entanto, cerca de 90% dos carcinomas colo-retais são adenocarcinomas [6].

A transição de um epitélio intestinal normal para cancro colo-retal (CCR) que culmina na formação de um adenocarcinoma compreende duas fases principais, a formação do micro-adenoma e a progressão de adenoma para carcinoma, o que envolve, por um lado a ativação de oncogenes e por outro a inativação de genes supressores tumorais (Figura 1.1) [7]. O acontecimento mais importante que vai desencadear esta via é a mutação do gene *APC* [8]. A maioria dos CCR no Homem tem início na inativação deste gene, localizado no cromossoma 5q21. A proteína APC é muito importante pois liga-se à β -catenina promovendo a sua degradação. Por sua vez, a β -catenina tem a capacidade de se ligar a fatores transcripcionais, tais como o Tcf (do inglês, *T-cell factor*), levando à transcrição de genes. Deste modo, os tumores colo-retais com mutações no gene *APC* ou gene que codifica a β -catenina, exibem elevados níveis de transcrição mediada pelo complexo β -catenina/Tcf. Assim, em células colo-retais normais, o *APC* não mutado impede a β -catenina de formar um complexo com o Tcf e a consequente ativação do *c-MYC* (do inglês, *Myelocytomatosis cell oncogene*), um oncogene. Pelo contrário, nos tumores colo-retais, mutações no *APC* ou no gene que codifica a β -catenina originam o aumento da atividade do complexo β -catenina/Tcf, o que leva a uma sobreexpressão do *c-MYC* que, por sua vez, promove o crescimento de células neoplásicas [9]. Para além destes passos, existem outros que envolvem um conjunto de alterações genéticas que acompanham a transição da mucosa intestinal normal para carcinoma. Entre estas alterações está a mutação do proto-oncogene *K-ras* (do inglês, *v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), metilações e também a ausência ou mutação do *TP53* (do inglês, *tumor protein p53*), um gene supressor tumoral [8, 10].

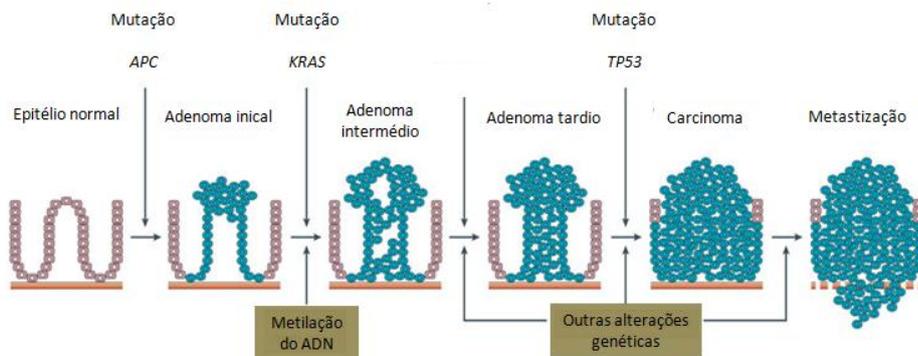


Figura 1.1. Transição de epitélio normal a carcinoma colo-retal. A progressão de epitélio normal a carcinoma colo-retal é caracterizada por várias alterações genéticas envolvendo genes particulares [10].

De forma a ser realizado um diagnóstico adequado a cada situação clínica, é necessário classificar o tumor de acordo com determinadas características que lhe são inerentes. A classificação proposta por C. Dukes serve como modelo para muitos sistemas de classificação atualmente em utilização. Esta classificação considera duas características histopatológicas do tumor, o grau de penetração do tumor na parede do intestino e a presença ou ausência de metástases ao nível dos gânglios linfáticos circundantes [5]. Esta classificação que incluía três estádios (A a C) foi posteriormente modificada, passando a abranger mais um estádio, o estádio D. Assim, um tumor no estádio A está confinado à parede do intestino, não havendo metástases ao nível dos gânglios linfáticos loco-regionais; no estádio B, o tumor alastrou mas não desenvolveu metástases ao nível dos gânglios linfáticos loco-regionais; no estádio C já existem metástases nos gânglios linfáticos loco-regionais; por último, um tumor no estádio D possui metástases à distância [10].

1.1.1. TERAPÊUTICA DO CANCRO COLO-RETAL

Estudos efetuados em linhas celulares de carcinoma do cólon e outros tipos de carcinoma, demonstraram que *in vitro* o estado do gene *TP53*, gene que codifica a p53 (proteína tumoral 53) é muito importante na resposta desta doença à terapia, uma vez que a p53 é uma proteína supressora tumoral, envolvida na regulação do ciclo celular e na apoptose. A presença de p53 *wild-type* nas linhas celulares está associada à inibição do

crescimento celular como resposta à quimioterapia [5]. Por outro lado, determinadas mutações podem influenciar a escolha da terapia, como é o caso de mutações ao nível do gene *K-ras* que levam a que o tumor adquira resistência à terapia monoclonal contra o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês *epidermal growth factor receptor*) através dos fármacos Cetuximab ou Panitumumab [11]. De facto, este recetor tem um papel muito importante no desenvolvimento e na proliferação celular, pelo que alterações resultantes de mutações ou a sua sobreexpressão poderão conduzir a ativação oncogénica [12].

Atualmente há a necessidade da escolha de um tratamento individualizado baseado em variados testes de diagnóstico que permitam traçar o perfil molecular de cada tumor, de modo a que se possa ajustar o tratamento à condição de cada paciente, evitando situações de toxicidade e custos desnecessários [11, 13].

Existem vários tipos de tratamento para o CCR, nomeadamente a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, sendo que o tratamento a adotar varia de acordo com vários fatores, entre os quais, o estadio do tumor [11, 14].

Há já algumas décadas que o 5-Fluorouracilo (5FU) tem vindo a ser utilizado como um dos tratamentos de primeira linha para o cancro colo-retal. Atualmente existem inúmeros fármacos quimioterapêuticos estabelecidos para o mesmo fim, como por exemplo, a Oxaliplatina [15].

1.1.1.1. 5-Fluorouracilo

O 5FU (Figura 1.2) é um antimetabolito anti-tumoral pirimídico, análogo do uracilo. Entra nas células através de transporte facilitado, tal como o uracilo e é metabolizado da mesma forma que este [16, 17].

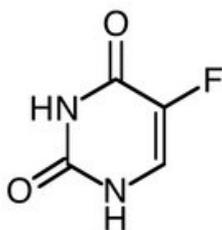


Figura 1.2. Estrutura do 5-Fluorouracilo [15].

Para exercer o seu efeito, o 5FU começa por sofrer anabolismo, podendo formar-se os metabolitos 5-fluorouridina 5'-trifosfato (FUTP), 5-fluoro-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (FdUTP) e 5-fluoro-2'-desoxiuridina 5'-monofosfato (FdUMP) (Figura 1.3). O primeiro pode ser incorporado no ácido ribonucleico (RNA do inglês, *ribonucleic acid*), tendo consequências ao nível da sua síntese, estabilidade, processamento e metilação [15]. O metabolito FdUTP pode incorporar-se no ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) levando à inibição da elongação do DNA e à sua fragmentação. Além da incorporação dos metabolitos de 5FU no DNA e no RNA, estes também afetam a membrana celular. No entanto, o principal efeito anti-tumoral do 5FU é provocado pelo metabolito FdUMP que tem a capacidade de inibir a atividade da timidilato sintetase (TS). A enzima referida é muito importante na síntese de DNA, uma vez que catalisa a metilação de 2'-desoxiuridina 5'-monofosfato (dUMP) em timidina 5'-monofosfato (dTMP). Assim, se a TS estiver inibida, as concentrações de dUMP irão aumentar, o que pode levar a uma incorporação significativa de uracilo no DNA [15, 17].

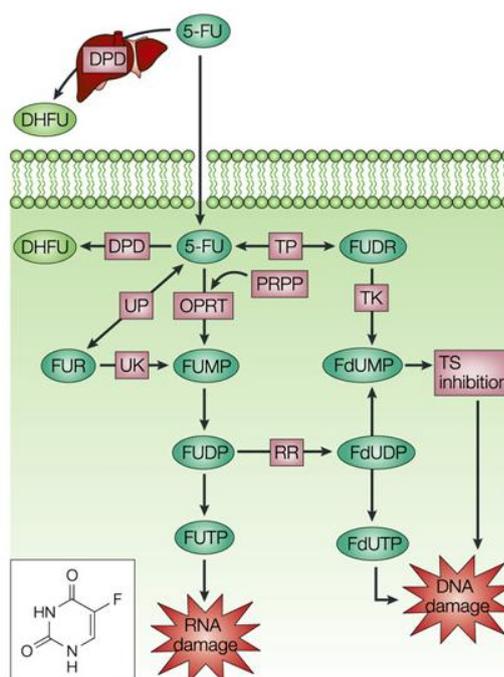


Figura 1.3. Metabolismo do 5-Fluorouracilo. O 5FU é convertido em três metabolitos principais: 5-fluorouridina 5'-trifosfato (FUTP), 5-fluoro-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (FdUTP) e 5-fluoro-2'-desoxiuridina 5'-monofosfato (FdUMP). A conversão de 5FU a dihidrofluorouracilo (DHFU) pela dihidropirimidina desidrogenase (DPD) é o passo limitante do catabolismo de 5FU nas células normais e tumorais [16].

Os efeitos citotóxicos de 5FU são devidos a vias anabólicas pelas quais o composto passa, no entanto, a via catabólica tem um papel importante na medida em que cerca de 80% de 5FU administrado é catabolizado a dihidrofluorouracilo (DHFU) por ação da dihidropirimidina desidrogenase (DPD) [14, 15].

Existem várias formas de administração de 5FU, a duração da terapia também é variável podendo durar algumas horas ou vários dias e as doses administradas dependem de inúmeros fatores. No entanto, a dose de 20 a 25 mg.hr/L demonstrou resultados positivos a nível da eficácia clínica e da segurança [18]. Por outro lado, vários estudos suportam a teoria de que a administração de 5FU baseada na área da superfície corporal não permite a obtenção de concentrações ótimas deste fármaco no plasma de grande parte dos doentes, sendo necessário um manuseamento das doses de acordo com parâmetros farmacocinéticos individuais, o que permite não só a redução da toxicidade do fármaco mas também um aumento da sua eficácia [18].

As reações adversas ao 5FU representam um problema muito importante, sendo a causa de morte de muitos pacientes [15]. O tratamento com 5FU pode provocar vários efeitos secundários a nível hematológico, das mucosas e do tubo digestivo, existindo uma relação entre os efeitos tóxicos secundários e os parâmetros farmacocinéticos de cada indivíduo. É então necessário diminuir a incidência dos efeitos secundários provocados pelo 5FU através do ajuste das doses administradas [19]. No entanto, é de realçar a existência de características que aumentam a toxicidade do 5FU, tais como a deficiência da enzima DPD. Como referido anteriormente, esta enzima é responsável pelo catabolismo da maior parte de 5FU administrado pelo que, uma deficiência nesta enzima leva a situações de toxicidade severa, havendo a associação entre baixa atividade de DPD e altos níveis de 5FU no plasma em pessoas que possuem deficiência elevada de DPD. O problema é que, fazer o controlo desta situação através da identificação de pacientes com mutações no gene que codifica a DPD, apenas permite a deteção de cerca de 40% a 50% de pessoas em risco de sofrer de toxicidade grave [18].

Atualmente é necessária a investigação de novas terapias para o tratamento do cancro, pois a eficácia dos tratamentos habitualmente utilizados atingiu um nível que se tem mantido estável. Para além disto, é também necessário ter em conta os efeitos secundários das terapias convencionais, cuja toxicidade poderá levar à suspensão dos tratamentos. Uma nova terapia poderá estar relacionada com a utilização de vitaminas (retinoides, vitamina E, vitamina C e carotenoides), já que vários estudos têm demonstrado que a presença destes antioxidantes em doses elevadas inibe o crescimento

de células tumorais de roedores e de humanos e aumenta os efeitos dos agentes anti-tumorais já utilizados *in vitro* e *in vivo* [20].

1.2. VITAMINA C

As vitaminas são essenciais ao metabolismo humano, desempenhando várias funções em muitos processos vitais para o normal funcionamento do organismo. Desde há longos anos que se sabe que estes nutrientes são indispensáveis para a saúde humana, dados que foram confirmados por estudos mais recentes [21].

Existem duas classes de vitaminas, aquelas que são lipossolúveis, tais como as vitaminas A, D, E e K e as vitaminas hidrossolúveis onde se incluem a vitamina C e as vitaminas do complexo B [22].

A vitamina C (ácido ascórbico, AA) foi isolada pela primeira vez em 1928 pelo bioquímico Albert Szent-Gyorgyi, que recebeu um prémio Nobel pela sua descoberta nove anos mais tarde [2, 23].

1.2.1. QUÍMICA E BIOQUÍMICA

A vitamina C é uma lactona hidrossolúvel, molécula composta por seis átomos de carbono, dois grupos hidroxilo ionizáveis (Figura 1.4) e apresenta dois valores de pK_a ($pK_1=4,2$ e $pK_2=11,6$), sendo o ascorbato (AsC^-) a espécie presente em maior abundância a pH fisiológico [24].

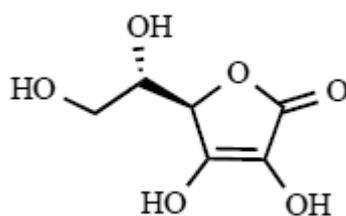


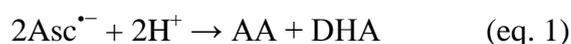
Figura 1.4. Estrutura do ácido ascórbico [2].

Esta vitamina é um dador de eletrões, ou seja, é um agente redutor e todas as suas ações a nível fisiológico e bioquímico se devem a essa característica. É também um antioxidante pois, ao doar eletrões, previne a oxidação de outros compostos no seu lugar [25].

Os organismos aeróbios desenvolveram, ao longo do tempo, sistemas de proteção contra os radicais livres e seus derivados. Estes sistemas são bastante complexos e envolvem defesas a nível enzimático e não enzimático. Os mecanismos enzimáticos, onde se incluem as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e ascorbato peroxidase (nas plantas), estão intrinsecamente relacionados, existindo uma total cooperação entre as enzimas referidas, o que permite a presença de baixos níveis de radicais livres. Para além dos mecanismos enzimáticos, existem simultaneamente antioxidantes nas células, que têm a capacidade de entrar em reações de oxidação-redução, levando à neutralização das espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e dos radicais livres [23].

O ascorbato poderá ser um antioxidante preferencial, uma vez que a espécie que se forma depois da perda de um eletrão e de um átomo de hidrogénio é o radical ascorbil ($\text{Asc}^{\bullet-}$), um radical livre relativamente estável quando comparado com outros radicais livres, com um tempo de meia-vida de 10^{-5} segundos e pouco reativo. Quando por sua vez perde um eletrão, o composto que se forma é o ácido dehidroascórbico (DHA, do inglês *dehydroascorbic acid*), cuja estabilidade depende de vários fatores como temperatura e pH (Figura 1.5) [25].

Por outro lado, o ascorbato é facilmente regenerado pois o radical ascorbil pode converter-se em ácido ascórbico e ácido dehidroascórbico, de acordo com a equação 1:



No entanto, no ser humano, a regeneração do ácido ascórbico é apenas parcial [25, 26].

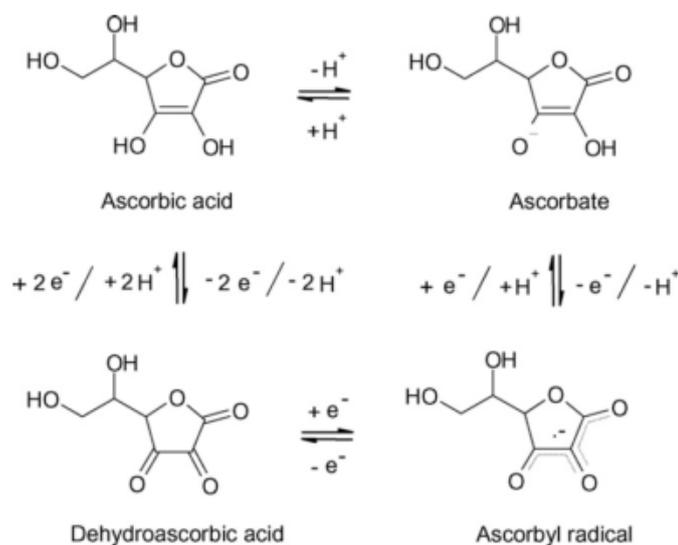


Figura 1.5. Os diferentes estados da vitamina C [26].

1.2.2. SÍNTESE E METABOLISMO

O ácido ascórbico pode ser sintetizado *de novo* através da via do ácido hexurónico, nas plantas e no fígado ou rins de quase todos os animais, com a exceção dos humanos, alguns primatas, porquinhos-da-índia, algumas aves e peixes teleósteos [2, 23]. A incapacidade de síntese de AA deve-se à ausência da enzima que catalisa o último passo biossintético de AA, a L-gulonolactona oxidase, pois o gene que a codifica não está funcional [24]. Deste modo, é de extrema importância o consumo de alimentos que contenham vitamina C, tais como fruta e vegetais [26]. A manifestação da carência de vitamina C denomina-se escorbuto, doença letal quando não é tratada apropriadamente [25].

1.2.2.1. *Absorção, armazenamento e excreção*

A dieta humana inclui AA e DHA, cuja absorção ocorre ao nível dos enterócitos no trato intestinal. O AA é então distribuído por todo o organismo, sendo que as glândulas suprarrenais e pituitária são os locais onde estão presentes os níveis mais altos de AA, seguidas do fígado, baço, cristalino, pâncreas, rim e o cérebro [26, 27]. Como não se liga a proteínas e atendendo a que é hidrossolúvel, o AA é filtrado e reabsorvido pelos

rins [28]. Assim o AA é filtrado no glomérulo e reabsorvido ao nível dos túbulos proximais através de um processo de transporte ativo. Pensa-se que a reabsorção de AA nos túbulos está relacionada com a sua concentração neste local, e ainda não é sabido se esta reabsorção pode ser regulada por outros mecanismos [27]. A absorção intestinal e excreção renal determinam os níveis plasmáticos de AA e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade [29].

Quando a vitamina C está presente em concentrações baixas, a grande maioria é absorvida no intestino e reabsorvida nos rins. Pelo contrário, quando a sua concentração é alta, atinge-se a saturação dos seus transportadores cuja expressão diminui também, fazendo com que a sua absorção diminua e a excreção através da urina aumente. Deste modo, determinou-se um valor que corresponde à máxima concentração de vitamina C que se consegue obter no plasma através de consumo oral. Este valor corresponde a aproximadamente 200 μM , apesar de a concentração normal de ascorbato no plasma de indivíduos saudáveis se situar entre 60 a 100 μM [9, 29, 30].

1.2.3. TRANSPORTE

Por ser um composto polar com um elevado peso molecular, não pode atravessar a membrana através de difusão simples. Deste modo, o transporte de AA para o meio intracelular e extracelular é controlado por um conjunto de mecanismos (Figura 1.6) que incluem a difusão facilitada, mediada pelos transportadores de glicose (GLUTs, do inglês *glucose transporters*) e o transporte ativo, mediado pelos transportadores dependentes de sódio (SVCT, do inglês *sodium vitamin C cotransporters*) 1 e 2 [29].

Em determinadas situações, em que a capacidade redutora da célula está sobrecarregada, o DHA pode sair das células através dos GLUT. O AA também sai da célula, por mecanismos ainda não conhecidos, mas poderá haver o envolvimento neste processo de canais aniônicos nomeadamente os canais aniônicos sensíveis à variação de volume (VSOAC, do inglês *volume-sensitive anion channels*) e a iões cálcio presentes no meio intracelular. A existência dos hemicanais das junções *gap* e a exocitose de vesículas contendo ascorbato são dois mecanismos propostos de modo a justificar a troca de AA entre grupos de células que se encontram juntas. No cérebro foram propostos os

mecanismos de troca entre o glutamato e o ascorbato, como mecanismo adicional, e em vários outros tipos de células a troca apenas de ascorbato [31].

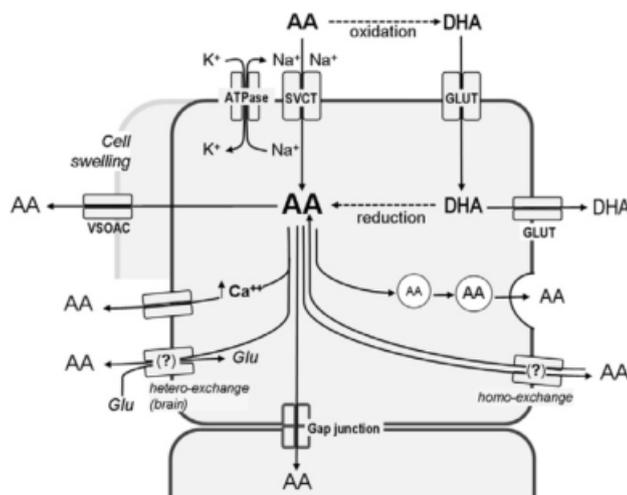


Figura 1.6. Transporte e efluxo de vitamina C através da membrana plasmática. A vitamina C pode ser transportada para o meio intracelular sob a forma de ácido ascórbico através de transporte ativo pelos transportadores dependentes de sódio ou ácido dehidroascórbico transportado por difusão facilitada através dos transportadores de glicose. Na figura está também representado o efluxo de DHA pelos GLUT e os mecanismos propostos para o efluxo de AA através de exocitose de vesículas, canais aniônicos sensíveis à variação de volume e de Ca^{2+} intracelular e por último os canais de troca de glutamato e ascorbato e de troca apenas de ascorbato [31].

1.2.3.1. Difusão Facilitada

A difusão facilitada de DHA a favor do gradiente de concentração (Figura 1.7) é realizada pelos transportadores de glicose, os quais não têm afinidade pelo ácido ascórbico e ascorbato. Assim, inicialmente ocorre a oxidação do ascorbato no lado extracelular, formando-se DHA, o qual é transportado para o meio intracelular pelo transportador GLUT. Finalmente ocorre a redução de DHA a AA no meio intracelular, o que faz com que não volte para o lado extracelular, permitindo a acumulação intracelular de ácido ascórbico, de uma forma que não envolve dispêndio de energia [29].

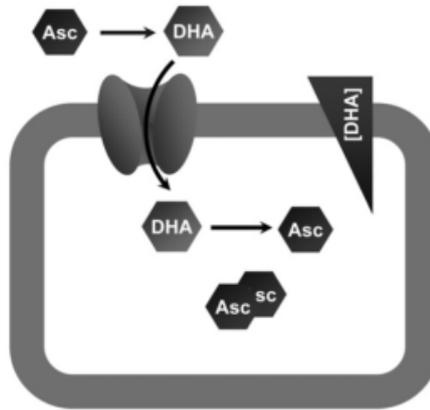


Figura 1.7. Mecanismo de transporte de DHA pelos GLUT. O ascorbato é oxidado a DHA no meio extracelular e no interior da célula o DHA é reduzido a ascorbato [29].

Por entre todos os transportadores de glicose, o GLUT1 e GLUT3 são os maiores responsáveis pelo transporte de DHA para o interior celular, estando maioritariamente presentes nos osteoblastos, músculos e células da retina. O GLUT1 também se encontra nas células endoteliais da barreira hematoencefálica. No entanto, a acumulação de vitamina C no cérebro devido à ação destes transportadores não é de importância fisiológica pois existe uma inibição competitiva do transporte de DHA por parte da glicose. Portanto, como o DHA e a glicose possuem os mesmos transportadores, o transporte de DHA via GLUTs é competitivamente inibido pela glicose [29].

Para além da inibição do transporte de DHA devido à presença de glicose, os transportadores de glicose também são controlados a nível hormonal. Assim em tecidos sensíveis à insulina, o DHA também pode ser transportado para o meio intracelular através do GLUT4, uma vez que a expressão deste tipo de transportador de glicose é estimulada pela presença de insulina [28, 29].

Os transportadores de glicose levam à entrada de DHA na célula em condições específicas, tais como as encontradas ao redor de um neutrófilo ativado. Deste modo, atendendo a que se considera que o desenvolvimento do cancro envolve processos inflamatórios, é de facto possível que o ascorbato seja oxidado a DHA no meio extracelular e depois incorporado pelo tumor, onde é reduzido a ascorbato [24].

1.2.3.2. Transporte Ativo

A presença de vitamina C no meio intracelular deve-se não só à ação dos transportadores de glicose, mas também aos transportadores de vitamina C dependentes de sódio (SVCT) que transportam o ascorbato diretamente para o interior da célula devido ao gradiente eletroquímico de sódio através da membrana celular. Deste modo o AA entra na célula acoplado ao Na^+ que, por sua vez, quando está em excesso é transportado para o meio extracelular através da Na^+/K^+ - ATPase (Figura 1.8).

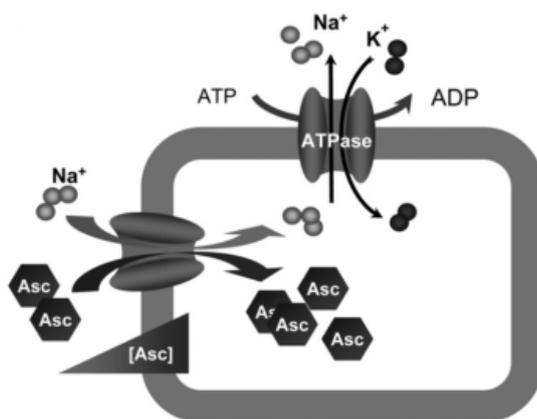


Figura 1.8. Mecanismo de transporte da vitamina C via SVCTs acoplado ao íon sódio. Os íons sódio em excesso são transportados para o exterior ao mesmo tempo que entram para o meio intracelular íons potássio, através de uma Na^+/K^+ -ATPase [29].

Os SVCTs têm mais afinidade pelo ascorbato do que os transportadores de glicose pelo DHA. Foi confirmado que, em condições fisiológicas, as concentrações de DHA no plasma são muito baixas (cerca de $2 \mu\text{M}$), ao invés das concentrações de glicose que são mais elevadas, o que indica que, a presença de concentrações elevadas de ascorbato no meio intracelular se deve, principalmente, ao transporte de ascorbato via SVCTs. Por este motivo, os SVCTs são considerados transportadores de vitamina C de elevada afinidade [24, 29].

Existem duas isoformas do transportador SVCT, o SVCT1 e o SVCT2, cuja distribuição e função são distintas. O transportador SVCT1 é majoritariamente expresso em células epiteliais, tais como as do intestino, rim e fígado, estando portanto envolvido na absorção do ascorbato ingerido e na reabsorção renal, de forma a manter a homeostase. Por outro lado, o transportador SVCT2 localiza-se em células especializadas e metabolicamente ativas, tais como as células do cérebro, olho e placenta, atuando de

modo a manter os níveis intracelulares de vitamina C vitais à manutenção do estado redox dessas células. Este transportador possui maior afinidade para o ascorbato que o primeiro, mas possui menor capacidade para o seu transporte [29, 32].

Tanto a expressão de SVCT1 como de SVCT2 é influenciada pela concentração de ascorbato. Efetivamente, em condições *in vitro*, a presença de SVCT1 diminui perante altas concentrações de vitamina C, tendo sido verificado que níveis intracelulares de ascorbato elevados levaram à diminuição da expressão de SVCTs, em plaquetas humanas e numa linha de epitélio intestinal, enquanto que níveis baixos originaram o aumento de expressão destes transportadores [5]. Este facto é desvantajoso quando se pretende atingir concentrações elevadas de ácido ascórbico através de administração oral. Assim, a administração intravenosa surge como uma alternativa à administração oral. Por outro lado, como referido, os SVCT2 também são sensíveis às alterações dos níveis intracelulares de ácido ascórbico, o que pode funcionar como um sistema de regulação da concentração ideal de vitamina C no interior da célula [10].

1.2.4. FUNÇÕES BIOLÓGICAS

A vitamina C atua principalmente como antioxidante, neutralizando os radicais livres. Como é hidrossolúvel, pode desempenhar essa função tanto no interior como no exterior da célula. Assim, protege o DNA das células da ação dos radicais livres, prevenindo alterações genéticas prejudiciais [22].

Para além de participar em reações de oxidação-redução, a vitamina C possui várias atividades biológicas. Está envolvida em reações enzimáticas catalisadas por um grupo de dioxigenases [24]. Estas enzimas levam à incorporação de oxigénio molecular em substratos orgânicos. Um subgrupo de dioxigenases (dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato) necessita de oxoglutarato para a sua atividade, pois utilizam-no como co-substrato e como fonte de dois eletrões necessários à redução do oxigénio. Algumas destas enzimas necessitam também de ascorbato já que este mantém o ferro no estado de oxidação +2, necessário à sua atividade [23, 24].

O ascorbato funciona como dador de eletrões para três enzimas envolvidas na hidroxilação do colagénio [25, 33]. O colagénio é uma proteína estrutural fundamental e um dos maiores constituintes da matriz extracelular. Aquando da sua síntese, o colagénio

pode sofrer várias modificações pós-traducionais, sendo uma das mais importantes aquela que permite a formação da tripla hélice de colagénio, ou seja, a hidroxilação de resíduos de prolina e lisina, reação catalisada por prolil-hidroxilases. Estas necessitam para a sua atividade de Fe^{2+} , 2-oxoglutarato, oxigénio molecular e ascorbato, sendo este último capaz de reativar a enzima quando necessário [33, 34]. A hidroxilação incorreta dos resíduos de prolina leva a que as proteínas percam a função e sejam degradadas sendo que, quando ocorre ao nível do colagénio, constitui a causa de escorbuto, entre outras doenças [23].

Para além das prolil-hidroxilases, o ascorbato também atua ao nível das histonas, sendo necessário à sua atividade catalítica [24]. As enzimas envolvidas na síntese de carnitina são igualmente dependentes de vitamina C, sendo a carnitina importante no transporte de ácidos gordos para o interior da mitocôndria, de modo a haver formação de ATP (adenosina trifosfato). Também a biossíntese de norepinefrina a partir de dopamina envolve uma enzima dependente de vitamina C, bem como a adição de grupos amida a hormonas peptídicas (o que aumenta a sua estabilidade) e a regulação do metabolismo da tirosina [25].

O ácido ascórbico está também envolvido na absorção de ferro, sendo que é considerado um bom potenciador da absorção deste metal, pois tem a capacidade de contrabalançar a ação de agentes quelantes fortes que reduzem a biodisponibilidade do ferro [26].

A realização de vários estudos no campo da vitamina C têm vindo a destacar o seu papel em várias doenças. A vitamina C tem então a capacidade de baixar a tensão arterial e os níveis de colesterol. Ao inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês *low-density lipoprotein*), previne a formação de placas de ateroma, responsáveis pela aterosclerose. A realização de um estudo em que se avaliou a diminuição do risco de ataque cardíaco, permitiu concluir que com uma toma de 700 mg/dia de vitamina C, o risco de sofrer ataque cardíaco diminui em 62% quando comparado a uma toma de 60 mg/dia ou inferior [35]. A vitamina C também possui um efeito anti-histamínico, aumenta a excreção por via urinária de ácido úrico e diminui o risco de desenvolvimento de cataratas e de glaucomas [22].

Vários estudos apontam que uma dieta rica em vitamina C proporciona proteção contra o cancro, sendo que o consumo adequado desta vitamina diminui o risco de desenvolvimento de vários tipos de cancro. Atendendo a que a vitamina C é importante na manutenção da atividade de uma vasta gama de enzimas é de prever que o aumento do

seu consumo vá ter um impacto positivo no metabolismo e na prevenção de cancro, bem como outros tipos de doença [22, 24].

Para além das funções biológicas da vitamina C, outros estudos têm vindo a enaltecer o papel desta vitamina não só na prevenção de doenças como o cancro, mas também na sua terapia [36, 37]. Estes estudos concluíram que a administração intravenosa de ácido ascórbico conduz a níveis elevados de vitamina C no plasma que funcionam como um pró-fármaco para a entrega de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) aos tecidos, sendo que este, uma vez no meio intracelular, desencadeia o início de processos oxidativos. A presença de H_2O_2 parece não ter qualquer efeito nas células normais mas, nas células tumorais, torna-se bastante prejudicial. Dado que o ácido ascórbico tem a capacidade de libertar H_2O_2 nos tecidos, a sua utilização poderá ter várias aplicações, nomeadamente em situações em que a presença de H_2O_2 é benéfica para além do cancro, tais como doenças infecciosas causadas por bactérias, vírus ou outros microrganismos patogénicos [24, 38].

1.3. A VITAMINA C E O CANCRO

A eficácia das terapias atualmente utilizadas no tratamento do cancro atingiu um patamar, pelo que é urgente a investigação de novas abordagens terapêuticas, com maior eficácia e menor toxicidade. A utilização de vitaminas antioxidantes parece ser uma terapia promissora pois estudos demonstram que, quando administradas em concentrações elevadas, têm a capacidade de inibir o crescimento de células tumorais e melhorar o efeito dos terapêuticos habitualmente utilizados [20].

As terapias atuais, para além dos efeitos adversos que provocam, também produzem toxicidade, o que pode limitar a continuação dos tratamentos. Por outro lado, a sensibilidade a esses tratamentos é muito heterogénea, dependendo do tipo de tumor. Deste modo, compostos capazes de, por um lado reduzir a toxicidade provocada pela quimioterapia apenas nas células normais e, por outro lado, aumentar o efeito inibitório do crescimento provocado pela quimioterapia apenas em células tumorais, independentemente do tipo de tumor, conseguirão melhorar a eficácia das terapias habituais. As vitaminas antioxidantes encontram-se entre esses compostos [20].

A vitamina C continua a ser utilizada como terapia alternativa e estudos recentes indicam que o papel do ácido ascórbico na terapia anti-tumoral deve ser reavaliado, uma vez que a contrariar os resultados positivos obtidos em vários trabalhos, existem estudos que afirmam que a utilização de ácido ascórbico poderá acarretar desvantagens, assunto que será abordado mais à frente neste capítulo [20, 37, 39]. A vitamina C é apenas usada como terapia alternativa pois os resultados positivos obtidos em estudos originais não foram confirmados em ensaios clínicos e porque a possibilidade de esta afetar seletivamente células tumorais não era biologicamente aceite [37].

Por outro lado, existe nova informação no que diz respeito à plausibilidade da terapia com ácido ascórbico e, conseqüentemente, o interesse científico na interação entre o ácido ascórbico e o cancro tem vindo a aumentar nos últimos anos. Atualmente, os estudos realizados nesta área procuram avaliar o efeito de doses elevadas de vitamina C no crescimento e progressão do cancro e desvendar os mecanismos de ação desta vitamina responsáveis pelos efeitos anti-tumorais [29].

Atendendo ao grande potencial da vitamina C, ao nível da segurança e dos benefícios, é plausível a investigação em torno da sua utilização como um novo tratamento para o cancro.

1.3.1. ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA VS. ORAL

Em 1954, W. J. McCormick, físico canadiano, observou que as alterações no estroma das células de pessoas portadoras de escorbuto eram idênticas às alterações no estroma observadas na vizinhança de células neoplásicas. Seguindo esta observação, ele propôs que o cancro seria uma doença relacionada com o colagénio e a carência de vitamina C [2]. Cerca de 20 anos depois, os investigadores L. Pauling e E. Cameron, descobriram que concentrações altas de vitamina C tinham efeitos benéficos em doentes com cancro em fase terminal e propuseram o uso de vitamina C em concentrações elevadas para a prevenção e tratamento deste. Posteriormente, outros estudos que utilizaram a mesma concentração de vitamina C, não tiveram nenhum efeito no bem-estar e sobrevivência dos doentes e o papel da vitamina C no tratamento do cancro foi posto em causa e descartado por médicos oncologistas. Na altura em que os estudos supracitados foram realizados, não houve o reconhecimento de que a via pela qual o ácido ascórbico

foi administrado poderia produzir grandes diferenças na sua concentração plasmática pois, apesar de terem sido utilizadas doses de vitamina C semelhantes, os estudos de Pauling e Cameron combinaram administrações orais e intravenosas enquanto que, no estudo posterior, foi apenas utilizada a administração oral. Estudos farmacocinéticos recentes indicam que estas duas vias de administração possuem resultados muito desiguais, ao nível da concentração plasmática de vitamina C, tal como foi referido anteriormente. Enquanto que com a administração de doses elevadas de vitamina C por via oral se consegue apenas atingir uma concentração plasmática máxima de 70 a 220 μM , com administrações intravenosas é possível atingir concentrações de 14000 μM . Existem estudos que comprovam que concentrações entre 1000 e 5000 μM são seletivamente citotóxicas para células tumorais *in vitro*. Esta evidência de citotoxicidade *in vitro* e estudos clínicos farmacocinéticos fornecem plausibilidade à “teoria” de que a terapia com vitamina C pode ter efeitos anti-tumorais em alguns tipos de cancro e pode explicar, em parte, os resultados negativos dos segundos estudos acima referidos [37]. Novas abordagens *in vitro* em que o ascorbato está presente em concentrações apenas atingíveis através de administração intravenosa, demonstraram que o ascorbato é seletivamente tóxico, matando as células cancerígenas e não as células normais, que reforça a ação de agentes citotóxicos e que tem atividade anti-tumoral quando administrado em concentrações na ordem dos milimolar isoladamente ou em terapia combinada (em roedores) [39, 40].

1.3.2. STRESSE OXIDATIVO

O stresse oxidativo é uma condição bioquímica caracterizada pelo desequilíbrio entre níveis relativamente elevados de espécies tóxicas reativas, essencialmente espécies reativas de oxigénio e espécies reativas de azoto (RNS, do inglês *reactive nitrogen species*), e mecanismos de defesa antioxidantes [41]. A formação de ROS é um processo inevitável, pois o nosso metabolismo é fundamentalmente aeróbio. As ROS e as RNS estão constantemente a interferir com o nosso material genético, sendo que as suas agressões poderão ser aumentadas ou diminuídas através de mecanismos nutricionais, ambientais e hormonais. Estas espécies são produzidas de várias formas: podem provir da radiação ultravioleta, raios-X e raios-gama, podem surgir como produtos de reações

catalisadas por metais, também se apresentam como poluentes na natureza, são produzidas por neutrófilos e macrófagos em situação de inflamação e são também produtos das reações da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, entre outros mecanismos [3].

As ROS e/ou RNS tanto podem ser nocivas para as células como podem ter efeitos benéficos. Em baixas concentrações desempenham variadas funções, tais como a indução de uma resposta mitogénica, possuindo um papel fisiológico ao nível da sinalização intracelular e da regulação. Por outro lado, quando presentes em concentrações elevadas, as ROS podem ser mediadores importantes de danos nas células, por exemplo, ao nível das membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos, ou seja, levam a um aumento do stresse oxidativo. Estes efeitos são balanceados pelas defesas enzimáticas antioxidantes em conjunto com as não enzimáticas. Apesar da existência de defesas antioxidantes intrínsecas às células, os danos provocados pelos radicais livres no DNA, proteínas e lípidos membranares acumulam-se ao longo de cada ciclo celular e esta situação tem vindo a ser correlacionada com o desenvolvimento de doenças que surgem com o avançar da idade do indivíduo tais como cancro, artrite, aterosclerose, distúrbios neurodegenerativos e outras condições. Atendendo a que as ROS são espécies oxidantes, elas podem influenciar o estado redox da célula causando, de acordo com a sua concentração, uma resposta positiva que se traduz na proliferação celular ou uma resposta negativa que se traduz na paragem do crescimento celular ou mesmo morte celular [3].

Os radicais livres são definidos como moléculas ou fragmentos moleculares que contêm um ou mais elétrons desemparelhados. A existência de elétrons desemparelhados confere um nível considerável de reatividade. Os radicais que derivam do oxigénio representam a classe mais importante que se origina nos seres vivos (Figura 1.9). Entre essa classe de radicais encontra-se o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), considerado uma ROS “primária” capaz de reagir com outras moléculas de modo a gerar ROS “secundárias”.

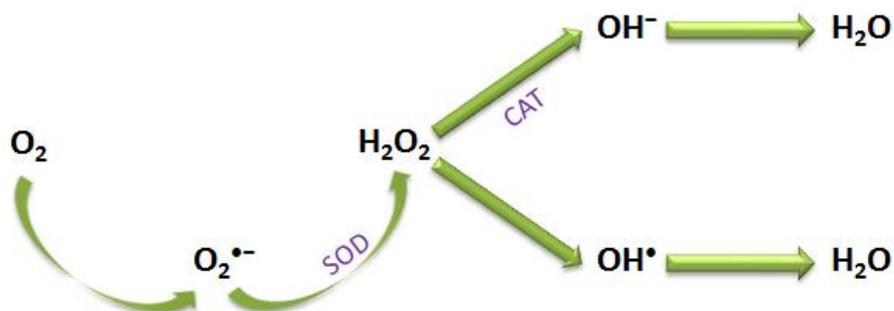


Figura 1.9. Formação de ROS a partir de oxigênio levando à formação de radical hidroxilo. Estão também representadas as defesas enzimáticas antioxidantes, nomeadamente a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) responsáveis pela destoxificação do radical superóxido e do peróxido de hidrogênio, respetivamente.

A formação de radicais livres está igualmente relacionada com a existência de metais no meio. Em condições de stresse, *in vivo*, a presença de radical superóxido leva a que o ferro contido em moléculas seja libertado. Este ferro livre, nomeadamente o Fe^{2+} pode participar na reação de Fenton dada pela equação 2:



com formação do radical hidroxilo (OH^\bullet). O radical hidroxilo é altamente reativo, com um tempo de meia-vida em solução aquosa inferior a 1 ns. Deste modo, quando é produzido *in vivo*, reage próximo do local de formação [3].

Em conjunto com estudos que pretendem verificar os efeitos de concentrações altas de ácido ascórbico, estão também a ser desenvolvidos estudos para determinar o mecanismo de ação desta vitamina. Entre estes estão a avaliação das suas funções antioxidante e pró-oxidante, a sua capacidade na modulação da transcrição e expressão genética e o seu potencial papel na metástase tumoral [29].

1.3.2.1. Efeito Antioxidante

Quando presente no plasma em concentrações fisiológicas, o ascorbato funciona como antioxidante protegendo as células do dano causado pelas ROS, funcionando como

defesa primária contra espécies radicalares. A prevenção de mutações no DNA devido ao stresse oxidativo representa um potencial mecanismo contra o cancro, dado que estas mutações são um grande contributo para o desenvolvimento desta doença. O ascorbato protege também os lípidos do plasma, bem como os lípidos membranares dos danos peroxidativos induzidos pelos radicais peróxido (LOO^\bullet) [29, 42].

Existem muitos compostos capazes de funcionar como antioxidantes, no entanto apenas aqueles que, como a vitamina C, estão presentes em quantidades razoáveis no meio intracelular, reagem com vários radicais livres e são passíveis de regeneração, é que são considerados antioxidantes biológicos eficientes [23]. De facto, o ascorbato e o radical ascorbil apresentam valores baixos de potencial de redução (282 e -174 mV respetivamente), o que lhes permite a redução da maioria dos radicais livres e oxidantes [26].

O ascorbato doa um eletrão a radicais como os radicais hidroxilo, alcóxido (RO^\bullet), peróxido, tiol (GS^\bullet) e tocoferol (TO^\bullet), havendo a formação do $\text{Asc}^{\bullet-}$. Este, como referido anteriormente, é pouco reativo e pode ser reduzido a ascorbato novamente pela ação das redutases dependentes de NADH e NADPH. Por outro lado, também pode sofrer uma reação de desproporcionação dependendo do pH resultando na formação de ascorbato e DHA [24].

1.3.2.2. Efeito Pró-oxidante

A vitamina C também pode funcionar como pró-oxidante quando presente em maiores concentrações, provocando danos oxidativos nas células, por exemplo ao nível do DNA. O efeito pró-oxidante é maior na presença de metais de transição livres, onde se inclui o ferro ou o cobre. Estes são reduzidos pelo ascorbato e reagem com o peróxido de hidrogénio, levando à formação de radicais hidroxilo. No caso do ferro, este é reduzido a Fe^{2+} que reage com oxigénio formando o radical superóxido que por sua vez leva à formação de peróxido de hidrogénio. Como referido anteriormente o Fe^{2+} pode entrar na reação de Fenton, dando origem a Fe^{3+} e ao radical hidroxilo. A presença de ascorbato permite a contínua formação de Fe^{2+} e, conseqüentemente, a contínua formação de espécies muito reativas a partir do peróxido de hidrogénio. Atendendo a que a maioria dos metais de transição existem numa forma inativa ligados a proteínas, a relevância deste processo *in vivo* foi posta em causa. No entanto, a vitamina C em concentrações

farmacológicas (3000 a 20000 μM), tem a capacidade de despoletar uma ação pró-oxidante independente da presença ou não de metais de transição, sendo que esta ação é mais intensa em células tumorais e conduz à morte celular. A ação referida é, por outro lado, dependente do tempo de incubação com ácido ascórbico e da concentração deste [24, 29].

Atualmente ainda está por determinar a razão da seletividade, mas é sugerido que o ascorbato não deverá afetar as células normais devido a diversos fatores. Por um lado, estudos comprovam que as células tumorais possuem no seu interior menores concentrações de enzimas antioxidantes como a catalase e a superóxido dismutase o que permite a acumulação de H_2O_2 nestas células conduzindo a dano celular [29, 36, 42]. Por outro lado, a maioria das células tumorais tem o metabolismo glicolítico aumentado, o que faz com que expressem uma maior quantidade de GLUTs (em comparação com as células normais), favorecendo a entrada de DHA nas células tumorais [42]. Estes dois fatores são, pois, responsáveis pelo aumento da concentração intracelular de H_2O_2 . Outro estudo indica também que as mitocôndrias das células normais poderão não ser tão sensíveis ao H_2O_2 como as das células tumorais [38]. Por último, a presença de maiores quantidades de metais de transição nas células tumorais também contribui para um efeito pró-oxidante mais intenso nestas células. De facto, nas células normais a maioria dos metais de transição estão ligados a proteínas o que os impede de participar em várias reações de oxidação. No entanto, nas células tumorais as forças coesivas que impossibilitam a libertação desses metais das proteínas estão fortemente reduzidas. Por sua vez, a presença de maiores quantidades de metais de transição livres pode favorecer a formação de peróxido de hidrogénio e de ROS [42].

Existem algumas variáveis que determinam se a vitamina C atua como antioxidante ou pró-oxidante, nomeadamente, a influência do potencial oxidação/redução no meio envolvente à célula, a ausência ou presença de metais de transição, e a concentração de ascorbato. O último fator referido é muito importante em terapia, quando se pretende influenciar a ação da vitamina C, pois pode ser facilmente manipulado e controlado para se obter o objetivo pretendido [29].

1.3.3. MECANISMO DE AÇÃO DA VITAMINA C

Numa primeira fase é essencial perceber se *in vitro* o ascorbato atua como agente anti-tumoral e, nesse caso, através de que mecanismos. Num estudo realizado *in vitro* por Chen *et al.* (2005), referiram que o ascorbato em concentrações farmacológicas tem um efeito seletivamente tóxico em células tumorais devido à formação de $\text{Asc}^{\bullet-}$ e de H_2O_2 no meio de cultura. No sangue houve formação mínima de $\text{Asc}^{\bullet-}$ e não houve formação de H_2O_2 . Também concluíram que concentrações de H_2O_2 superiores ou equivalentes a 25 μM induziram um efeito tóxico para células tumorais. De acordo com o mecanismo apresentado, a perda de um elétron por parte do ascorbato origina a redução de um íon metálico que constitui o centro metálico de uma proteína, originando a formação de H_2O_2 na zona extracelular. Pelo contrário, no sangue vai haver menor produção de $\text{Asc}^{\bullet-}$ e qualquer H_2O_2 formado vai ser logo destoxificado pela ação de enzimas antioxidantes originando espécies não reativas (Figura 1.10) [38, 39].

Noutro estudo realizado posteriormente, os mesmos investigadores testaram *in vivo* a hipótese de o ascorbato atuar como um pró-fármaco na distribuição de $\text{Asc}^{\bullet-}$ e H_2O_2 no meio extracelular. Segundo o mecanismo proposto, depois da administração de ácido ascórbico, este atinge concentrações semelhantes no sangue e no meio extracelular. O ácido ascórbico presente no meio extracelular é oxidado formando-se $\text{Asc}^{\bullet-}$ de modo que o elétron libertado vai reduzir o íon metálico de uma metaloproteína, sendo que ainda não é conhecida a identidade das proteínas que intervêm neste passo. Na Figura 1.10, é dado o exemplo da redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} com a posterior doação de um elétron pelo Fe^{2+} ao oxigénio, originando $\text{O}_2^{\bullet-}$ que, por sua vez vai dar origem a H_2O_2 . No sangue é possível que estas reações estejam inibidas, pelo que a obtenção de $\text{Asc}^{\bullet-}$ é minimizada pela ação de proteínas redutoras presentes na membrana das hemácias ou através de proteínas presentes no plasma que não se distribuem para o espaço extracelular. Qualquer formação de H_2O_2 no sangue sofre imediatamente ação da catalase presente no plasma e da glutathione (GSH) peroxidase dos glóbulos vermelhos, levando a que não seja detetada qualquer concentração de H_2O_2 [38].

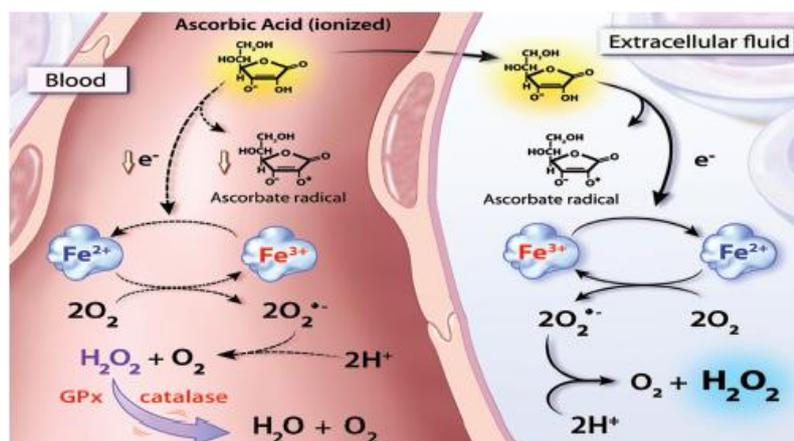


Figura 1.10. Mecanismo proposto para a formação preferencial de radical ascorbil e peróxido de hidrogênio no meio extracelular do que no sangue. No meio extracelular, depois da formação de $\text{Asc}^{\cdot-}$ o produto final é H_2O_2 que vai atuar no tumor. No sangue as reações que levam à formação deste último composto poderão estar inibidas (representado por setas a tracejado) e qualquer formação de H_2O_2 é logo destruída, não se detetando este composto [38].

No segundo estudo referido, os investigadores perceberam que as concentrações de H_2O_2 que se atingiram *in vivo* foram as mesmas que causaram a morte de células cancerígenas *in vitro*. No meio extracelular, concentrações de $\text{Asc}^{\cdot-}$ superiores a 100 nM, foram as responsáveis pelo aparecimento de H_2O_2 . No sangue, estas concentrações de $\text{Asc}^{\cdot-}$ nunca foram atingidas, sendo sempre inferiores a 50 nM. Os autores referem que todos os dados obtidos são consistentes com a hipótese de que concentrações farmacológicas de ascorbato *in vivo* funcionam como um pró-fármaco para a libertação de H_2O_2 no espaço extracelular [38].

A morte de células cancerígenas *in vitro* é mediada principalmente pela ação de H_2O_2 , sendo um dos mecanismos propostos, a diminuição da produção de ATP (Figura 1.11) das seguintes formas: i) o H_2O_2 poderá causar danos no DNA que são reparados pela polimerase poliADP-ribose. O aumento da atividade desta polimerase poderá diminuir a disponibilidade de NAD^+ , resultando na depleção de ATP; ii) a remoção de H_2O_2 do interior das células poderá ser mediada pela GSH peroxidase. Esta enzima tem necessidade de obter GSH que, através de atividade enzimática é oxidada a glutatona dissulfeto (GSSG). A GSSG é regenerada a GSH devido à existência de NADPH, que por sua vez é regenerado através da glicose pela via das pentoses fosfato. No entanto, a glicose utilizada para reduzir NADP^+ a NADPH não pode ser utilizada para gerar ATP. Nas células tumorais que dependem da via anaeróbia para a formação de ATP, a perda de glicose para a via das pentoses fosfato, leva à diminuição da formação de ATP e,

consequentemente, à morte celular; iii) por outro lado, as mitocôndrias presentes nas células tumorais poderão ter uma sensibilidade acrescida ao H_2O_2 , o que pode resultar numa diminuição da formação de ATP.

Estes três mecanismos são independentes, de modo que poderão ocorrer mais do que um ao mesmo tempo [38].

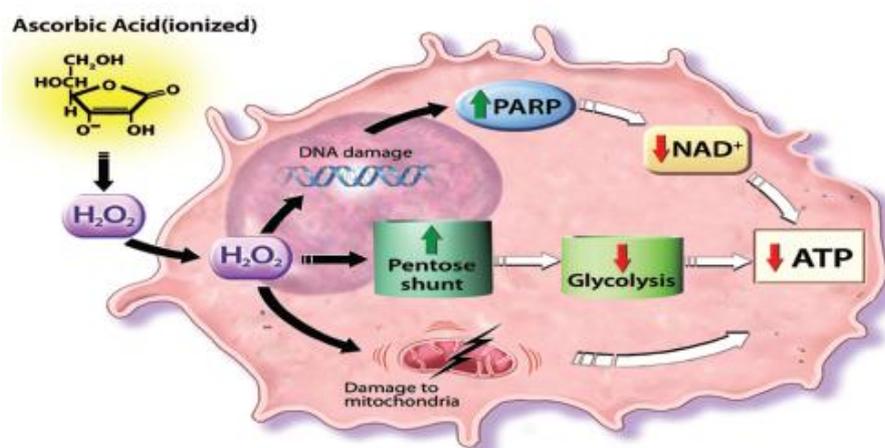


Figura 1.11. Representação esquemática dos três mecanismos que poderão estar na base da toxicidade celular em células tumorais mediada por peróxido de hidrogénio, através da diminuição da síntese de ATP. Ao cima, o efeito de H_2O_2 no DNA, levando à necessidade de reparação. No centro está representado o mecanismo em que há interferência na via das pentoses fosfato, sendo que a glicose utilizada para a formação de NADPH já não poderá originar ATP. Por último, representa-se a sensibilidade das mitocôndrias presentes em células tumorais ao H_2O_2 , afetando a síntese de ATP [38].

1.4. TERAPIA COMBINADA

As combinações entre fármacos são desde sempre utilizadas no tratamento de doenças numa procura de efeitos sinérgicos ou potenciadores ao mesmo tempo que pretende diminuir os efeitos secundários. Ao longo do último século tem existido uma tentativa de quantificar a relação entre a dose e o efeito de um fármaco quando administrado isoladamente e em combinação. Por outro lado também se tem tentado avaliar se determinada combinação de fármacos poderá ter ou não efeito sinérgico.

Assim, ao longo deste tempo vários modelos e teorias foram equacionados, o que tem originado alguma controvérsia [43].

O raciocínio que está por detrás da terapia combinada tem como base a possibilidade de se atingir ao mesmo tempo vários alvos da doença. Se os fármacos tiverem modos de ação diferentes, serão dois mecanismos diferentes a combater a mesma doença. Deste modo, através da junção de dois ou mais fármacos poderá haver aumento da eficácia da terapia, comparativamente à eficácia obtida com cada fármaco isoladamente. Por outro lado, poderá ser possível diminuir a concentração dos fármacos, mantendo ou melhorando a eficácia, de forma a reduzir a toxicidade. Outro aspeto em que também se podem sentir as vantagens desta terapia é na resistência aos fármacos que poderá ser minimizada ou desenvolver-se de forma mais lenta do que o habitual. Todos estes benefícios levam a que este seja o tipo de terapia utilizada no tratamento de doenças agressivas como a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), de doenças infecciosas e do cancro [43].

Quando o fármaco A que provoca determinado efeito é administrado em conjunto com o fármaco B que não possui qualquer efeito e o que se obtém é um efeito superior ao do fármaco A, considera-se que houve potenciação. Pelo contrário, se ambos os fármacos têm algum efeito isoladamente, quando administrados conjuntamente poderão dar origem a um efeito sinérgico, antagonista ou aditivo. Por definição, um efeito sinérgico é aquele que é mais do que aditivo, enquanto que um efeito antagonista é inferior a um efeito aditivo [43].

A falta de entusiasmo por parte de médicos oncologistas, relativamente à utilização de doses elevadas de vitaminas antioxidantes em combinação com radioterapia e quimioterapia tem como base o receio de que as vitaminas antioxidantes possam proteger as células cancerígenas dos radicais livres gerados pela radiação e por alguns agentes quimioterapêuticos, do mesmo modo que protege as células normais. No entanto, alguns estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que estas preocupações não são válidas [20]. De qualquer forma, este receio não se põe em causa neste trabalho pois, de acordo com o que foi referido anteriormente, o mecanismo de ação do 5FU não envolve a produção de ROS tal como reportado num estudo por Kim *et al.* (2012), pelo que não existiria um conflito entre o uso de AA e 5FU em combinação [44].

De forma a ser posta de parte a incerteza em torno da utilização de doses elevadas de AA, existem resultados que demonstram que a vitamina C (bem como outras vitaminas antioxidantes) aumenta o efeito inibitório do crescimento tumoral conferido pelas terapias

habituais independentemente do tipo de tumor (sem afetar as células normais), o que é muito vantajoso, tendo em conta que os tumores têm sensibilidades diferentes aos tratamentos. Este aumento depende da dose e forma da vitamina C, da dose e do tipo de fármaco quimioterapêutico e do tipo de tumor [20].

Apesar de todos os resultados positivos e encorajadores em torno da utilização da vitamina C como terapia anti-tumoral, o uso desta vitamina como terapia isolada ainda não provou ter um efeito curativo. O metabolismo das células tumorais, a quimioterapia e a radioterapia levam ao aumento de espécies reativas de oxigénio, cuja presença conduz ao aumento do stresse oxidativo [45]. Como referido anteriormente, a utilização de vitamina C em concentrações farmacológicas leva também à formação de ROS. Este efeito é seletivo na medida em que só as células tumorais são afetadas. Deste modo, a combinação de vitamina C com quimioterapia (ou radioterapia) deverá ser muito positiva, induzindo um aumento de ROS no microambiente tumoral e consequentemente stresse oxidativo neste local, levando à morte das células tumorais.

Com este trabalho, pretende-se demonstrar que a utilização de vitamina C em combinação com o 5FU, aliando os efeitos do AA que conduzem, entre outros, ao aumento do stresse oxidativo e inibição da produção de ATP, com proteção de células normais, aos efeitos nocivos do 5FU no DNA, RNA e membrana plasmática, poderá ser a chave para uma futura terapia.

1.5. OBJETIVOS DO PRESENTE TRABALHO

Apesar das vantagens em torno do uso de AA na terapia é do conhecimento geral que a vitamina C não tem um efeito curativo [24, 29, 46]. Contudo, é de suma importância averiguar até que ponto o pré-tratamento das células tumorais com AA poderá aumentar a sensibilidade das mesmas a determinados citostáticos ou citotóxicos. A relevância deste trabalho reside na necessidade que existe de reduzir o IC50 de um fármaco antineoplásico devido à sua elevada toxicidade, a qual é muitas vezes limitante da dose, ou a razão para a interrupção da quimioterapia.

Tendo o cancro colo-retal uma elevada taxa de mortalidade [7] e atendendo a que estudos recentes reforçam que o papel do AA na terapia anti-tumoral deve ser reavaliado [39], pretende-se com a realização deste trabalho:

1. Avaliar o efeito que o AA exerce sobre três linhas celulares humanas de cancro do cólon (C2BBE1, LS1034 e WiDr) recorrendo a estudos *in vitro*;
 - 1.1. Avaliação da proliferação celular por espectrofotometria recorrendo ao ensaio sulforrodamina B (SRB);
 - 1.2. Avaliação da sobrevivência celular através da realização de ensaios clonogénicos;
 - 1.3. Determinação da viabilidade celular e caracterização dos tipos de morte por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo (AV/IP);
 - 1.4. Determinação da presença intracelular de espécies reativas de oxigénio e enzimas antioxidantes por citometria de fluxo com o uso das sondas DCFH₂-DA, DHE e alaranjado de mercúrio;
 - 1.5. Determinação da existência de danos ao nível do DNA através do ensaio cometa.
2. Avaliar o efeito do 5FU ao nível da proliferação celular das três linhas celulares acima referidas (C2BBE1, LS1034 e WiDr), recorrendo ao ensaio SRB.
3. Avaliar o efeito da combinação de AA com 5FU através da realização de estudos *in vitro*, utilizando as mesmas três linhas celulares (C2BBE1, LS1034 e WiDr);
 - 3.1. Avaliação da proliferação celular por espectrofotometria recorrendo ao ensaio SRB;
 - 3.2. Avaliação da sobrevivência celular através da realização de ensaios clonogénicos;
 - 3.3. Determinação da viabilidade celular e caracterização dos tipos de morte por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação com AV/IP;
 - 3.4. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo utilizando uma solução de iodeto de propídeo (IP) e RNase;

Capítulo 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ESTUDOS *IN VITRO*

Os estudos *in vitro* constituem uma primeira abordagem na avaliação da eficácia terapêutica de um composto, sendo realizados fora de um organismo vivo, em ambiente controlado. Pretende-se com a sua realização, averiguar os efeitos de determinada variável experimental, num pequeno grupo de constituintes de um organismo. Assim, procura-se determinar mecanismos de ação biológica, sem que haja a interferência de outras variáveis a influenciar os resultados, sendo o motivo pelo qual os estudos *in vitro* têm um carácter fundamental em praticamente todos os trabalhos.

De modo a avaliar o efeito que advém da combinação de vitamina C com o fármaco 5FU, foram realizados numa primeira fase estudos *in vitro*, utilizando para tal três linhas celulares humanas de cancro do cólon, duas do cólon esquerdo, a C2BBel e a WiDr, e uma linha celular humana de cancro do cego, denominada LS1034.

Todo o material utilizado na manipulação das culturas celulares foi devida e previamente esterilizado.

2.1.1. CULTURAS CELULARES

As culturas celulares visam o cultivo e propagação de células dispersas sendo necessário, aquando da sua manipulação, o estabelecimento de condições rigorosas de assepsia e esterilidade.

As células C2BBel formam uma monocamada polarizada em forma de escova na zona apical, comparável morfológicamente ao cólon humano. São um clone das células CaCo-2 [47].

A linha LS1034 originou-se num doente portador de um cancro do cego que na classificação de Dukes, se encontrava no estadio C. Estas células possuem o gene que codifica a proteína p53 mutado, o que origina a troca de glicina por serina na posição 245 e a proteína APC alterada devido a uma deleção no codão 1309 (GAAAAGATT ficou GATT). É de salientar o facto de esta linha celular ser quimiorresistente, pois expressa a glicoproteína P (Gp-P) [48].

A linha celular WiDr tem a particularidade de também expressar uma forma mutada da p53 (mutação na posição 273, onde houve a troca de arginina por histidina). Para além disto, à semelhança da linha LS1034, também as outras duas linhas celulares possuem mutação no gene *APC* [49].

As linhas celulares utilizadas foram propagadas em cultura aderente e de acordo com as instruções do seu fornecedor, a *American Type Culture Collection* (ATCC), mantidas a 37°C em atmosfera humificada com 95% de ar e 5% de CO₂ em incubadora *Binder*.

A linha celular LS1034 foi propagada em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute Medium*, RPMI-1640 (Sigma, R4130), e para as linhas celulares C2BBel e WiDr utilizou-se o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM (Sigma, D5648). Ambos foram suplementados com 5% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*, Sigma, F7524), 1% de antibiótico (Sigma, A5955), 1 mM de piruvato de sódio (Gibco, 11360) para o RPMI e 0,25 mM no caso do DMEM.

Para a realização de estudos *in vitro*, e atendendo a que estas células são mantidas em cultura aderente, foi necessário destacar as células dos frascos e preparar suspensões celulares. Assim, inicialmente procedeu-se à lavagem das culturas celulares com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Saline*, constituído por 137 mM de NaCl (Sigma, S7653), 2,7 mM de KCl (Sigma, P9333), 10 mM de NaH₂PO₄ (Sigma, S5011) e 1,8 mM de KH₂PO₄ (Sigma, P0662) [pH 7,4]), e incubaram-se em seguida com 2 mL de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma, T4049) ou tryple (Gibco, 12605-028) a 37°C durante o tempo necessário para que as células se soltem do frasco, tendo sido este tempo otimizado para cada linha. De seguida adicionaram-se pelo menos 4 mL de meio de cultura a fim de inativar a tripsina, homogeneizou-se a suspensão celular e procedeu-se à determinação da concentração de células. Para tal diluiu-se um volume conhecido de suspensão celular em igual volume de azul tripano e fez-se a contagem num microscópio invertido (Motic, AE31) com ampliação de 10 vezes utilizando para tal uma câmara de *neubauer*. Por último adicionou-se meio de cultura à suspensão celular de forma a obter a concentração celular pretendida, a qual foi distribuída pelos poços das placas, de acordo com o estudo a realizar.

2.2. ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE

Para todos os estudos de citotoxicidade foram preparadas soluções de AA (Sigma, A5960) e de 5FU (Sigma, F6627) de concentração apropriada de modo a que a sua adição apenas alterasse no máximo em 1% o volume do meio de cultura dos compartimentos celulares. Para os ensaios com AA foi utilizado um controlo em que não houve administração de qualquer composto e para os ensaios com 5FU ou com a combinação de AA com 5FU, foram realizados dois controlos: culturas celulares em que não houve administração de nenhum composto e culturas celulares tratadas com o solvente do 5FU, ou seja, com dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, D4540). Todas as soluções utilizadas foram previamente filtradas utilizando filtros de acetato celulose de 0,22 μm (*Syringe Filter*; Frilabo, 1520012).

2.2.1. VITAMINA C

Numa primeira fase, apesar de o objetivo deste trabalho ter sido a avaliação do efeito do AA em combinação com o 5FU, foi necessário conhecer o efeito de cada um dos compostos individualmente. Deste modo, para avaliar a ação citotóxica do AA as culturas celulares foram incubadas com diferentes concentrações de AA que variaram entre 0,25 mM e 20 mM.

2.2.2. 5-FLUOROURACILO

De modo a avaliar o efeito do 5FU individualmente nas três linhas celulares, procedeu-se à incubação das mesmas com concentrações de 5FU que variaram entre 0,5 μM e 480 μM .

2.2.3. VITAMINA C E 5-FLUOROURACILO

Na avaliação do efeito da combinação de AA com 5FU baseámo-nos no desenho experimental proposto por Straetemans *et al.* (2005) [50]. Assim, fixámos uma relação Z entre os compostos e ambos foram combinados de modo a que a proporção entre eles seja constante. No cálculo das concentrações de cada composto necessárias para a terapia combinada considerámos a equação 3:

$$Z = fA + (1 - f)B \quad (\text{eq. 3})$$

em que A e B correspondem à concentração de AA e 5FU, respetivamente, que inibe a proliferação das culturas em 50% (IC50) para cada linha celular, proliferação essa determinada para um tempo de incubação de 96 horas; f é considerado o fator de mistura que pode assumir valores de 0 a 1 e corresponde à proporção de cada composto que é utilizada. Para o cálculo dos valores de Z , estabelecemos o valor de f como sendo numa primeira fase 0,5 ou seja, ambos os compostos estão na mesma proporção e, seguidamente estabelecemos o valor de 0,75 fazendo com que o AA esteja presente em maior proporção do que o 5FU comparativamente ao grupo anterior. Deste modo poderemos obter curvas dose-resposta diferentes. As concentrações obtidas para cada f podem ser vistas como um raio num sistema cartesiano ortogonal, de acordo com o representado na Figura 2.12, em que as linhas correspondem a raios diferentes, cada um para um valor de f específico e os pontos correspondem às diferentes misturas de concentrações obtidas.

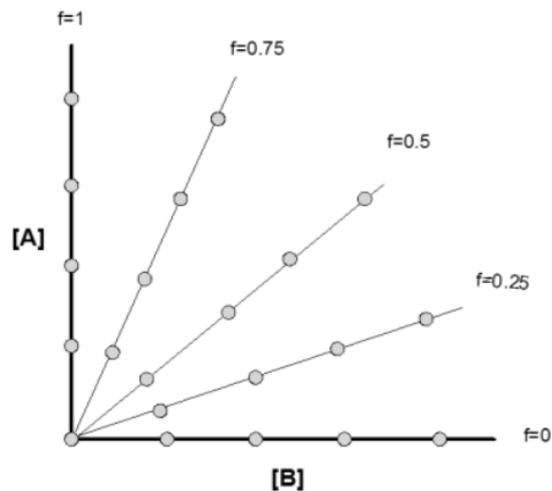


Figura 2.12. Representação do esquema de raios. O eixo das abcissas corresponde à concentração do composto B (5FU) e o eixo das ordenadas corresponde à concentração do composto A (AA). Cada linha corresponde a um raio diferente para um valor específico de f e os pontos representam as diferentes concentrações para cada raio [50].

Após o cálculo dos valores de Z definimos seis variações deste valor, o que corresponde a seis combinações diferentes de cada fármaco em cada linha celular: para a linha celular C2BBel (Tabela 2.1-A) considerámos 0,25Z; 0,5Z; Z, 2Z, 4Z e 8Z e para as outras duas linhas celulares, LS1034 e WiDr (Tabela 2.1-B e C) estabelecemos 0,25Z; 0,5Z; Z; 1,5Z, 2Z e 3Z. Para podermos traçar curvas dose-resposta designámos a constante que multiplicamos ao Z por a , de modo que no eixo das abcissas esteja representado o logaritmo deste valor. A escolha de valores de a superiores a um implica o uso de concentrações superiores às do IC50 que, apesar de não se enquadrar no objetivo do trabalho, se torna imprescindível para a obtenção das curvas dose-resposta. Por outro lado, o facto dos valores de a variarem de linha celular para linha celular deve-se apenas ao facto de o IC50 do AA nas células LS1034 e WiDr ser muito superior ao IC50 do mesmo composto na linha celular C2BBel. Deste modo, se optássemos por usar as mesmas diluições para as três linhas celulares teríamos de usar soluções com concentração de AA muito superior a 2000 mM para as linhas LS1034 e WiDr, o que implica exceder a solubilidade máxima do AA em água [51]. Em suma, os valores de a foram escolhidos tendo em conta três fatores: o IC50 de AA obtido para cada linha celular, a solubilidade do AA em água e a obtenção de curvas dose-resposta que nos permitissem determinar a existência ou não de sinergia inerente à combinação dos compostos.

Tabela 2.1. Concentração de ácido ascórbico (AA) e 5-Fluorouracilo (5FU) presentes em cada mistura para $f=0,5$ e $f=0,75$ nas linhas celulares C2BBel (A), LS1034 (B) e WiDr (C).

A

| f | [AA] (μM) | [5FU] (μM) |
|------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 0,5 | 0,25Z | | 0,5Z | | Z | | 2Z | | 4Z | | 8Z | |
| | 102,3 | 2,51 | 204,5 | 5,03 | 409 | 10,05 | 818 | 20,10 | 1636 | 40,20 | 3272 | 80,40 |
| 0,75 | 0,25Z | | 0,5Z | | Z | | 2Z | | 4Z | | 8Z | |
| | 153,4 | 1,26 | 306,8 | 2,51 | 613,5 | 5,03 | 1227 | 10,05 | 2454 | 20,10 | 4908 | 40,20 |

B

| f | [AA] (μM) | [5FU] (μM) |
|------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 0,5 | 0,25Z | | 0,5Z | | Z | | 1,5Z | | 2Z | | 3Z | |
| | 670,9 | 0,84 | 1341,8 | 1,67 | 2683,5 | 3,35 | 4025,3 | 5,02 | 5367 | 6,69 | 8050,6 | 10,04 |
| 0,75 | 0,25Z | | 0,5Z | | Z | | 1,5Z | | 2Z | | 3Z | |
| | 1006,3 | 0,42 | 2012,6 | 0,84 | 4025,3 | 1,67 | 6037,9 | 2,51 | 8050,6 | 3,35 | 12075,8 | 5,02 |

C

| f | [AA] (μM) | [5FU] (μM) |
|------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 0,5 | 0,25Z | | 0,5Z | | Z | | 1,5Z | | 2Z | | 3Z | |
| | 738 | 0,35 | 1476 | 0,71 | 2951,9 | 1,41 | 4427,8 | 2,12 | 5903,8 | 2,82 | 8855,7 | 4,23 |
| 0,75 | 0,25Z | | 0,5Z | | Z | | 1,5Z | | 2Z | | 3Z | |
| | 1107 | 0,18 | 2213,9 | 0,35 | 4427,8 | 0,71 | 6641,8 | 1,06 | 8855,7 | 1,41 | 13284,5 | 2,12 |

Toda esta metodologia permitiu determinar a existência de efeito sinérgico, aditivo ou antagonista através do cálculo do índice de combinação (I). Para o cálculo de I , baseámo-nos igualmente no desenho experimental de Straetemans *et al.* (2005). Assim, se o índice de combinação for inferior a 1, existe efeito sinérgico. Se o valor obtido for igual ou superior a 1, estamos na presença de efeito aditivo ou antagonista, respetivamente [50].

Depois da otimização do protocolo, as células foram incubadas com as diferentes misturas para cada f , sendo administrado o AA em primeiro lugar e logo de seguida o 5FU.

2.2.4. DETERMINAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA CELULAR

2.2.4.1. Avaliação da síntese proteica pelo ensaio SRB

A avaliação da proliferação celular, como medida da síntese proteica total, representa um marcador de citotoxicidade muito sensível. De modo a avaliar os efeitos da combinação dos compostos (AA e 5FU) na proliferação das três linhas celulares, recorreu-se a um ensaio colorimétrico denominado SRB que fornece uma medida da síntese proteica total. O ensaio referido além de sensível e simples é também reprodutível e de rápida execução. O princípio desta técnica baseia-se na ligação do corante aminoxantina carregado negativamente, isto é, a sulforrodamina B, aos aminoácidos presentes nas células. Assim, quanto maior for o número de células viáveis, maior será a quantidade de corante captado e mais intensa será a cor obtida depois da fixação das células e, conseqüentemente, maior será a absorvância medida no espectrofotômetro [52].

Para a realização deste ensaio foi necessária uma suspensão celular com 50000 células/mL, a qual foi distribuída por placas de 48 poços. Após os tratamentos referidos anteriormente, os meios de cultura foram aspirados e fizeram-se duas lavagens com PBS e uma com água Mili-Q. Em seguida, para a fixação das células adicionaram-se a cada poço 150 µL de uma solução gelada de ácido acético 1% (Panreac, 361008) em metanol (Sigma, 32213), sendo mantidas à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após este período a solução de fixação foi aspirada e depois de os poços estarem secos adicionou-se 100 µL de SRB 0,4% (Sigma, S9012) e incubaram-se as células durante uma hora à temperatura ambiente e protegidas da luz. As placas foram posteriormente lavadas com água de modo a remover completamente o corante em excesso. Finalizado este procedimento adicionaram-se 200 a 300 µL de Tris.NaOH na concentração de 10 mM (pH=10) (constituído por Trizma base [Sigma, T1503] e NaOH [Sigma, S5881]) a cada poço e, após homogeneização, transferiu-se o conteúdo de cada poço para uma placa de 96 poços para posterior quantificação da absorvância a 540 nm, usando um filtro de referência de 690 nm, com recurso a um espectrofotômetro ELISA (Biotek® *Synergy HT*).

A citotoxicidade foi expressa como a percentagem de inibição nas culturas submetidas ao tratamento em relação à proliferação das culturas controlo. Este procedimento permitiu estabelecer curvas de dose-resposta e determinar a concentração dos compostos utilizados que inibe a proliferação das culturas em 50% (IC50). Os resultados obtidos foram analisados e processados no programa OriginPro v. 8.0.

2.2.4.2. Avaliação da sobrevivência celular através de ensaios clonogénicos

O ensaio clonogénico é uma técnica utilizada para determinar a sobrevivência celular, que se baseia na capacidade de uma célula crescer e formar uma colónia, após submissão a um tratamento, sabendo-se que uma colónia é constituída por, pelo menos, cinquenta células [53]. Para este estudo foram semeadas 500 células por poço para as linhas C2BBel e WiDr e 700 células por poço para a linha LS1034, numa placa de seis poços e foram colocados 3 mL de meio de cultura em cada poço. As condições estudadas neste ensaio para cada linha celular, estão enumeradas e descritas na Tabela 2.2–A, B e C.

Tabela 2.2. Condições testadas em cada poço para o ensaio clonogénico nas linhas celulares C2BBel (A), LS1034 (B) e WiDr (C).

A

| Condição | Concentração AA (μM) | Concentração 5FU (μM) |
|----------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 1 | - | - |
| 2 | 500 | - |
| 3 | 2000 | - |
| 4 | 5000 | - |
| 5 | 306,75 | - |
| 6 | 613,5 | - |
| 7 | - | 2,51 |
| 8 | - | 5,03 |
| 9 | 306,75 | 2,51 |
| 10 | 613,5 | 5,03 |

B

| Condição | Concentração AA (μM) | Concentração 5FU (μM) |
|----------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 1 | - | - |
| 2 | 1000 | - |
| 3 | 5000 | - |
| 4 | 20000 | - |
| 5 | 2012,64 | - |
| 6 | 4025,28 | - |
| 7 | - | 0,84 |
| 8 | - | 1,67 |
| 9 | 2012,64 | 0,84 |
| 10 | 4025,28 | 1,67 |

C

| Condição | Concentração AA (μM) | Concentração 5FU (μM) |
|----------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 1 | - | - |
| 2 | 500 | - |
| 3 | 2000 | - |
| 4 | 5000 | - |
| 5 | 4427,84 | - |
| 6 | 6641,76 | - |
| 7 | - | 0,71 |
| 8 | - | 1,06 |
| 9 | 4427,84 | 0,71 |
| 10 | 6641,76 | 1,06 |

Assim, para a realização desta técnica, as células foram incubadas com cada um dos compostos isoladamente ou em combinação, de acordo com a condição pretendida. No caso da terapia isolada com AA, foi administrada uma concentração inferior à do IC50 às 24 horas de incubação, obtido através do ensaio SRB (condição 2), outra concentração próxima desse valor de IC50 (condição 3) e outra superior (condição 4). Na terapia combinada, foram utilizadas duas combinações de AA e de 5FU que, de acordo com os resultados de proliferação celular obtidos, foram aquelas para as quais obtivemos um melhor valor de proliferação celular, pelo que foi escolhida uma combinação de ambos os compostos para $f=0,75$, ou seja, em que há maior proporção de AA do que de 5FU. Assim, as duas concentrações de cada composto foram administradas isoladamente e em combinação para efeitos de comparação. O controlo realizado corresponde à condição número 1, com culturas não tratadas (Tabela 2.2–A, B e C). É também de referir que, nas situações em que foi administrado o 5FU, fez-se outro controlo para além do referido, em que as células foram apenas tratadas com 15 μL de DMSO, volume máximo de 5FU dissolvido em DMSO administrado nas diferentes condições. Cinco dias após o tratamento das culturas, o meio foi aspirado e substituído por meio novo e doze dias após o tratamento, foi feita a contagem das colónias. Para tal, o meio foi aspirado e as células lavadas com 2 mL de PBS. Seguidamente foram adicionados 2 mL de metanol a cada poço durante 5 minutos para fixar as colónias, procedimento que foi repetido uma vez. Após secagem das placas adicionaram-se 2 mL de corante violeta de cristal (Sigma, C3886) (0,5% diluído em metanol). Após os 5 minutos necessários à ação do corante, este foi aspirado e as placas foram lavadas em água tépida e deixadas a secar. O número de

colônias foi posteriormente contado, permitindo o cálculo da *plate efficiency* e do fator de sobrevivência pelas equações 4 e 5.

$$\text{Plate efficiency} = \frac{\text{Número de colônias contadas}}{\text{Número de colônias semeadas}} \times 100 \quad (\text{eq. 4})$$

$$\text{Fator de sobrevivência} = \frac{\text{Plate efficiency das amostras tratadas}}{\text{Plate efficiency das amostras controle}} \times 100 \quad (\text{eq. 5})$$

2.2.5. CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a contagem de células, bem como examinar e medir as suas características físicas e químicas e de outras partículas biológicas em suspensão, através da dispersão de luz ou fluorescência usando uma lâmpada de mercúrio ou laser [54]. Partículas como cristais ou pó também induzem difusão de luz, pelo que, para a detecção específica de determinados alvos estes necessitam de ser marcados com moléculas fluorescentes. Os lasers são utilizados para excitar o corante, de modo a medir a intensidade de fluorescência para cada partícula [54]. Assim, direciona-se um feixe de luz de determinado comprimento de onda para um meio líquido em fluxo. Vários detetores são apontados ao local onde o fluxo passa através do feixe de luz: um situa-se na linha do feixe de luz (FSC, do inglês *forward scatter*) e vários estão perpendiculares a este (SSC, do inglês *side scatter*), além de um ou mais detetores fluorescentes. Cada partícula suspensa que passa através do feixe dispersa a luz de uma forma e os corantes químicos fluorescentes encontrados na partícula ou a ela ligados podem ser excitados emitindo luz de menor frequência (ou maior comprimento de onda). Esta combinação de luz dispersa e fluorescente é melhorada pelos detetores e, por análise das flutuações de brilho de cada detetor (uma para cada pico de emissão fluorescente), é possível obter vários tipos de informação sobre a estrutura física e química de cada partícula individual. A FSC correlaciona-se com o volume celular e a SSC depende da complexidade interna da partícula, ou seja, a forma do núcleo, a quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e a rugosidade da membrana [55].

Neste trabalho, nos estudos que envolvem a administração de AA isoladamente, a citometria de fluxo foi utilizada para: i) a determinação e caracterização da apoptose/necrose através da dupla marcação com a anexina V (AV) e iodeto de propídeo (IP); ii) a determinação da presença intracelular de espécies reativas de oxigénio, nomeadamente de peróxidos, radical superóxido e glutatona. Em relação aos estudos que envolvem a combinação de AA e 5FU, recorreu-se à mesma técnica para: i) a determinação e caracterização da apoptose/necrose através da dupla com AV e IP; ii) a análise do ciclo celular. Optámos pela escolha destas sondas pois, no caso da terapia isolada, o objetivo é a caracterização dos tipos de morte celular e identificação das principais espécies envolvidas neste processo. No caso da terapia combinada há um maior interesse em perceber primeiramente se há morte celular, a caracterização do tipo de morte celular e relacionar os resultados de proliferação celular com as alterações do ciclo celular.

Para este estudo o tratamento aplicado foi o que consta na Tabela 2.3. Ao contrário dos ensaios clonogénicos em que foram escolhidas duas condições para a terapia combinada, para a citometria de fluxo apenas utilizámos uma condição que corresponde ao número 7 da Tabela 2.3–A, B e C. A avaliação foi realizada 24 horas após a incubação das culturas celulares com AA (condições 1 a 4, Tabela 2.3-A, B e C) e após 96 horas do tratamento das culturas com AA e 5FU (condições 1 e 5 a 7, Tabela 2.3-A, B e C). De realçar que a escolha do período de incubação de 96 horas e da combinação de concentrações a testar para a terapia combinada teve por base os resultados de proliferação celular obtidos previamente, pelo que foi escolhida uma combinação de ambos os compostos para $f=0,75$, ou seja, em que há maior proporção de AA do que de 5FU.

Para todas as marcações foram necessárias aproximadamente 10^6 células. Para análise e quantificação da informação utilizou-se um *software* específico que corre em computador dedicado (*Machintosh Software*, Paint-a-Gate 3.02).

Tabela 2.3. Concentrações de AA e 5FU testadas nas experiências de citometria de fluxo em monoterapia e em terapia combinada nas linhas celulares C2BBe1 (A), LS1034 (B) e WiDr (C).

A

| Condição | Concentração AA (µM) | Concentração 5FU (µM) |
|----------|----------------------|-----------------------|
| 1 | - | - |
| 2 | 500 | - |
| 3 | 1000 | - |
| 4 | 10000 | - |
| 5 | 613,5 | - |
| 6 | - | 5,03 |
| 7 | 613,5 | 5,03 |

B

| Condição | Concentração AA (µM) | Concentração 5FU (µM) |
|----------|----------------------|-----------------------|
| 1 | - | - |
| 2 | 1000 | - |
| 3 | 5000 | - |
| 4 | 20000 | - |
| 5 | 4025,28 | - |
| 6 | - | 1,67 |
| 7 | 4025,28 | 1,67 |

C

| Condição | Concentração AA (µM) | Concentração 5FU (µM) |
|----------|----------------------|-----------------------|
| 1 | - | - |
| 2 | 500 | - |
| 3 | 2000 | - |
| 4 | 10000 | - |
| 5 | 6641,76 | - |
| 6 | - | 1,06 |
| 7 | 6641,76 | 1,06 |

2.2.5.1. Avaliação da viabilidade celular

A extensão da apoptose/necrose (morte celular) foram avaliados por citometria de fluxo, através da dupla marcação com Anexina V com o fluorocromo isotiocianato de

fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) (AV-FITC) e iodeto de propídeo (IP). Este procedimento permite distinguir entre células viáveis e mortas e ainda, saber o mecanismo predominante que determinou a morte celular (apoptose ou necrose). Quando uma célula morre por apoptose, ocorre uma alteração da distribuição dos fosfolípidos da bicamada lipídica que constitui a membrana plasmática. Deste modo, a fosfatidilserina (fosfolípido de carga negativa) sofre translocação do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. A AV tem a capacidade de se ligar à fosfatidilserina, pois tem elevada afinidade por fosfolípidos de carga negativa. Assim, quando a AV está conjugada com o FITC, origina a detecção da localização de fosfatidilserina na membrana celular e, conseqüentemente é possível inferir se as células estão em apoptose. Por sua vez, células em necrose perdem a integridade da membrana plasmática, sendo que o mesmo também pode suceder nas fases mais avançadas da apoptose. Esta ruptura da membrana permite a entrada de IP para o meio intracelular. O IP tem a capacidade de se intercalar no DNA e emite fluorescência, o que permite a sua detecção [56]. É possível então concluir que as células vivas apresentam-se negativas tanto para a marcação com AV-FITC como para a marcação com IP, enquanto as células em apoptose inicial apresentam-se positivas para a marcação com AV-FITC e negativas para a marcação com o IP. Por outro lado, as células positivas para as duas marcações encontram-se em apoptose tardia/necrose e as células que estão em necrose apresentam-se negativas para a marcação com AV-FITC e positivas para a marcação com o IP [57, 58].

De modo a executar esta avaliação as células foram centrifugadas (1300 *G*, durante 5 minutos) e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensão em PBS e lavado por centrifugação nas condições referidas anteriormente. Seguidamente o sedimento foi ressuspensão em 100 μ L de tampão de ligação frio (1x) (constituído por 0,01 M de HEPES [Sigma, H7523], 0,14 M de NaCl [Sigma, S7653] e 0,25 mM de CaCl₂ [Sigma, C4901]), 2,5 μ L de AV-FITC (Immunostep, ANXVF) e 1 μ L de IP (kit Immunostep) durante 15 minutos na ausência de luz e à temperatura ambiente. Por último adicionaram-se 400 μ L de tampão de ligação frio (1x). Posteriormente foi efetuada a detecção por citometria de fluxo utilizando um citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado com um laser de argônio e os comprimentos de onda de excitação de 525 e 640 nm para AV-FITC e para o IP, respetivamente. Os resultados foram expressos em percentagem de células identificadas em cada uma das subpopulações e baseiam-se na positividade e/ou negatividade de marcação para AV-FITC/IP.

2.2.5.2. Avaliação da produção intracelular de peróxidos

O composto 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH₂-DA) tem sido muito utilizado como marcador de stresse oxidativo devido à sua grande capacidade de se difundir passivamente pela membrana plasmática. Após entrar nas células o DCFH₂-DA é hidrolisado por ação de esterases a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH), composto que emite fluorescência quando é oxidado a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), sendo essa oxidação realizada pelo peróxido de hidrogénio (Figura 2.13). A fluorescência é proporcional à concentração de peróxidos intracelulares, nomeadamente do peróxido de hidrogénio [59, 60].

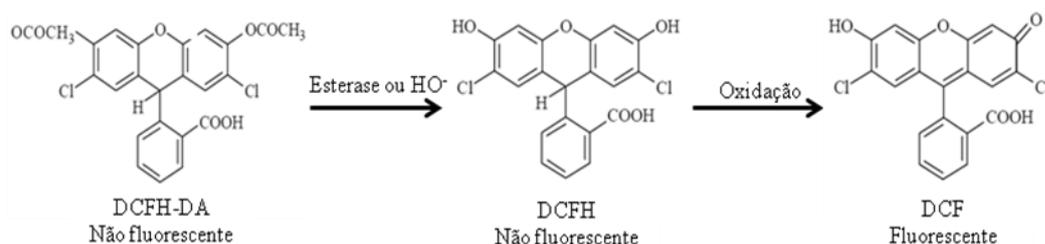


Figura 2.13. Mecanismo de esterificação de DCFH₂-DA a DCFH, seguido de oxidação a DCF [59].

Com o intuito de realizar esta avaliação centrifugou-se a suspensão celular (1300 G, durante 5 minutos) e o sobrenadante foi decantado. Seguidamente o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de PBS e incubado durante 45 minutos no escuro e a 37°C com 1 µL de DCFH₂-DA (Sigma, 35848) dissolvido em DMSO, de modo a obter a concentração final de 5 µM. A suspensão foi posteriormente lavada com PBS por centrifugação (1300 G, durante 5 minutos) e ressuspenso em 400 µL do mesmo. Finalmente foi feita a deteção por citometria de fluxo com uma excitação e emissão nos comprimentos de onda de 504 e 529 nm, respetivamente. Os dados obtidos foram depois analisados em termos de média das intensidades de fluorescência (MIF) com normalização relativamente ao controlo.

2.2.5.3. Avaliação da produção intracelular de radical superóxido

A avaliação da produção do radical superóxido foi efetuada com recurso ao composto dihidroetídio (DHE). Este tem sido utilizado como sonda fluorescente para detetar o radical superóxido, devido à sua especificidade para esse radical [59]. O DHE atravessa facilmente as membranas celulares e é convertido pelo radical superóxido a etídio, composto fluorescente de cor vermelha que se intercala no DNA, permanecendo no interior da célula (Figura 2.14). Esta reação é relativamente específica para o radical superóxido, com oxidação mínima pelo peróxido de hidrogénio, peróxido de nitrito ou ácido hipocloroso [61].

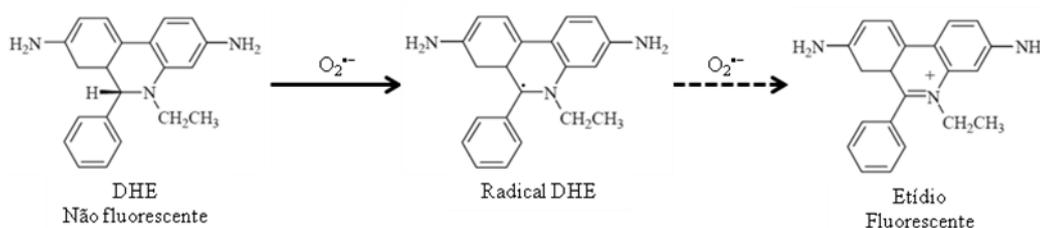


Figura 2.14. Mecanismo de conversão de dihidroetídio (DHE) a etídio (E⁺). O DHE é convertido por ação do radical superóxido a etídio, um composto fluorescente que se intercala no DNA [59].

Para realizar este ensaio centrifugou-se a suspensão celular (1300 G, durante 5 minutos) e uma vez retirado o sobrenadante, fez-se uma lavagem com PBS. O *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de PBS e foram adicionados 5 µL de DHE na concentração de 1 mM (Sigma, D7008) dissolvido em DMSO, de modo a obter uma concentração final de 5 µM. Após 15 minutos de incubação no escuro a 37°C a suspensão foi lavada com PBS por centrifugação (1300 G, durante 5 minutos) e ressuspenso com 400 µL do mesmo tampão. A deteção foi realizada utilizando o comprimento de onda de excitação de 620 nm. Os dados obtidos foram depois analisados em termos de média das intensidades de fluorescência (MIF) com normalização relativamente ao controlo.

2.2.5.4. Avaliação da produção intracelular de glutathiona

De forma a avaliar a expressão intracelular de glutathiona (GSH), uma defesa antioxidante não enzimática, foi utilizada a citometria de fluxo com recurso a um composto fluorescente, o alaranjado de mercúrio. Este composto liga-se estequiometricamente aos grupos sulfidril, reagindo mais rapidamente com o GSH do que com os grupos sulfidril das proteínas, dando origem a um produto de reação que emite uma intensa fluorescência vermelha quando excitado com um laser de árgon no comprimento de onda de 488 nm [62].

Para este procedimento, as células foram centrifugadas a 1300 *G* durante 5 minutos e foi descartado o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* em 1 mL de PBS e foram adicionados 4 µL de alaranjado de mercúrio na concentração de 10 mM (Sigma, M7750) diluído em acetona (Sigma, 34850). Homogeneizou-se a suspensão e incubou-se durante 15 minutos no escuro a 37°C. Após a incubação, a suspensão foi lavada com PBS, centrifugada a 1300 *G* durante 5 minutos e ressuspensa em 400 µL do mesmo, sendo posteriormente guardada a 4°C. A deteção foi realizada no citómetro de fluxo no comprimento de onda de 620 nm e os resultados obtidos foram analisados como MIF com posterior normalização relativamente ao controlo.

2.2.5.5. Avaliação do ciclo celular

De forma a avaliar o ciclo celular será utilizado um método que utiliza uma solução de iodeto de propídeo (IP) e RNase. O IP tem sido o composto mais utilizado nestes estudos. Este composto tem a capacidade de se intercalar no DNA e no RNA pelo que, só é possível conseguir uma especificidade para a marcação do DNA através da remoção do RNA pelo uso de RNase [63]. A quantificação do conteúdo de DNA permite não só distribuir as células pelas diferentes fases do ciclo celular, mas também monitorizar o estado e a resposta aos tratamentos em pessoas com doenças cancerígenas [64]. As análises de ciclo celular por citometria de fluxo são representadas em histogramas de intensidade de fluorescência. As células de mamíferos caracterizam-se por possuir três tipos de populações de acordo com a fase no ciclo celular, células nas fases G2 e M que possuem o dobro do conteúdo de DNA das células que estão nas fases G0 e G1 e, por último, ainda existem as células na fase S [65].

Para este ensaio as células foram centrifugadas (1300 G, durante 5 minutos) e descartou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 200 µL de etanol a 70% com o tubo em agitação no vórtex e incubaram-se durante 30 minutos no escuro, a 4°C. Lavaram-se as células com 2 mL de PBS, depois foram centrifugadas (1300 G, durante 5 minutos) e o sobrenadante foi decantado. De seguida adicionaram-se 500 µL de *PI/RNase solution* (Immunostep, *PI/RNase*) e incubaram-se durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. A deteção foi feita utilizando o comprimento de onda de excitação de 488 nm.

2.2.6. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE DANOS AO NÍVEL DO DNA

A eletroforese em microgel de agarose, também conhecida como o ensaio cometa, devido à aparência de células individuais, é uma técnica simples e sensível para a avaliação de danos nas cadeias de DNA em células eucarióticas. Esta técnica foi primeiramente descrita por Östling & Johanson (1984), sendo realizada em condições de pH neutro mas permitindo apenas verificar danos no DNA ao nível de cadeias de dupla hélice. Mais tarde, Singh *et al.* (1988) introduziu uma modificação que permitiu obter também a informação acerca de danos em cadeias simples de DNA, nomeadamente, a realização do procedimento em condições alcalinas [66, 67].

No ensaio cometa células saudáveis e sem danos no seu DNA formam uma esfera densa e compacta sem arrastamento de fragmentos, enquanto que as células cujo DNA esteja danificado com quebras ao longo das cadeias formam uma cauda menos intensa que o núcleo (que se assemelha a um cometa, daí o nome do ensaio) ao ser aplicada uma diferença de potencial, onde os fragmentos negativamente carregados migram para o ânodo durante a eletroforese. Neste ensaio, o tamanho e forma da cauda formada refletem a extensão dos danos causados pelo que, constitui uma forma de avaliação quantitativa, uma vez que se consegue calcular a extensão dos danos celulares podendo ser realizada a análise com um *software* dedicado ou por classificação visual.

Este ensaio foi realizado para analisar a extensão dos danos no DNA provocada pelo AA nas células WiDr e verificar se há diferenças na resposta a diferentes concentrações deste composto. Em todos os ensaios foram preparadas culturas controlo em simultâneo, um controlo em que as células não foram sujeitas a tratamento e outro em que houve administração de H₂O₂, correspondendo ao controlo positivo e duas condições

que correspondem à presença de 2 e 5 mM de AA. Prepararam-se suspensões celulares de 50000 células/mL e as células correspondentes ao controlo positivo foram expostas a 20 nM de uma solução de peróxido de hidrogénio (Panreac, 121076), durante 15 minutos a 4°C. Após esse período, as células foram centrifugadas a 1300 *G* por 5 minutos e ressuspensas em PBS num volume igual ao inicial, para que as células se mantivessem na concentração de 50000/mL.

Lâminas de vidro StarFrost® (26x76 mm) foram previamente cobertas com uma fina camada de agarose de ponto de fusão normal (APFN) a 1% (Sigma, A2790) em apenas um dos lados e esperou-se que a agarose solidificasse. Posteriormente preparou-se uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (ABPF) a 1% (Sigma, A9414) e num *ependorf*® adicionaram-se iguais proporções da suspensão celular previamente preparada e da agarose ABPF, homogeneizou-se e espalhou-se 1 mL sobre as lâminas pré-cobertas com APFN. Seguidamente, cobriu-se a suspensão celular já nas lâminas com uma lamela, deixou-se arrefecer a 4°C e durante 30 minutos, sendo posteriormente retirada a lamela da agarose.

As lâminas previamente preparadas foram incubadas durante toda a noite com a solução de lise alcalina a 4°C, preparada de fresco, que contém 2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Trizma base, 10% de DMSO e 1% de Triton® X-100. Posteriormente as lâminas foram submersas em tampão de eletroforese, preparado de fresco, com 300 mM de NaOH e 1 mM de EDTA com o pH>13, e deixou-se durante pelo menos uma hora em equilíbrio.

A eletroforese foi realizada num único passo de 15 minutos com a diferença de potencial de 25V e com a corrente de 1A. Terminada a eletroforese, as lâminas foram embebidas em solução de neutralização de Tris.HCl na concentração de 0,4 M durante 5 minutos. Este último passo foi repetido 3 vezes, sendo a cada vez descartada a solução de neutralização.

Com o auxílio de uma pipeta, dispensaram-se algumas gotas de brometo de etídio (Bio-Rad, 161-0433) na concentração de 25 µg/mL sobre as lâminas neutralizadas que ficaram protegidas da luz durante 20 minutos à temperatura ambiente. Ao fim dos 20 minutos as lâminas foram lavadas em água Mili-Q para remover o excesso de brometo de etídio.

A análise e aquisição de imagens foram feitas num microscópio de fluorescência invertido com uma ampliação de 250x e com o filtro de excitação a 546 nm com uma

lâmpada de mercúrio com uma potência de 100 Watt, sendo que a emissão de fluorescência foi monitorizada a 580 nm no refletor com um filtro a 590 nm.

A obtenção e tratamento das imagens dos cometas foi efetuada com o auxílio do *software* Motic Images versão 2.0 (Microscope World). A análise dos cometas foi efetuada com recurso ao *software* TriTek CometScore™ Freeware v. 1.5, que permite o cálculo de dezassete parâmetros que contribuem para a compreensão do grau de lesão no DNA. Assim, considerámos três parâmetros que são essenciais neste tipo de análise, em especial, o momento da cauda do cometa que relaciona a quantidade de DNA e sua distribuição na cauda do cometa, o comprimento da cauda do cometa e a percentagem de DNA presente na cauda.

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM® SPSS® v. 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA). A avaliação da normalidade de distribuição das variáveis quantitativas foi feita de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. Foram utilizados testes paramétricos no caso de se verificar uma distribuição normal e testes não paramétricos no caso contrário.

Na análise de proliferação celular segundo o método SRB, os valores experimentais obtidos foram ajustados a um modelo sigmoidal de dose-resposta utilizando o *software* OriginPro v. 8.0:

$$Proliferação (\%) = \frac{100}{1 + 10^{P \cdot (\log x_0 - x)}} \quad (\text{eq. 6})$$

onde x_0 corresponde ao valor que inibe a proliferação a 50% (IC₅₀). A comparação dos valores obtidos entre diferentes condições terapêuticas dentro da mesma linha celular e entre linhas celulares para a mesma condição terapêutica foi realizada segundo o teste ANOVA de um fator, com comparações múltiplas de acordo com a correção de Bonferroni.

Na avaliação de tipo de morte celular e ciclo celular a comparação entre diferentes condições terapêuticas para cada linha celular foi efetuada realizando o teste ANOVA de um fator, no caso de existir normalidade da distribuição e homogeneidade das variâncias, ou o teste de Kruskal-Wallis em caso contrário. As comparações múltiplas seguiram a correção de Bonferroni.

Na comparação entre condições terapêuticas de produção de ROS e capacidade clonogénica, a comparação com o controlo foi realizada segundo o teste t de Student para uma média, enquanto que nas comparações entre as restantes condições foi utilizado o teste ANOVA de um fator ou o teste de Kruskal-Wallis (seleção do teste segundo os critérios anteriores). As comparações múltiplas foram obtidas segundo a correção de Bonferroni.

Considerou-se uma significância de 0,05 para todas as comparações.

Capítulo 3

RESULTADOS¹

¹ Os resultados apresentados ao longo deste capítulo foram obtidos em co-autoria com a Mestre Salomé Pires.

3.1. ESTUDOS *IN VITRO*

3.1.1. MONOTERAPIA COM VITAMINA C E 5-FLUOROURACILO

Os procedimentos descritos anteriormente foram executados de forma a, numa primeira fase, obtermos informação acerca do potencial terapêutico do AA, para posteriormente podermos relacionar os seus efeitos com os efeitos citotóxicos do 5FU ao nível da terapia combinada.

3.1.1.1. *Avaliação da proliferação celular*

O ensaio do SRB permitiu obter valores de proliferação celular em percentagem, relativa a culturas celulares que não foram sujeitas a qualquer tratamento, às quais se atribuiu um valor de proliferação de 100%. Estes valores permitiram traçar curvas de dose-resposta, que estão apresentadas ao longo da secção 3.1.1.

3.1.1.1.1. Efeito da vitamina C

Com o intuito de determinar o efeito citotóxico do AA nas culturas celulares das linhas C2BBe1, LS1034 e WiDr, as células foram incubadas com concentrações variáveis entre 0,25 mM a 20 mM. A Figura 3.15-A, B e C mostra as curvas dose-resposta para cada linha celular, após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição ao AA. Para traçar estas curvas utilizou-se como termo de comparação as culturas celulares controlo, ou seja, as células que não foram sujeitas a qualquer tratamento, às quais se atribuiu o valor de proliferação celular de 100%.

As curvas de dose-resposta foram calculadas pelo *software* OriginPro v. 8.0, o que através do processamento dos resultados obtidos permitiu obter a curva sigmoidal que melhor se ajusta aos resultados experimentais e forneceu a equação da mesma. Assim, foi possível calcular a concentração de AA que inibe em 50% a proliferação celular para as linhas celulares em estudo. Estes valores estão apresentados na Tabela 3.4-A, B e C.

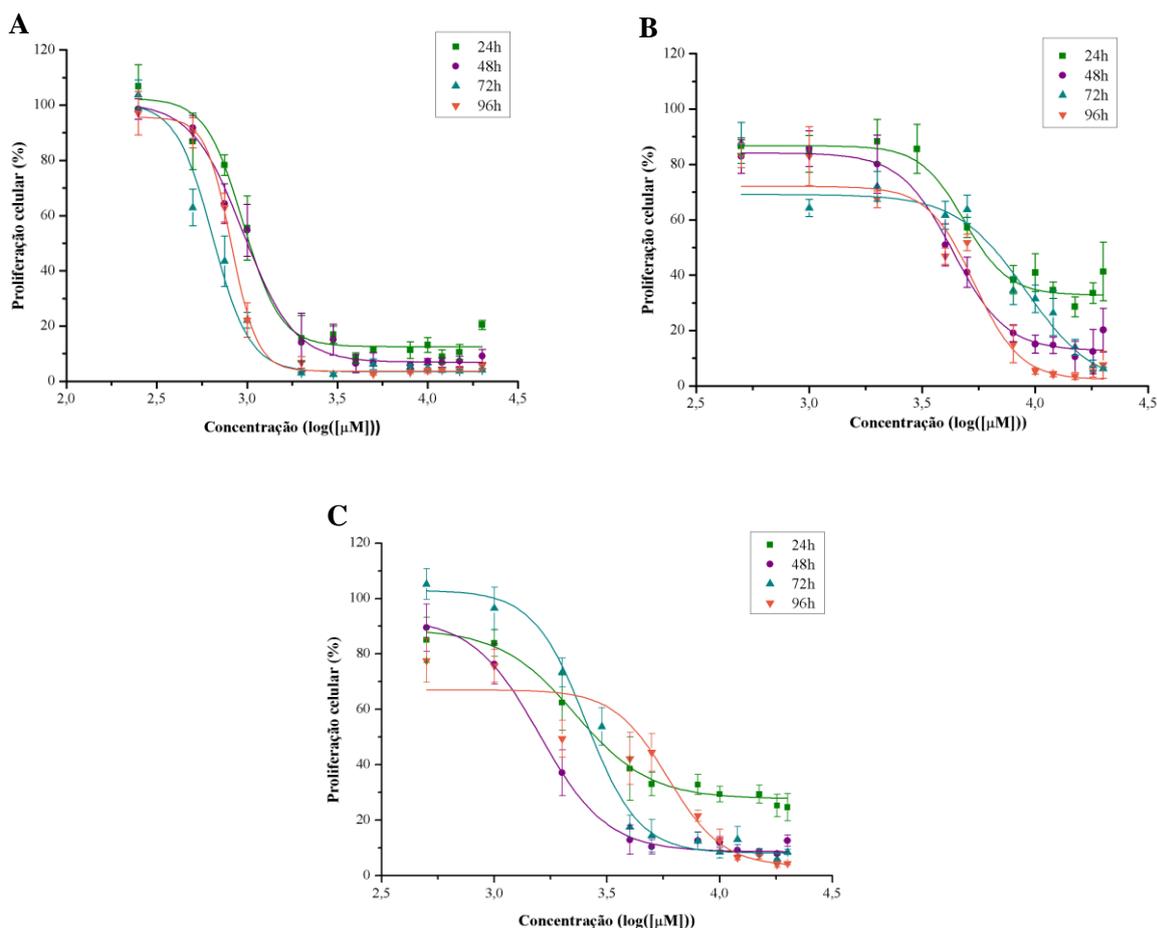


Figura 3.15. Curvas de dose-resposta das células das linhas celulares C2BBe1 (A), LS1034 (B) e WiDr (C) à incubação com AA. Após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação com AA, determinou-se a proliferação celular em percentagem (%) em função do logaritmo da concentração do AA, tendo-se obtido as respetivas curvas de dose-resposta.

Como se pode observar nos gráficos da Figura 3.15 o AA induz diminuição da proliferação celular de um modo dependente da dose e da linha celular.

Na linha celular C2BBe1 verifica-se uma diminuição da proliferação com o aumento do tempo de incubação, de modo que há uma diminuição do IC₅₀ às 72 (645,5 μM) e 96 horas de incubação (818,80 μM) relativamente ao IC₅₀ obtido às 24 (950,61 μM) e 48 horas (950,18 μM), embora sem significado estatístico. Contrariamente ao que acontece na linha celular C2BBe1, nas linhas celulares LS1034 e WiDr verifica-se um aumento do IC₅₀ às 72 e 96 horas de incubação, relativamente ao que se regista às 24 e 48 horas. Nas células LS1034 esse aumento é significativo tanto às 72 horas (p=0,001), como às 96 horas (p<0,001). Nas células WiDr, esse aumento é significativo às 72 (p=0,001) e 96 horas (p<0,001) relativamente às 48 horas de incubação, sendo que a

diferença entre o IC50 registado às 72 e 96 horas também é estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

De um modo geral, obtivemos valores de IC50 inferiores na linha celular C2BBe1. De facto, estes foram, para todos os períodos de incubação, significativamente inferiores ($p < 0,001$) aos valores de IC50 obtidos nas células LS1034. Adicionalmente, em comparação com as células WiDr os valores de IC50 das células C2BBe1 foram também significativamente inferiores para as 24 ($p = 0,006$) horas e 48 horas ($p = 0,041$) de incubação, assim como, para 72 horas e 96 horas de incubação ($p < 0,001$). Por outro lado, a linha celular que necessitou de maior concentração de AA para reduzir em 50% a proliferação celular foi a LS1034, sendo os valores de IC50 obtidos significativamente superiores aos das células WiDr ($p < 0,001$ às 24 e 72 horas de incubação e $p = 0,001$ às 48 horas de incubação) e C2BBe1 como se depreende pelo que foi indicado anteriormente.

Tabela 3.4. Valores de IC50 obtidos na incubação das linhas celulares C2BBe1 (A), LS1034 (B) e WiDr (C) com AA durante 24, 48, 72 e 96 horas. Estão também representados os valores de r^2 e intervalos de confiança obtidos.

A

| | Tempo de incubação (h) | IC50 (μM) | r^2 | Intervalo de confiança (μM) |
|---------------|------------------------|------------------------|-------|--|
| <i>C2BBe1</i> | 24 | 949,91 | 0,91 | [643,19 ; 1404,95] |
| | 48 | 950,16 | 0,99 | [824,48 ; 997,10] |
| | 72 | 645,51 | 0,92 | [483,10 ; 717,02] |
| | 96 | 818,80 | 0,96 | [712,50 ; 864,57] |

B

| | Tempo de incubação (h) | IC50 (μM) | r^2 | Intervalo de confiança (μM) |
|---------------|------------------------|------------------------|-------|--|
| <i>LS1034</i> | 24 | 4845,87 | 0,98 | [4305,84 ; 5453,59] |
| | 48 | 4330,75 | 0,99 | [3938,41 ; 4494,58] |
| | 72 | 9112,74 | 0,98 | [6896,12 ; 10162,32] |
| | 96 | 5367,04 | 0,96 | [4324,63 ; 5839,95] |

C

| | Tempo de incubação (h) | IC50 (μM) | r^2 | Intervalo de confiança (μM) |
|-------------|------------------------|------------------------|-------|--|
| <i>WiDr</i> | 24 | 2285,72 | 0,98 | [1574,28 ; 3318,61] |
| | 48 | 1587,91 | 0,94 | [989,26 ; 1910,73] |
| | 72 | 2552,33 | 0,98 | [2189,95 ; 2698,05] |
| | 96 | 5903,79 | 0,93 | [4464,30 ; 6585,71] |

3.1.1.1.2. Efeito do 5-Fluorouracilo

De modo a avaliar a citotoxicidade provocada pelo 5FU nas três linhas celulares, este foi administrado em concentrações entre 0,5 μM a 480 μM . O ensaio SRB foi realizado após 24, 48, 72 e 96 horas da administração do mesmo. A Figura 3.16–A, B e C representa as curvas de dose-resposta de cada uma das linhas celulares ao tratamento com 5FU para os tempos de incubação referidos.

Para obter as curvas de dose-resposta do 5FU utilizaram-se como termos de comparação as culturas celulares controlo, submetidas ao tratamento com o veículo de administração do mesmo (DMSO), às quais se atribuiu o valor de 100%.

As curvas de dose-resposta foram calculadas pelo *software* OriginPro v. 8.0, que através do processamento dos resultados obtidos permitiu obter a curva de melhor ajuste aos resultados experimentais e forneceu a equação da mesma. Calculou-se o IC50 para o 5FU nas quatro condições sempre que o ajuste o permitiu, estando os respetivos valores apresentados na Tabela 3.5-A, B e C.

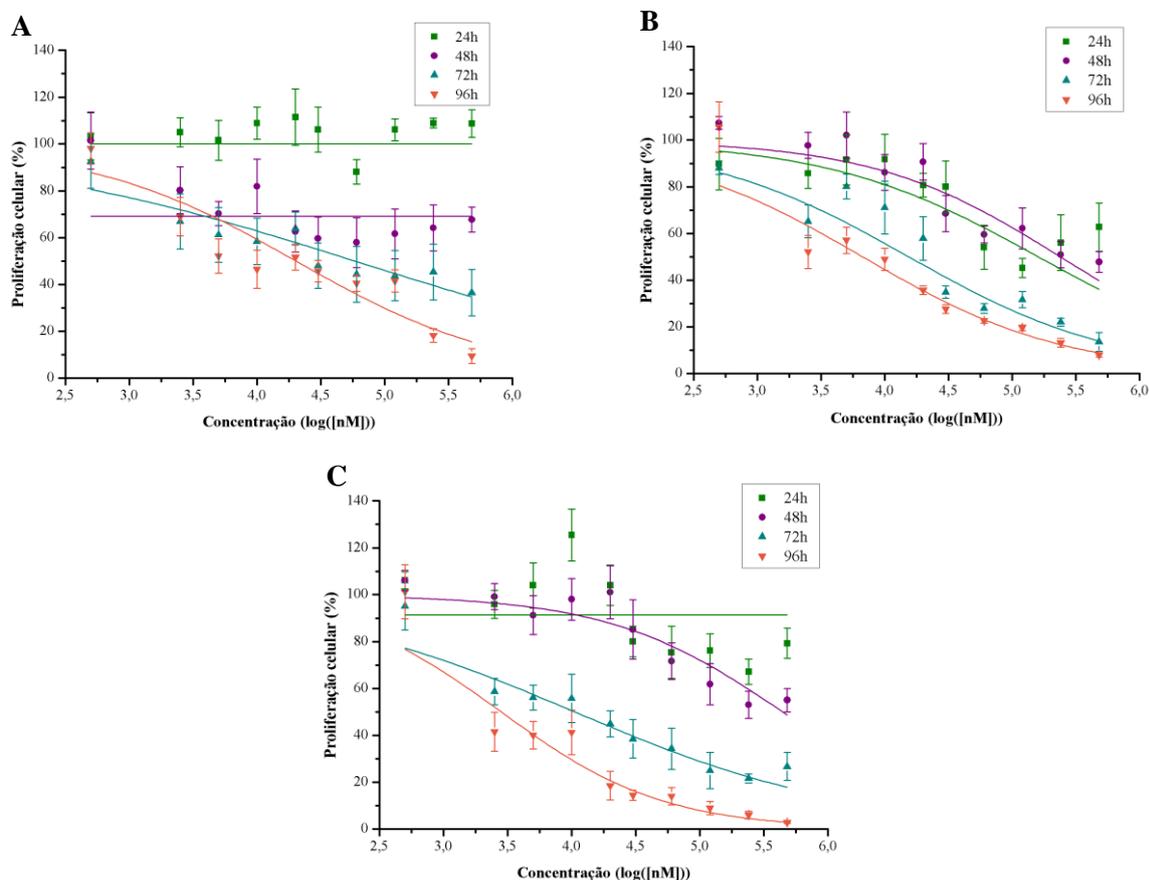


Figura 3.16. Curvas de dose-resposta das células das linhas celulares C2BBe1 (A), LS1034 (B) e WiDr (C) à incubação com 5FU. Após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação com 5FU, determinou-se a proliferação celular em percentagem (%) em função do logaritmo da concentração do 5FU, tendo-se obtido as respetivas curvas de dose-resposta.

Não foi possível calcular a concentração de 5FU correspondente ao IC50 para 24 e 48 horas de incubação na linha C2BBe1 e para 24 horas de incubação na linha WiDr. De facto, como se pode verificar na Figura 3.16-A, as curvas de melhor ajuste aos valores experimentais referentes às 24 e 48 horas não se aproximam de $y=50$, o mesmo verifica-se na Figura 3.16-C na curva relativa às 24 horas.

Nas três linhas celulares verifica-se uma diminuição do valor do IC50 ao longo do tempo. Na linha celular C2BBe1 verificou-se através da análise estatística que esta diminuição do valor de IC50 é significativa ($p=0,025$), no entanto, não foi possível determinar o intervalo de significado estatístico. Ao nível da linha celular LS1034 podemos observar através da análise da Tabela 3.5-B que há um aumento do IC50 das 24 para as 48 horas de incubação que, contudo, não é significativo. Às 72 e 96 horas o IC50 diminui significativamente ($p<0,001$) em relação aos valores obtidos às 24 e 48 horas. Nas células WiDr, o IC50 diminui à medida que aumenta o tempo de incubação, havendo sempre significado estatístico entre cada período de incubação ($p<0,001$ para diferença entre o IC50 às 48 e 72 horas e entre as 48 e 96 horas de incubação e $p=0,004$ para a diferença entre o IC50 às 72 e 96 horas de incubação).

De uma forma geral, às 72 e 96 horas de incubação, os valores de IC50 obtidos na linha celular C2BBe1 são significativamente superiores aos das células LS1034 ($p=0,013$ para as 72 horas e $p=0,016$ para as 96 horas) e WiDr ($p=0,001$ para as 72 horas e $p<0,001$ para as 96 horas). Também o valor de IC50 obtido nas células LS1034 às 96 horas é significativamente superior ($p=0,042$) ao obtido nas células WiDr.

Tabela 3.5. Valores de IC50 obtidos para a incubação das linhas celulares C2BBe1 (A), LS1034 (B) e WiDr (C) com 5FU durante 24, 48, 72 e 96 horas. Estão também representados os valores de r^2 e intervalos de confiança obtidos.

A

| | Tempo de incubação (h) | IC50 (μM) | r^2 | Intervalo de confiança (μM) |
|---------------|------------------------|------------------------|-------|--|
| <i>C2BBe1</i> | 24 | * | * | - |
| | 48 | * | * | - |
| | 72 | 58,05 | 0,80 | [27,12 ; 124,23] |
| | 96 | 20,14 | 0,88 | [10,24 ; 25,74] |

B

| | Tempo de incubação (h) | IC50 (µM) | r ² | Intervalo de confiança (µM) |
|---------------|------------------------|-----------|----------------|-----------------------------|
| <i>LS1034</i> | 24 | 159,69 | 0,70 | [64,16 ; 397,44] |
| | 48 | 238,01 | 0,86 | [104,79 ; 320,45] |
| | 72 | 15,39 | 0,93 | [8,76 ; 18,89] |
| | 96 | 6,69 | 0,96 | [4,28 ; 7,87] |

C

| | Tempo de incubação (h) | IC50 (µM) | r ² | Intervalo de confiança (µM) |
|-------------|------------------------|-----------|----------------|-----------------------------|
| <i>WiDr</i> | 24 | * | * | - |
| | 48 | 442,42 | 0,90 | [235,09 ; 832,59] |
| | 72 | 10,53 | 0,94 | [6,17 ; 12,78] |
| | 96 | 2,82 | 0,94 | [1,55 ; 3,50] |

* - Não foi possível calcular.

3.1.1.2. Avaliação da sobrevivência celular

A partir do ensaio SRB é possível determinar a citotoxicidade de um composto, uma vez que este método se baseia na síntese proteica total das células após a exposição a esse agente. No entanto, nesta técnica, o período de crescimento das células após a exposição ao composto é reduzido. Deste modo, o ensaio clonogénico apresenta-se como uma técnica que complementa o ensaio SRB na medida em que permite avaliar a sobrevivência celular, isto é, a capacidade de células individuais formarem colónias, após um período de tempo maior durante o qual as células podem crescer. Este ensaio foi efetuado para verificar o efeito do AA em monoterapia ao fim de 12 dias.

O gráfico da Figura 3.17 expressa a percentagem de colónias formadas na presença de AA em cada condição testada, calculada em relação às culturas controlo. No caso das linhas celulares C2BBel e WiDr as concentrações de AA testadas foram 0,5, 2 e 5 mM. Para a linha celular LS1034 utilizámos as concentrações 1, 5 e 20 mM.

Com os resultados obtidos verifica-se que em todas as linhas celulares, a presença de AA interfere com a capacidade de crescimento e formação de colónias. Na linha celular C2BBel o fator de sobrevivência diminui com o aumento da concentração deste composto, sendo esta diminuição significativa em relação ao controlo, para todas as concentrações de AA testadas (p=0,002 na situação em que está presente 0,5 mM de AA

e $p < 0,001$ nas restantes condições). O mesmo acontece no caso da linha celular LS1034 ($p = 0,004$ na situação em que está presente 1 mM de AA e $p < 0,001$ nas restantes condições). Relativamente às células WiDr, denota-se uma diminuição significativa do fator de sobrevivência quando as células foram incubadas com 2 mM ($p = 0,006$) e com 5 mM de AA ($p < 0,001$). Quando as três linhas celulares estão na presença de 5mM de AA (condição comum às três linhas celulares), o fator de sobrevivência é inferior nas células LS1034 e WiDr. No entanto, não foi possível comparar os valores obtidos entre linhas celulares pois, para tal as concentrações utilizadas teriam de ser todas iguais.

Registam-se também diferenças significativas na capacidade de formação de colónias entre as condições correspondentes à menor e à maior concentração de AA nas células C2BBe1 ($p < 0,001$), LS1034 ($p = 0,036$) e WiDr ($p = 0,042$).

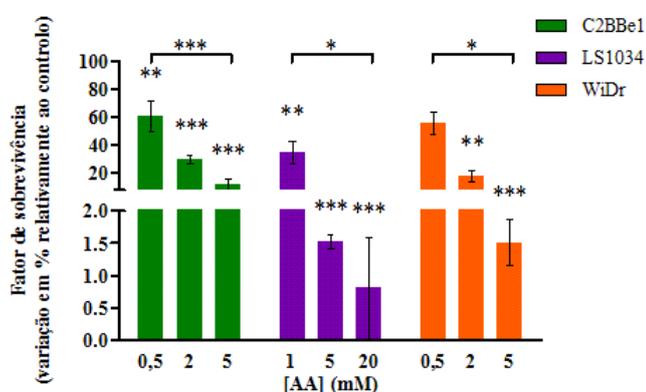


Figura 3.17. Análise da viabilidade celular das linhas C2BBe1, LS1034 e WiDr por ensaio clonogénico. As linhas celulares C2BBe1 e WiDr foram expostas às concentrações 0,5, 2 e 5 mM de AA e a linha LS1034 foi sujeita às concentrações 1, 5 e 20 mM de AA e a formação de colónias foi quantificada ao 12.º dia após o tratamento. O gráfico expressa a média e o erro padrão e percentagem de colónias formadas em relação ao controlo de pelo menos 3 experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Foi considerado um nível de significância de 0,05.

3.1.1.3. *Citometria de fluxo*

3.1.1.3.1. Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi analisada com recurso à dupla marcação com AV e IP por citometria de fluxo. Como foi referido anteriormente, esta marcação permite a distinção entre diferentes populações celulares: células viáveis (V), células em apoptose inicial (AI), células em apoptose tardia e necrose (AT/N) e células em necrose (N). Este ensaio foi realizado para avaliar o tipo de morte celular quando as células estão sob o efeito de AA isoladamente. Os gráficos da Figura 3.18 representam as diferentes populações identificadas em cada uma das condições testadas para as linhas celulares C2BBe1 (A), LS1034 (B) e WiDr (C).

Como é possível verificar na Figura 3.18 os estudos da viabilidade celular/morte celular realizados por citometria de fluxo, revelaram que o AA induz uma diminuição da população de células viáveis e aumento do número de células em apoptose tardia/necrose de um modo dependente da concentração de AA nas três linhas celulares. Verifica-se na linha celular C2BBe1 que a população de células viáveis no controlo corresponde a 73%, sendo que após 24 horas de tratamento e com 10 mM de AA diminuiu para 12% ($p < 0,001$). Ao nível da morte celular obtida, verifica-se que a população de células em apoptose inicial aumenta significativamente ($p = 0,022$) à medida que a concentração de AA sobe, no entanto, não foi possível determinar o intervalo de concentrações para o qual este aumento é significativo. Relativamente à morte celular por apoptose tardia/necrose, a população celular nesta condição aumenta significativamente entre as condições controlo e 10 mM de AA ($p = 0,002$), 0,5 mM e 10 mM de AA ($p = 0,001$), e 1 mM e 10 mM de AA ($p = 0,017$). Apesar de, pela análise do gráfico da Figura 3.18-A, podermos observar que a morte por necrose aumenta quando as células estão na presença de 10 mM de AA, este aumento não é estatisticamente significativo.

Na linha celular LS1034, o controlo possui uma população de células viáveis de 77%, diminuindo de forma estatisticamente significativa esta população para 45% após tratamento com 20 mM de AA durante 24 horas ($p < 0,001$). É possível observar na Figura 3.18-B um aumento da população celular em apoptose inicial na concentração 20 mM de AA significativo ($p = 0,005$) em comparação ao controlo. O mesmo se verifica para a população em apoptose tardia/necrose ($p = 0,002$). É possível verificar a existência de uma

percentagem considerável de células em necrose no controlo o que, contudo, acontece também nas três condições testadas.

Nas células WiDr a população celular viável no controlo é 87% mas após tratamento com 10 mM de AA esta população diminuiu para 35% ($p=0,005$). Tal como o que aconteceu nas células C2BBel, o incremento da concentração de AA provocou uma alteração significativa ($p=0,033$) ao nível da população celular em apoptose inicial, apesar de não ter sido possível identificar o intervalo de concentrações de AA para o qual o aumento de células em apoptose inicial é significativo. A concentração de 10 mM de AA provocou um aumento de células em apoptose tardia/necrose relativamente ao controlo ($p=0,038$) e à concentração de 0,5 mM de AA ($p=0,011$). Pela análise do gráfico da Figura 3.18-C, constatamos que na concentração de 10 mM de AA há um grande aumento da população celular em necrose face à que se observa no controlo ($p=0,002$).

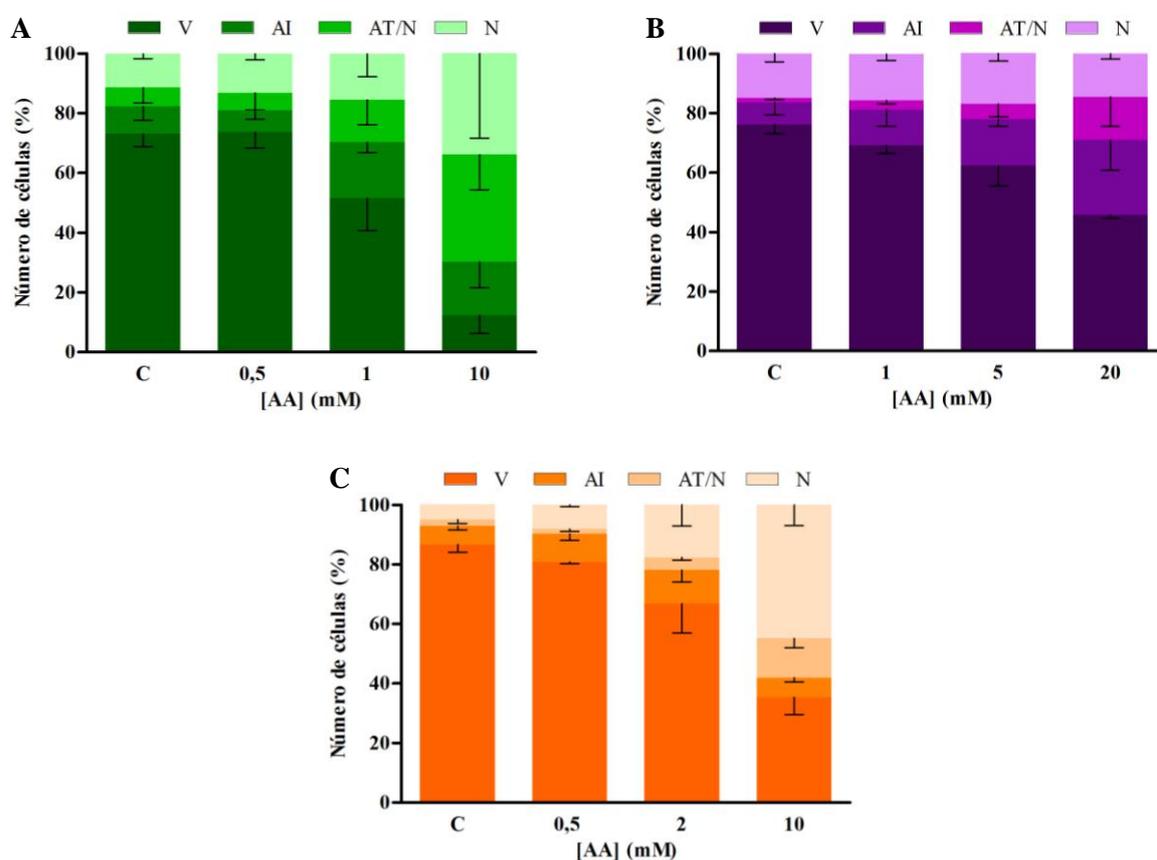


Figura 3.18. Avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação com AV e IP. Os resultados estão representados na forma de percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N), 24 horas após a incubação das C2BBel (A), LS1034 (B) e WiDr (C) com AA. Os resultados exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos três experiências independentes.

3.1.1.3.2. Avaliação da produção de ROS

Atendendo ao envolvimento das ROS nos efeitos citotóxicos do AA [24], [29], procedeu-se à avaliação da produção intracelular de radical superóxido e de peróxidos utilizando para tal as sondas DHE e DCFH₂-DA, respetivamente. Nestes ensaios testou-se unicamente o efeito do AA isoladamente, pois pretende-se averiguar nesta fase quais as espécies envolvidas nos efeitos citotóxicos provocados pela vitamina C.

No que diz respeito à produção intracelular de radical superóxido, os resultados obtidos nas três linhas celulares C2BBe1, LS1034 e WiDr estão representados no gráfico da Figura 3.19, estando expressos em relação ao controlo, ao qual se atribuiu o valor de 1. É possível verificar que na linha C2BBe1 se regista um aumento significativo ($p < 0,001$) da produção de radical superóxido da concentração de 0,5 mM para 1 mM e de 0,5 mM para 10 mM de AA, assim como de 1 mM para 10 mM ($p = 0,03$).

Na linha celular LS1034 constata-se que não existem variações significativas na produção do radical à medida que aumenta a concentração de vitamina C.

Nas células WiDr há uma tendência para o aumento da produção da espécie avaliada à medida que a concentração de AA aumenta, sendo este aumento significativo relativamente à situação controlo quando a concentração de AA é 2 mM ($p = 0,018$) e 10 mM ($p = 0,048$). Adicionalmente verifica-se que a diferença na produção intracelular de O₂^{-•} entre a concentração de 0,5 mM e 10 mM de AA é também significativa ($p = 0,01$).

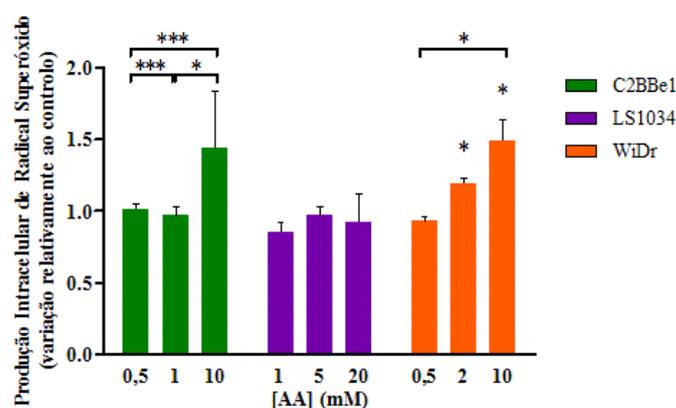


Figura 3.19. Avaliação da produção intracelular de radical superóxido por citometria de fluxo recorrendo à marcação com DHE. O estudo foi efetuado nas células C2BBe1, LS1034 e WiDr tratadas com AA. Para cada condição, os resultados são expressos em relação ao controlo (corresponde a 1) e exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Foi considerado um nível de significância de 0,05.

Os resultados obtidos relativamente à produção de peróxidos nas três linhas celulares C2BBE1, LS1034 e WiDr estão representados no gráfico da Figura 3.20, estando expressos em relação ao controlo, ao qual se atribui o valor de 1.

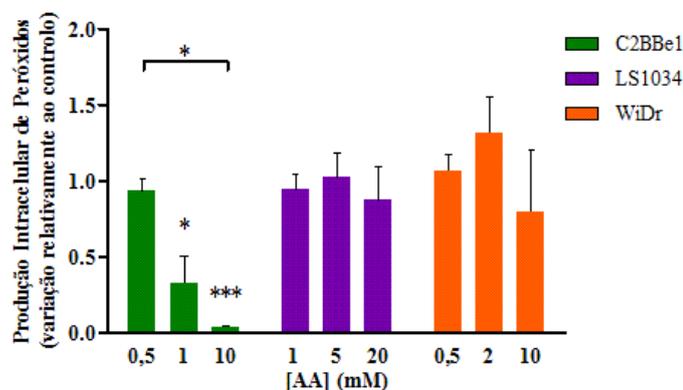


Figura 3.20. Avaliação da produção intracelular de peróxidos por citometria de fluxo recorrendo à marcação com DCFH₂-DA. O estudo foi efetuado nas células C2BBE1, LS1034 e WiDr tratadas com AA. Para cada condição, os resultados são expressos em relação ao controlo (corresponde a 1) e exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Foi considerado um nível de significância de 0,05.

Podemos verificar que na linha celular C2BBE1 há uma diminuição da produção de peróxidos à medida que a concentração de AA aumenta, sendo esta diminuição significativa relativamente ao controlo quando as células estão na presença de 1 mM ($p=0,03$) e de 10 mM ($p < 0,001$) de AA. Também a diferença obtida entre as concentrações 0,5 e 10 mM de AA é significativa ($p=0,01$).

As células LS1034 respondem à presença de AA com uma ligeira diminuição da produção de peróxidos quando este é administrado nas concentrações de 1 mM e de 20 mM, registando-se um aumento, também sem significado estatístico, na concentração de 5 mM.

Na linha WiDr verifica-se uma tendência para o aumento da produção de peróxidos para as concentrações de AA mais baixas (0,5 mM e 2 mM), e diminuição na concentração de 10 mM, embora não exista qualquer relevância estatística.

3.1.1.3.3. Avaliação da expressão de glutathiona livre

Os resultados da avaliação da expressão intracelular de glutathiona nas linhas celulares estão representados no gráfico da Figura 3.21, estando expressos em relação ao controlo, ao qual se atribui o valor de 1. Pelo facto da variação da presença de GSH livre estar relacionada com a produção de ROS, também nesta situação avaliou-se o efeito do AA isoladamente.

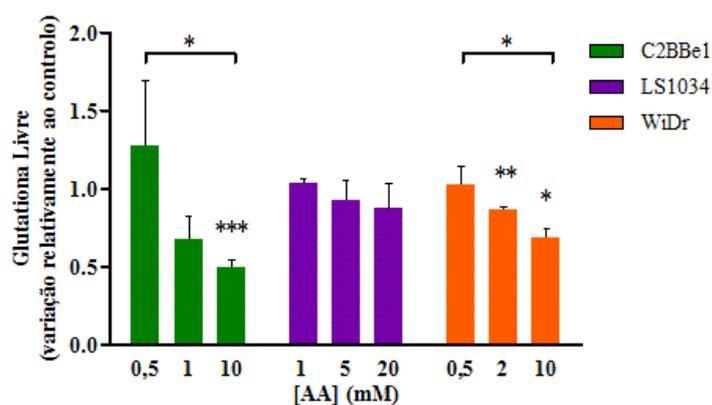


Figura 3.21. Avaliação da concentração intracelular de GSH livre por citometria de fluxo recorrendo à marcação com o alaranjado de mercúrio. O estudo foi efetuado nas células C2BBel, LS1034 e WiDr tratadas com AA. Para cada condição, os resultados são expressos em relação ao controlo (corresponde a 1) e exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Foi considerado um nível de significância de 0,05.

De uma forma geral, a expressão de GSH tem tendência a aumentar ligeiramente relativamente ao controlo quando o AA está presente na concentração mais baixa e a diminuir à medida que a concentração de AA aumenta.

A utilização de 10 mM de AA na linha C2BBel e de 2 mM e 10 mM na linha WiDr são suficientes para introduzir diferenças na concentração de GSH livre relativamente ao controlo ($p < 0,001$, $p = 0,006$ e $p = 0,012$ respetivamente). Também em ambas as linhas celulares se verifica uma diminuição significativa da presença de GSH livre entre as concentrações 0,5 mM e 10 mM de AA ($p = 0,012$ para C2BBel e $p = 0,01$ para WiDr). Na linha celular LS1034 não se verifica a existência de variações significativas na expressão de GSH com o aumento da concentração de vitamina C.

3.1.1.4. Avaliação de danos no DNA pelo ensaio cometa

De modo a avaliar se o AA tem efeitos nocivos ao nível do DNA nas células WiDr, efetuou-se o ensaio cometa. De referir que, por questões experimentais, estes resultados são preliminares e representam uma experiência independente. A análise das imagens obtidas foi efetuada de forma qualitativa, pela análise visual dos gráficos, e de forma quantitativa através de três parâmetros: o momento da cauda do cometa (MC), a percentagem de DNA na cauda (% DNA) e o comprimento da cauda (CC) do cometa. Tendo em conta que o momento da cauda representa o produto entre a % DNA e o CC, dar-se-á maior ênfase a este parâmetro, visto que permite analisar os resultados em termos de extensão de dano (pelo CC) e de quantidade de dano (pela % DNA) [68]. Na Figura 3.22 representam-se as imagens dos cometas obtidas para as quatro condições a que as células foram sujeitas.

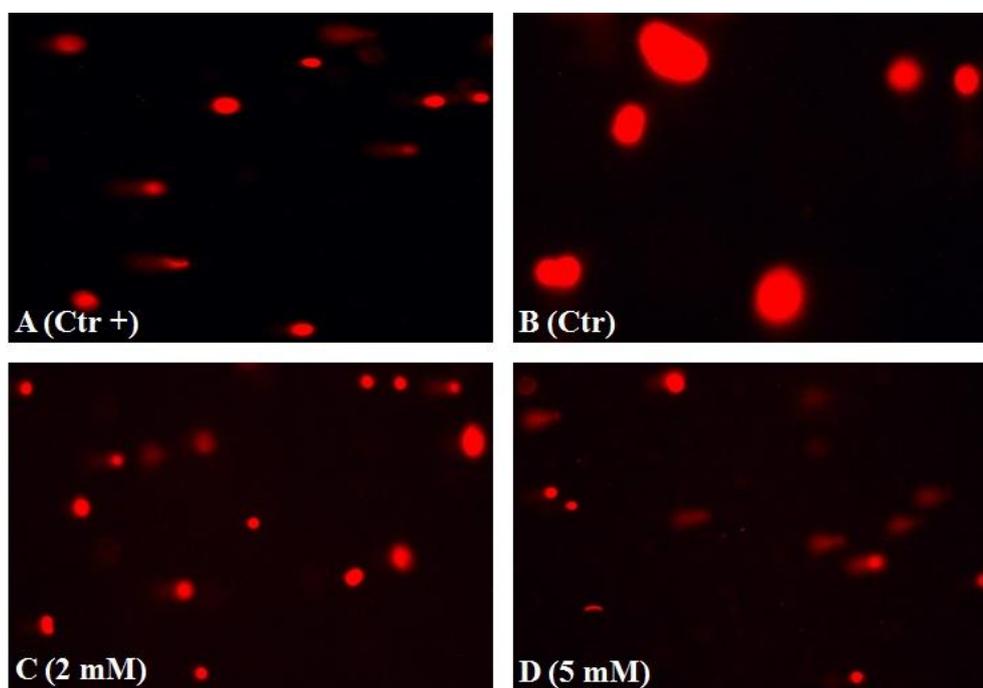


Figura 3.22. Imagens dos cometas da linha celular WiDr às 24 horas de incubação, obtidas para cada condição a que as células foram sujeitas: (A) controlo positivo, células sujeitas a 20 nM de peróxido de hidrogénio, (B) controlo, células não sujeitas a tratamento com AA, (C) células sujeitas a 2 mM de AA, (D) células sujeitas a 5 mM de AA.

Através de uma análise qualitativa da Figura 3.22 é possível verificar que a linha celular WiDr é suscetível a danos ao nível do DNA quando sujeita ao tratamento com AA. Observa-se aumento do tamanho da cauda dos cometas com a presença de maiores concentrações de AA, ou seja, o aumento da concentração deste composto parece favorecer uma maior extensão de danos no DNA.

Os gráficos da Figura 3.23, Figura 3.24 e Figura 3.25 representam as diferenças ao nível do momento da cauda, percentagem de DNA na cauda e tamanho da cauda dos cometas, obtidas em cada uma das condições. Podemos verificar que, de facto, o aumento da concentração de AA provoca o aumento de cada um dos parâmetros, ou seja, parece haver uma tendência ao aumento dos danos no DNA desta linha celular com a presença de concentrações crescentes de AA.

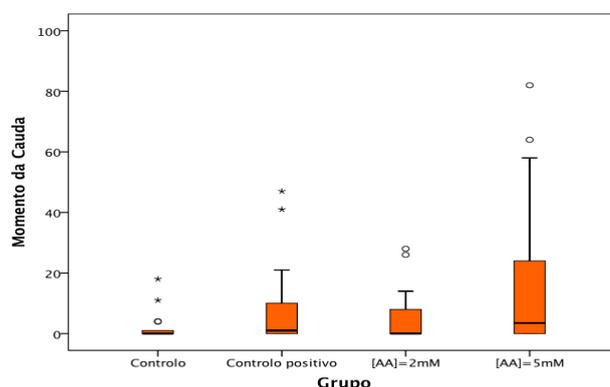


Figura 3.23. Momento de cauda obtido para as populações presentes em cada condição. No gráfico estão representados os valores de momento de cauda obtidos para as condições controlo, em que não houve qualquer tratamento das células e controlo positivo e as condições em que houve administração de 2 mM e 5 mM de AA. Os valores discrepantes encontram-se assinalados com \circ e $*$.

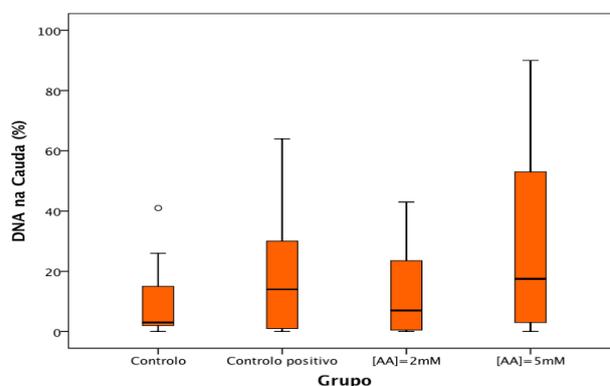


Figura 3.24. Percentagem de DNA presente nas caudas dos cometas presentes em cada condição. No gráfico estão representadas as percentagens de DNA presente na cauda dos cometas obtidos para as condições controlo, em que não houve qualquer tratamento das células e controlo positivo e as condições em que houve administração de 2 mM e 5 mM de AA. Os valores discrepantes encontram-se assinalados com \circ .

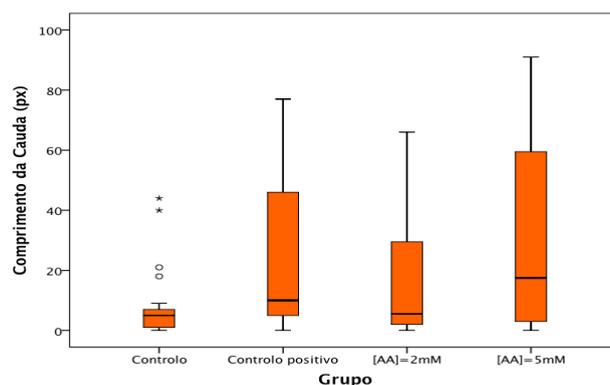


Figura 3.25. Comprimento das caudas dos cometas obtidos para cada condição. No gráfico estão representados os valores de comprimento da cauda dos cometas obtidos para as condições controlo, em que não houve qualquer tratamento das células e controlo positivo e as condições em que houve administração de 2 mM e 5 mM de AA. Os valores discrepantes encontram-se assinalados com \circ e $*$.

3.1.2. TERAPIA COMBINADA

Uma vez efetuada a avaliação do efeito anti-proliferativo/citotóxico do AA e do 5FU em monoterapia foi analisado o efeito da combinação deste par de compostos.

3.1.2.1. Avaliação da proliferação celular

Este estudo, que permite avaliar os efeitos da combinação dos dois compostos ao nível da capacidade de proliferar das células, foi também efetuado pelo ensaio colorimétrico do SRB, após 48, 72 e 96 horas de incubação com ambos os compostos, de acordo com as duas metodologias de administração referidas no Capítulo Materiais e Métodos.

Na Figura 3.26, Figura 3.27 e Figura 3.28 estão apresentados os resultados obtidos na proliferação das linhas celulares C2BBel, LS1034 e WiDr tratadas com a combinação de AA e 5FU para $f = 0,5$ (A) e $f = 0,75$ (B) durante 48, 72 e 96 horas. Para traçar as curvas dose-resposta foi utilizado como termo de comparação as culturas celulares controlo, ou seja, as células que não foram sujeitas a qualquer tratamento, às quais se atribuiu o valor de proliferação celular de 100%. As curvas de dose-resposta foram

calculadas pelo *software* OriginPro v. 8.0, que através do processamento dos resultados obtidos permitiu obter a curva de melhor ajuste aos resultados experimentais e forneceu a equação da mesma. Assim, foi possível calcular as concentrações de AA e 5FU em combinação que inibe em 50% a proliferação celular para as linhas celulares em estudo. Estes valores estão apresentados na Tabela 3.6, Tabela 3.7 e Tabela 3.8.

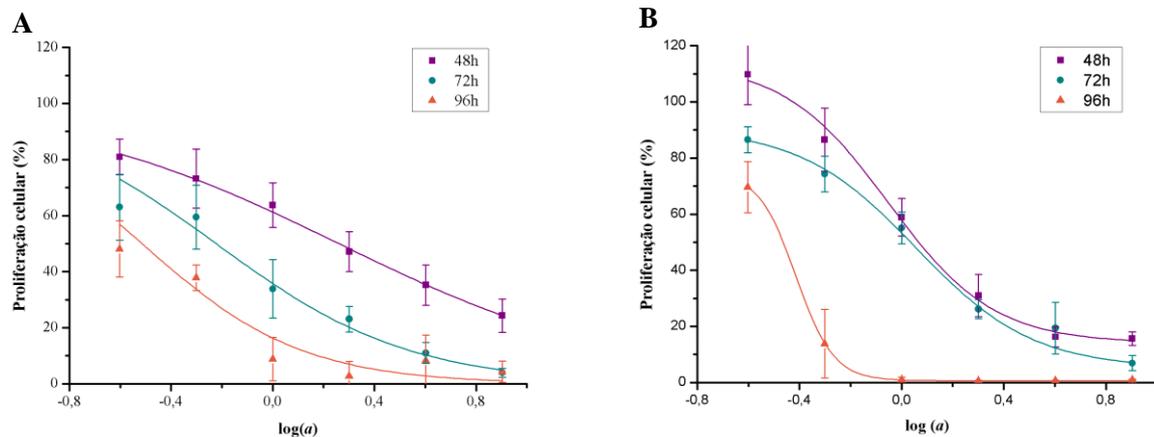


Figura 3.26. Curvas de dose-resposta das células da linha celular C2BBel à incubação com AA e 5FU. Após 48, 72 e 96 horas de incubação com AA e 5FU, determinou-se a proliferação celular em percentagem (%) em função do logaritmo da constante a para $f = 0,5$ (A) e $f = 0,75$ (B), tendo-se obtido as respetivas curvas dose-resposta.

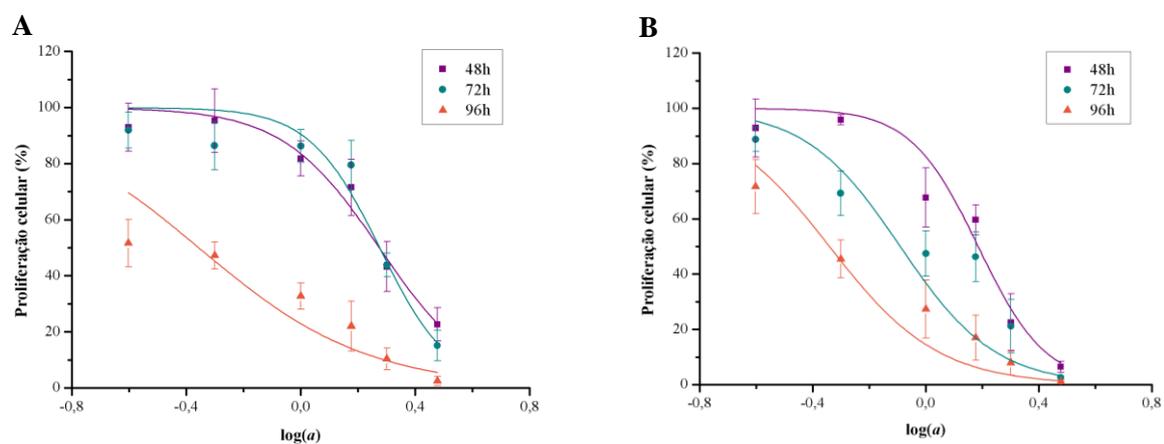


Figura 3.27. Curvas de dose-resposta das células da linha celular LS1034 à incubação com AA e 5FU. Após 48, 72 e 96 horas de incubação com AA e 5FU, determinou-se a proliferação celular em percentagem (%) em função do logaritmo da constante a para $f = 0,5$ (A) e $f = 0,75$ (B), tendo-se obtido as respetivas curvas dose-resposta.

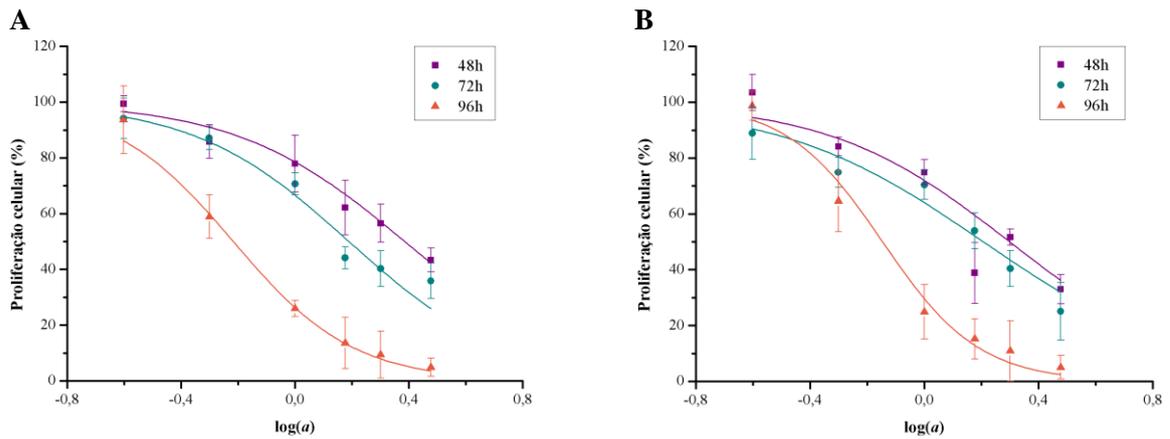


Figura 3.28. Curvas de dose-resposta das células da linha celular WiDr à incubação com AA e 5FU. Após 48, 72 e 96 horas de incubação com AA e 5FU, determinou-se a proliferação celular em percentagem (%) em função do logaritmo da constante a para $f = 0,5$ (A) e $f = 0,75$ (B), tendo-se obtido as respetivas curvas dose-resposta.

Verificamos com este ensaio que, ao contrário do que acontece na monoterapia com AA, em todas as linhas celulares há uma diminuição do valor do IC50 relativo ao composto AA, à medida que aumenta o período de incubação.

Tabela 3.6. Valores de IC50 obtidos com a incubação da linha celular C2BBel com a combinação de AA e 5FU para $f=0,5$ (A) e $f=0,75$ (B) durante 48, 72 e 96 horas. Estão também representados os valores de r^2 e intervalos de confiança obtidos.

A

| | | $f = 0,5$ | | | | |
|---------------|------------------------|------------------------|-------|-------|--|---------------|
| | Tempo de incubação (h) | IC50 (μM) | | r^2 | Intervalo de confiança (μM) | |
| | | AA | 5FU | | AA | 5FU |
| <i>C2BBel</i> | 48 | 745,30 | 18,33 | 1,00 | [105,10;5285,3] | [1,44;232,91] |
| | 72 | 245,23 | 6,03 | 0,97 | [16,61;3620,14] | [0,50;72,97] |
| | 96 | 125,38 | 3,08 | 0,89 | [7,5;2096,80] | [0,21;44,56] |

B

| <i>f</i> = 0,75 | | | | | | |
|-----------------|------------------------|-----------|------|-----------------------|-----------------------------|----------------|
| | Tempo de incubação (h) | IC50 (μM) | | <i>r</i> ² | Intervalo de confiança (μM) | |
| | | AA | 5FU | | AA | 5FU |
| <i>C2BBe1</i> | 48 | 841,61 | 6,90 | 0,99 | [154,97;4570,65] | [0,07;642,08] |
| | 72 | 637,90 | 5,23 | 0,99 | [228,17;1783,42] | [0,09;323,36] |
| | 96 | 160,20 | 1,31 | 0,93 | [5,35;4800,80] | [0,003;683,50] |

Tabela 3.7. Valores de IC50 obtidos com a incubação da linha celular LS1034 com a combinação de AA e 5FU para *f*=0,5 (A) e *f*=0,75 (B) durante 48, 72 e 96 horas. Estão também representados os valores de *r*² e intervalos de confiança obtidos.

A

| <i>f</i> = 0,5 | | | | | | |
|----------------|------------------------|-----------|------|-----------------------|-----------------------------|--------------|
| | Tempo de incubação (h) | IC50 (μM) | | <i>r</i> ² | Intervalo de confiança (μM) | |
| | | AA | 5FU | | AA | 5FU |
| <i>LS1034</i> | 48 | 5042,90 | 6,29 | 0,98 | [655,05;38822,61] | [0,71;55,82] |
| | 72 | 5057,32 | 6,31 | 0,95 | [652,43;39201,85] | [0,71;56,17] |
| | 96 | 1179,98 | 1,47 | 0,87 | [63,98;21760,77] | [0,1;22,01] |

B

| <i>f</i> = 0,75 | | | | | | |
|-----------------|------------------------|-----------|------|-----------------------|-----------------------------|---------------|
| | Tempo de incubação (h) | IC50 (μM) | | <i>r</i> ² | Intervalo de confiança (μM) | |
| | | AA | 5FU | | AA | 5FU |
| <i>LS1034</i> | 48 | 6164,55 | 2,56 | 0,99 | [2211,89;17180,61] | [0,05;125,65] |
| | 72 | 3269,88 | 1,36 | 0,95 | [662,06;16149,86] | [0,01;136,74] |
| | 96 | 1834,73 | 0,76 | 0,94 | [540,65;6226,22] | [0,01;48,56] |

Tabela 3.8. Valores de IC50 obtidos com a incubação da linha celular WiDr com a combinação de AA e 5FU para $f=0,5$ (A) e $f=0,75$ (B) durante 48, 72 e 96 horas. Estão também representados os valores de r^2 e intervalos de confiança obtidos.

A

| <i>f = 0,5</i> | | | | | | |
|----------------|------------------------|------------------------|------|-------|--|--------------|
| <i>WiDr</i> | Tempo de incubação (h) | IC50 (μM) | | r^2 | Intervalo de confiança (μM) | |
| | | AA | 5FU | | AA | 5FU |
| | 48 | 7165,56 | 3,42 | 0,98 | [850,13;60397,11] | [0,33;35,85] |
| | 72 | 4568,15 | 2,18 | 0,92 | [528,69;39470,88] | [0,21;23,14] |
| | 96 | 1792,34 | 0,86 | 0,99 | [219,44;14639,32] | [0,08;8,84] |

B

| <i>f = 0,75</i> | | | | | | |
|-----------------|------------------------|------------------------|------|-------|--|--------------|
| <i>WiDr</i> | Tempo de incubação (h) | IC50 (μM) | | r^2 | Intervalo de confiança (μM) | |
| | | AA | 5FU | | AA | 5FU |
| | 48 | 8797,95 | 1,40 | 0,98 | [2862,14;27044,05] | [0,02;81,35] |
| | 72 | 7125,60 | 1,13 | 0,92 | [2265,31;2241380] | [0,02;66,70] |
| | 96 | 3162,36 | 0,50 | 0,99 | [1040,24;9613,67] | [0,01;29,08] |

A realização deste ensaio permitiu determinar, através do cálculo do índice de combinação, a existência ou não de sinergia entre os dois compostos. Tal como referido anteriormente, no cálculo deste índice obtemos um valor que poderá ser inferior, igual ou superior a 1. Quando o resultado é igual a 1, considera-se que a mistura dos compostos tem um efeito aditivo. Se o resultado for inferior a 1 e ambos os compostos tiverem ação quando administrados isoladamente, então existe sinergia entre ambos. Se, pelo contrário, o resultado for superior a 1, então a combinação é antagonista. Os valores de I obtidos em cada linha celular para cada condição estão representados na Tabela 3.9.

Tabela 3.9. Índice de combinação (*I*) obtido em cada linha celular para $f=0,5$ e $f=0,75$, a cada período de incubação (48, 72 e 96 horas).

| Linha celular | <i>f</i> | Tempo (h) | <i>I</i> |
|----------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| C2BBe1 | 0,5 | 48 | * |
| | | 72 | 0,6 |
| | | 96 | 0,31 |
| | 0,75 | 48 | * |
| | | 72 | 1,62 |
| | | 96 | 0,57 |
| LS1034 | 0,5 | 48 | 1,88 |
| | | 72 | 1,88 |
| | | 96 | 0,44 |
| | 0,75 | 48 | 2,22 |
| | | 72 | 1,21 |
| | | 96 | 0,69 |
| WiDr | 0,5 | 48 | 2,43 |
| | | 72 | 1,55 |
| | | 96 | 0,61 |
| | 0,75 | 48 | 2,55 |
| | | 72 | 2,41 |
| | | 96 | 1,07 |

* - Não foi possível calcular

Podemos verificar, atendendo ao cálculo do índice de combinação que a mistura dos dois compostos não resultou num efeito aditivo em nenhuma linha celular. No entanto, na linha celular C2BBe1 obtivemos efeito sinérgico quando $f=0,5$ às 72 horas ($I=0,6$) e 96 horas ($I=0,31$) de incubação e quando $f=0,75$ às 96 horas de incubação ($I=0,57$). Além disto, nesta linha celular conseguimos diminuir significativamente ($p=0,029$) o IC50 do composto 5FU às 72 horas ($f=0,5$) relativamente ao IC50 deste composto para o mesmo período de incubação na monoterapia.

Relativamente à linha celular LS1034, conseguimos obter igualmente efeito sinérgico para $f=0,5$ ($I=0,44$) e $f=0,75$ ($I=0,69$) às 96 horas de incubação. Também nesta

linha celular conseguimos diminuir significativamente o IC50 do composto 5FU às 48 horas de incubação para $f=0,5$ ($p<0,001$) e $f=0,75$ ($p=0,006$) relativamente ao IC50 deste composto na monoterapia para o mesmo período de incubação.

Na linha celular WiDr, obtivemos efeito sinérgico apenas para a situação em que os fármacos são administrados com uma proporção de 0,5 e as células permanecem expostas a esta mistura por 96 horas ($I=0,61$). No entanto, não foi para esta condição que se revelou existir uma diminuição significativa do IC50 do 5FU na situação de terapia combinada relativamente à situação de monoterapia, mas sim às 48 horas de incubação quando $f=0,5$ ($p<0,001$) e $f=0,75$ ($p=0,014$).

Há que realçar que, para cada linha celular, todas as outras condições em que não foi referido haver ou não efeito sinérgico, significa que nessas situações obtivemos um efeito antagonista ($I>1$).

Através da análise da Figura 3.29, conseguimos ter uma maior perceção das diferenças existentes entre os IC50 de cada composto obtidas em monoterapia e os IC50 dos mesmos obtidos na terapia combinada. Na Figura 3.29-A, B, C, D, E e F estão representados estes valores para as linhas celulares C2BBe1 (A e B), LS1034 (C e D) e WiDr (E e F) tendo em conta os valores de IC50 obtidos na terapia combinada para $f=0,5$ (A, C e E) e $f=0,75$ (B, D e F).

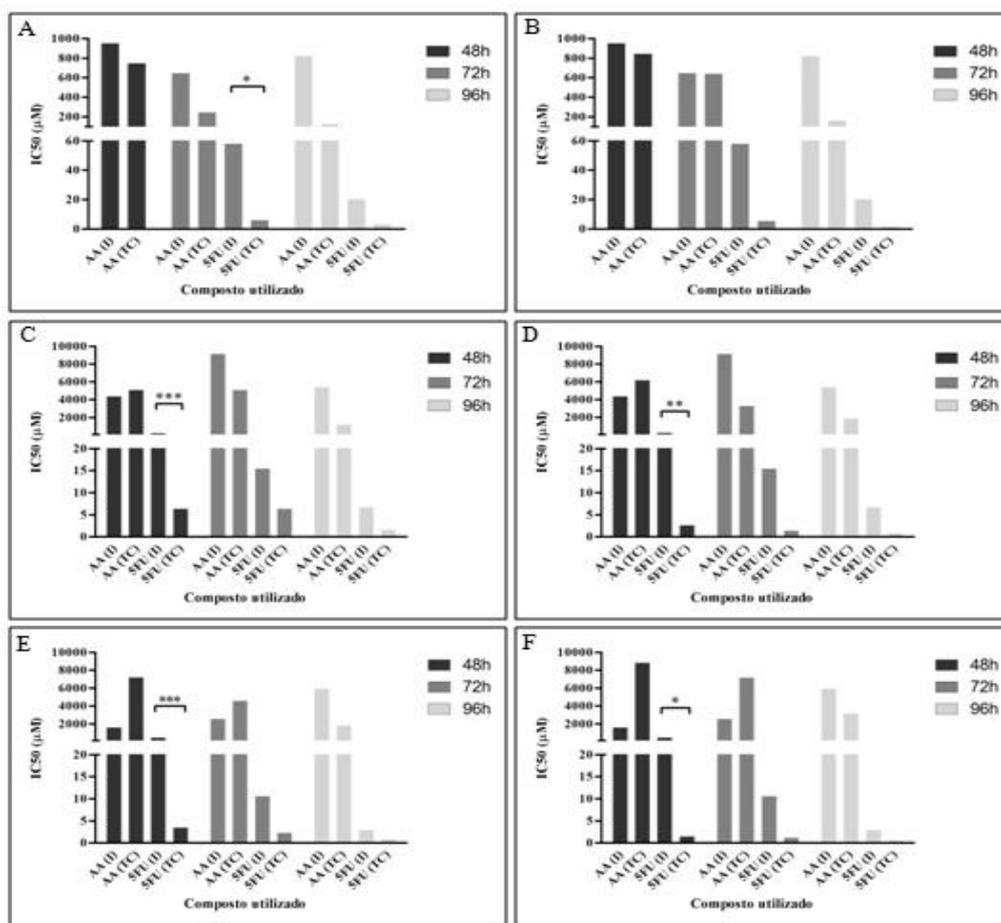


Figura 3.29. Diferenças entre os valores de IC50. Os gráficos representam os valores de IC50 do AA e 5FU quando administrados isoladamente (I) e os IC50 dos dois compostos quando administrados em combinação (TC) nas linhas celulares C2BBe1 (A e B), LS1034 (C e D) e WiDr (E e F) para $f=0,5$ (A, C e E) e para $f=0,75$ (B, D e F) e para os três períodos de incubação considerados na terapia combinada (48, 72 e 96 horas). As diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de 5FU estão assinaladas com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Foi considerado um nível de significância de 0,05.

3.1.2.2. Avaliação da sobrevivência celular

Uma vez efetuada a avaliação do efeito do AA no crescimento e formação de colónias, foi analisado o efeito da combinação deste composto com 5FU. O gráfico da Figura 3.30-A, B e C expressa a percentagem de colónias formadas na presença de AA e 5FU isoladamente ou em combinação em que $f=0,75$ para cada condição, calculada em relação às culturas controlo, para as linhas celulares C2BBe1 (A), LS1034 (B) e WiDr (C). Para as culturas em que houve administração de AA isoladamente as culturas controlo utilizadas para os cálculos foram aquelas em que não houve administração de

qualquer composto. Já para as culturas em que houve administração de 5FU isoladamente ou a junção dos dois compostos, atendendo a que o 5FU é dissolvido em DMSO, as culturas controle consideradas para os cálculos foram aquelas em que houve administração de DMSO, tal como explicado anteriormente no capítulo Materiais e Métodos.

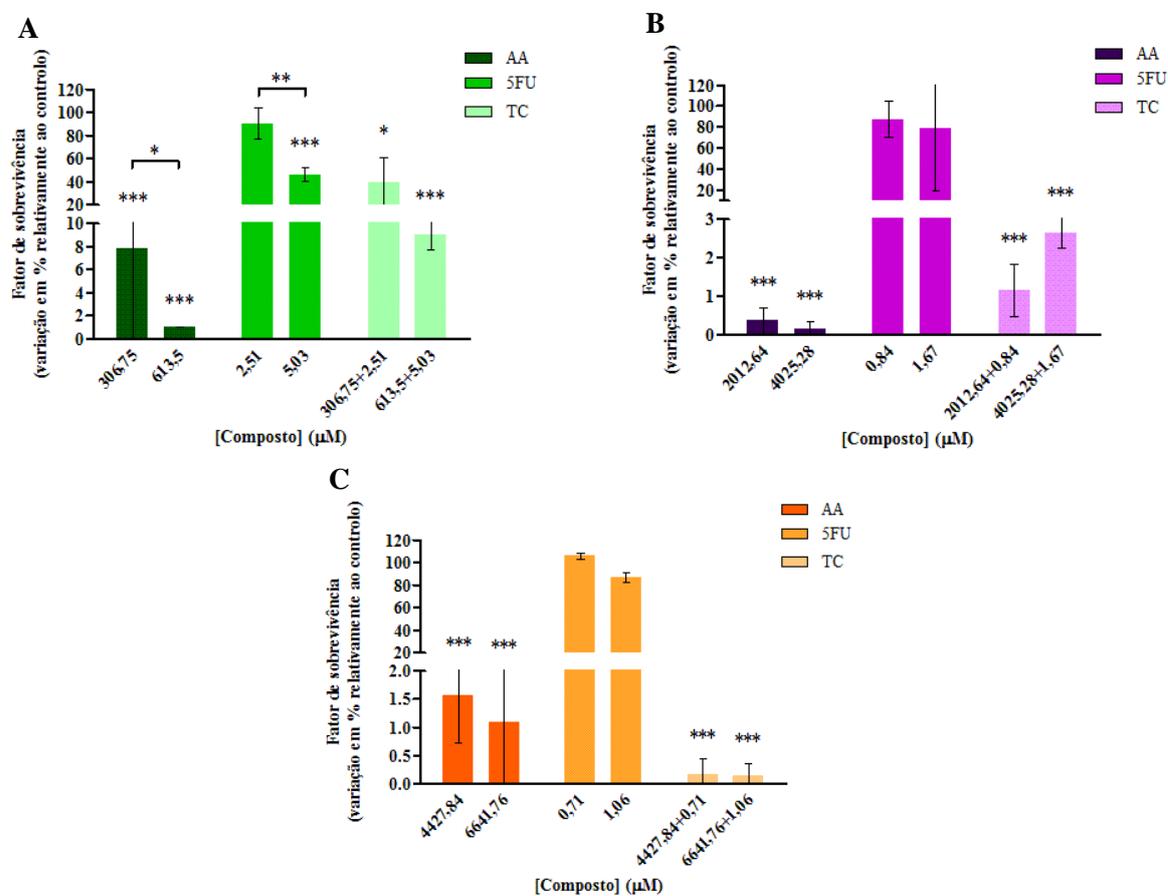


Figura 3.30. Análise da viabilidade celular das linhas C2BBE1 (A), LS1034 (B) e WiDr (C) por ensaio clonogênico. As linhas celulares foram expostas a diferentes concentrações de AA e 5FU isoladamente e em combinação, estando essas concentrações expressas nos gráficos e a formação de colônias foi quantificada ao 12.º dia após o tratamento. O gráfico expressa a média e o erro padrão e porcentagem de colônias formadas em relação ao controle de pelo menos 3 experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Foi considerado um nível de significância de 0,05.

Nas células C2BBE1 as concentrações mais altas de AA e 5FU originam sempre uma diminuição significativa na capacidade de formação de colônias relativamente ao controle ($p < 0,001$). Além disto, há uma diminuição significativa do fator de sobrevivência na concentração de AA ($p = 0,013$) e 5FU ($p = 0,003$) superiores,

relativamente à concentração inferior. Verificam-se valores inferiores de fator de sobrevivência no tratamento com AA no entanto, apenas é significativa a diferença entre estes valores e os valores de fator de sobrevivência obtidos para o tratamento com 5FU ($p=0,002$ para menor concentração de AA e 5FU e $p<0,001$ para as concentrações de AA e 5FU superiores).

Na linha celular LS1034 existe, tanto para o tratamento com AA como para o tratamento com a combinação dos dois compostos, uma diminuição do fator de sobrevivência relativamente ao controlo ($p<0,001$). Denota-se um aumento no fator de sobrevivência na terapia combinada da condição em que as concentrações de AA e 5FU são menores para a outra condição, embora sem qualquer significado estatístico. Verificam-se diferenças significativas entre o tratamento com 5FU de concentração mais baixa e de AA de concentração mais baixa concentração ($p=0,003$) e entre a mesma de 5FU e a terapia combinada ($p=0,031$).

Também na linha celular WiDr para os tratamentos com AA e terapia combinada, verifica-se uma diminuição significativa ($p<0,001$) da capacidade de formação de colónias relativamente ao controlo. Denota-se quando são utilizadas as concentrações mais baixas, uma diferença significativa entre o tratamento com 5FU e a terapia combinada ($p=0,001$). Já para as concentrações mais altas há diferença estatística entre o tratamento com 5FU e AA isoladamente ($p=0,042$) e entre 5FU e a terapia combinada ($p=0,002$).

3.1.2.3. Citometria de fluxo

3.1.2.3.1. Avaliação da viabilidade celular

Relativamente à aplicação deste ensaio na situação da terapia combinada, apresentam-se os gráficos da Figura 3.31-A, B e C, onde estão representadas as diferentes populações obtidas para 613,50 μM de AA e 5,03 μM de 5FU para a linha C2BBe1 (A), 4025,28 μM de AA e 1,67 μM de 5FU para LS1034 (B) e 6641,76 μM de AA e 1,06 μM de 5FU para a linha celular WiDr (C), sendo que ambos os compostos estão presentes isoladamente e em combinação (TC), com uma maior proporção de AA ($f=0,75$).

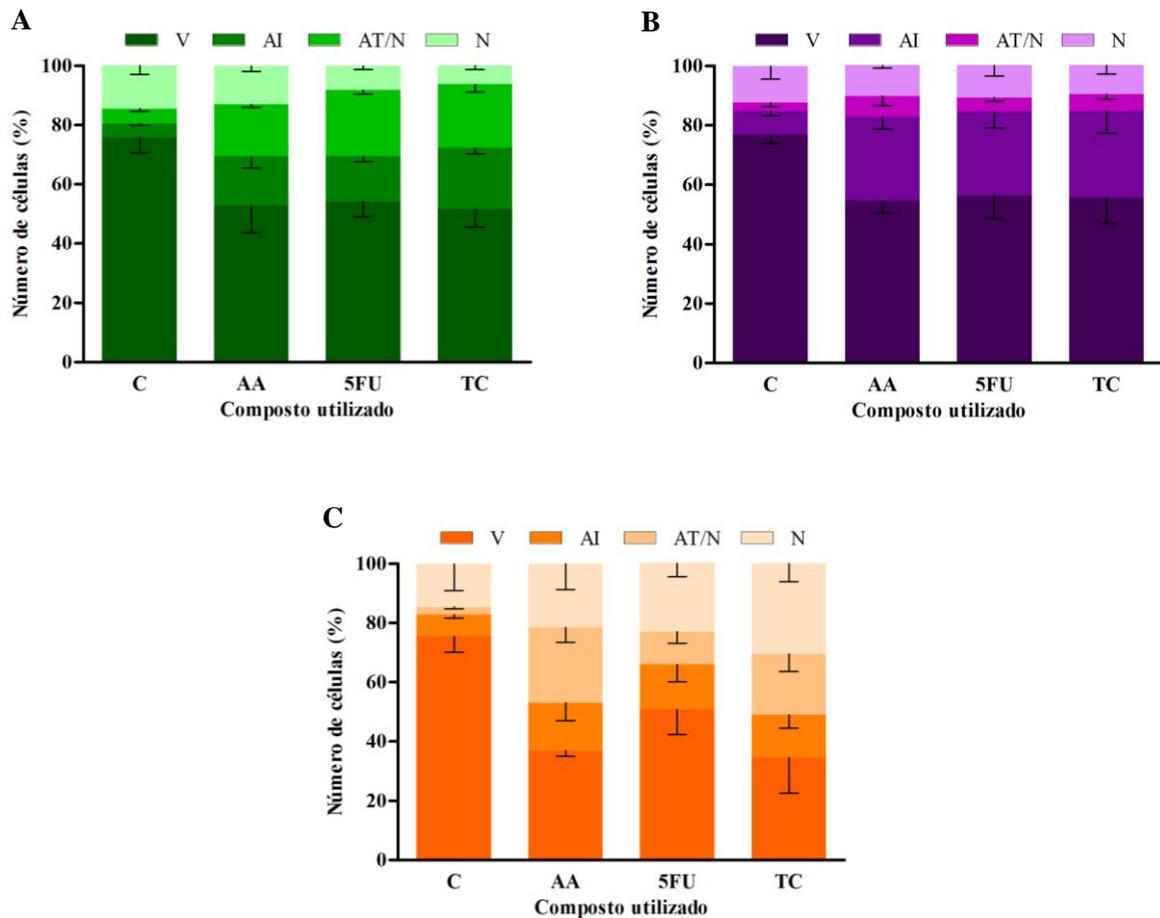


Figura 3.31. Avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação com AV e IP. Os resultados estão representados na forma de percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N), 96 horas após a incubação das linhas celulares C2BBel1 (A) com 613,50 μM de AA e 5,03 μM de 5FU, LS1034 (B) com 4025,28 μM de AA e 1,67 μM de 5FU e WiDr (C) com 6641,76 μM de AA e 1,06 μM de 5FU administrados isoladamente e em combinação (TC). Os resultados exprimem a média e o desvio padrão de três experiências independentes.

É possível verificar que na linha celular C2BBel1 a população de células viáveis diminui em relação ao controlo, permanecendo muito idêntica quando as células estão na presença de AA e 5FU isoladamente ou em combinação. Para a condição em que as células foram sujeitas a terapia combinada, a diminuição da população viável é significativa ($p=0,03$) em relação ao controlo, passando de 76% para 52%. Para além disso, estão muito presentes os tipos de morte celular por apoptose inicial e apoptose tardia/necrose. A população em apoptose inicial na terapia combinada é significativamente superior ($p=0,007$) à da condição controlo. O mesmo acontece na

população em apoptose tardia/necrose na monoterapia com 5FU em relação ao controlo ($p=0,006$). Pode verificar-se também que existe uma diminuição significativa da população celular em necrose na terapia combinada em relação ao controlo ($p=0,012$).

Relativamente às células LS1034, ao nível da população viável, acontece algo muito semelhante ao indicado para a linha C2BBE1, havendo uma diminuição da população viável em cerca de 22%, que é significativa para cada condição em relação ao controlo ($p=0,013$ na presença de AA e $p=0,024$ na presença de 5FU e terapia combinada). Verifica-se também pela análise do gráfico da Figura 3.31-B, um aumento significativo da população de células em apoptose inicial, relativamente ao controlo nos três tratamentos ($p=0,093$ para a presença de AA, $p=0,021$ para a presença de 5FU e $p=0,018$ quando os compostos estão combinados). A maior população de células em apoptose tardia/necrose surge na monoterapia com AA, sendo o aumento em relação ao controlo estatisticamente significativo ($p=0,035$). Relativamente à morte por necrose, podemos constatar que está mais presente no controlo, contrariamente ao que seria de esperar, no entanto, não existe qualquer alteração significativa.

Nas células WiDr, a viabilidade celular diminui 39% na condição em que há a presença de AA e 41% na terapia combinada, contudo apenas é significativa ($p=0,006$) a diminuição em relação ao controlo registada no tratamento com AA. A presença de células em apoptose inicial é mais evidente nos tratamentos com AA e 5FU isoladamente, no entanto não há qualquer significado estatístico. Há maior percentagem de células em apoptose tardia/necrose quando as células estão na presença de AA isoladamente ($p=0,022$) seguido da condição em que as células estão na presença da combinação dos dois compostos ($p=0,017$). Verifica-se também um aumento considerável ($p=0,009$) de células em necrose na combinação dos dois compostos.

Na terapia combinada, quando comparamos a percentagem de células viáveis obtida em cada linha celular, não se registam variações significativas. Relativamente à apoptose inicial, esta está significativamente ($p=0,018$) mais presente na linha celular LS1034 em relação às células WiDr. Já a apoptose tardia/necrose manifesta-se significativamente mais elevada ($p=0,009$) na linha celular WiDr do que nas células LS1034. Por último, podemos também constatar que a morte celular por necrose obtida nas células WiDr é apenas significativamente mais elevada ($p=0,004$) à que se obtém nas células C2BBE1.

3.1.2.3.2. Avaliação do ciclo celular

De modo a avaliar a fase do ciclo celular das células das linhas C2BBe1, LS1034 e WiDr procedeu-se à citometria de fluxo recorrendo à solução de IP/RNase. Através da intercalação da sonda IP no DNA, é possível quantificá-lo e verificar em que fase do ciclo celular a célula se encontra como foi referido anteriormente. Neste ensaio apenas se averiguaram os efeitos da terapia combinada pois pretendemos relacionar a fase do ciclo celular com os resultados de proliferação celular obtidos através do ensaio SRB.

Os resultados obtidos para este ensaio estão expressos nos gráficos da Figura 3.32- A, B e C, que representam a distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular depois do tratamento com 613,50 μM de AA e 5,03 μM de 5FU para a linha C2BBe1 (A), 4025,28 μM de AA e 1,67 μM de 5FU para LS1034 (B) e 6641,76 μM de AA e 1,06 μM de 5FU para a linha celular WiDr (C), sendo que ambos os compostos estão presentes isoladamente e em combinação (TC).

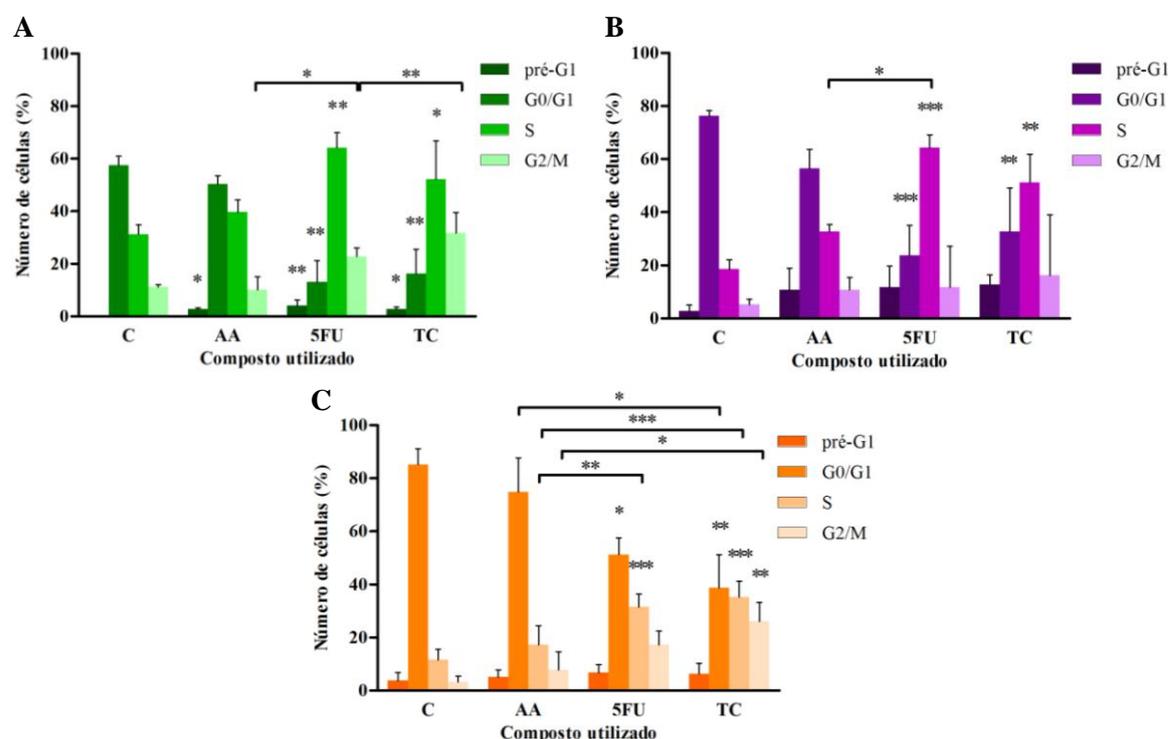


Figura 3.32. Avaliação das populações celulares em cada uma das fases do ciclo celular para as linhas celulares C2BBe1, LS1034 e WiDr. Na figura estão representadas as populações, nas fases pré-G1, G0/G1, S e G2/M após 96 horas de incubação das linhas celulares C2BBe1 com 613,50 μM de AA e 5,03 μM de 5FU (A), LS1034 com 4025,28 μM de AA e 1,67 μM de 5FU (B) e WiDr com 6641,76 μM de AA e 1,06 μM de 5FU (C) administrados isoladamente e em combinação (TC). Os resultados são expressos em percentagem e exprimem a média e o erro padrão de três experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Foi considerado um nível de significância de 0,05.

Pela análise do gráfico da Figura 3.32-A podemos verificar na linha celular C2BBe1 que há um aumento do pico pré-apoptótico (pré-G1) significativo relativamente ao controlo, no tratamento com AA ($p=0,041$), 5FU ($p=0,003$) e com a combinação de ambos ($p=0,021$). Quando as células são tratadas com 5FU e terapia combinada, há uma paragem significativa ($p=0,001$ e $p=0,004$ respetivamente) das células em fase G0/G1 em relação ao que se observa no controlo. Igualmente, nos mesmos tratamentos e em relação ao controlo, observa-se um aumento significativo ($p=0,001$ para o tratamento com 5FU e $p=0,015$ para o tratamento com a combinação) da paragem de células na fase S do ciclo celular. No que diz respeito à fase G2/M, o aumento de células nesta fase devido ao tratamento com 5FU e terapia combinada é significativo ($p=0,039$ e $p=0,001$ respetivamente) em relação ao que acontece no tratamento com AA.

No gráfico da Figura 3.32-B, relativo à linha celular LS1034, verificamos que, apesar de qualquer um dos tratamentos induzir um aumento na população celular em fase pré-G1, não há significado estatístico. Por outro lado, há diminuição no número de células em fase G0/G1, nos tratamentos com 5FU e terapia combinada em relação ao controlo ($p<0,001$ e $p=0,008$ respetivamente). Ao contrário do que acontece na população de células em fase G0/G1, a população celular em fase S é significativamente superior em relação ao controlo nos dois tratamentos ($p<0,001$ quando as células são tratadas com 5FU e $p=0,009$ quando estão na presença da combinação de 5FU e AA). O aumento de células na fase S no tratamento com 5FU é também significativamente superior ($p=0,04$) ao que se regista no tratamento com AA. O ligeiro aumento da percentagem de células em fase G2/M que se verifica em relação ao controlo nos três tratamentos não tem qualquer significado estatístico.

Por último, o gráfico da Figura 3.32-C fornece-nos a distribuição das células WiDr pelas diferentes fases do ciclo celular. No controlo e tratamento com AA as células estão maioritariamente em fase G0/G1, diminuindo de forma significativa esta população celular em relação ao controlo, na presença de 5FU ($p=0,025$) e da junção dos dois compostos ($p=0,001$). A diferença que se observa entre esta população no tratamento com AA e terapia combinada é também significativa ($p=0,022$). Podemos constatar que o tratamento com 5FU e terapia combinada induz um aumento significativo da percentagem de células em fase S, tanto em relação ao controlo ($p<0,001$) como em relação à terapia com AA isoladamente ($p=0,002$ para tratamento com 5FU e $p<0,001$ para tratamento com a combinação dos dois compostos). É também de realçar o aumento de células em fase G2/M quando estão expostas ao tratamento com a combinação dos dois compostos, em

relação ao controlo ($p=0,002$) e à monoterapia com AA ($p=0,025$). Nesta linha celular não se verificaram quaisquer alterações na percentagem de células em fase pré-G1.

Capítulo 4

DISCUSSÃO

O interesse científico na utilização de vitamina C em doses elevadas na terapêutica do cancro tem vindo a aumentar ao longo dos últimos anos. Este facto deve-se às vantagens inerentes à sua administração, por se tratar de uma terapia não invasiva e não induzir toxicidade sistémica. Adicionalmente, esta vitamina quando presente em concentrações elevadas, é capaz de produzir um efeito tóxico seletivo, afetando apenas células tumorais e tem a capacidade de melhorar o efeito inibitório conferido por fármacos quimioterapêuticos e radioterapia sendo, portanto, um grande aliado em terapia combinada [20, 24, 36–38].

A vitamina C funciona possivelmente como um pró-fármaco para a entrega de peróxido de hidrogénio aos tecidos. Quando presente em concentrações elevadas através da administração intravenosa ou peritoneal, exerce um efeito pró-oxidante pois para além dos efeitos provocados pelo H_2O_2 , este pode também originar ROS muito reativas como o radical hidroxilo, levando a maiores danos oxidativos nas células. Para além do dano oxidativo, a presença de H_2O_2 poderá também levar à depleção dos níveis de ATP [24, 29, 38, 39].

Apesar das vantagens relacionadas com a utilização de vitamina C, acima inumeradas, esta é apenas utilizada como terapia alternativa, sendo necessário reavaliar o potencial desta terapia, através do estudo do efeito de concentrações elevadas de vitamina C no crescimento e progressão do cancro e do conhecimento dos seus mecanismos de ação [29, 37]. Neste contexto, pretendeu-se com o presente trabalho estudar o efeito do AA ao nível do cancro do cólon em combinação com um fármaco quimioterapêutico, recorrendo para tal a técnicas de biologia celular e molecular, procurando obter resultados que contribuam para a avaliação da aplicabilidade da vitamina C no tratamento do cancro do cólon.

A avaliação da proliferação celular através do ensaio SRB permitiu a determinação de curvas de dose-resposta para os tratamentos com AA e 5FU, quer isoladamente, quer em combinação, de forma a avaliar as diferentes respostas produzidas nas três linhas de cancro do cólon nomeadamente, C2BBe1, LS1034 e WiDr. Os resultados obtidos demonstram claramente que o efeito citotóxico induzido pelo AA depende da linha celular, do tempo de incubação e da dose administrada.

Os valores de IC50 obtidos para a linha celular C2BBe1 indicam que esta linha celular é a mais sensível ao tratamento com AA, uma vez que o IC50 obtido em todos os tempos de incubação é sempre o mais baixo. Pelo contrário, a linha celular LS1034 demonstra ser a mais resistente ao tratamento com AA, pelo menos no que diz respeito a

tempos de exposição mais reduzidos, o que é apoiado pelos valores de IC50 significativamente superiores aos das C2BBe1 em todos os tempos de incubação ($p < 0,001$) e aos das WiDr às 24 ($p < 0,001$), 48 ($p = 0,001$) e 72 ($p < 0,001$) horas de incubação.

Na linha celular C2BBe1 a concentração de AA necessária para obter inibição da proliferação celular em 50% é de cerca de 0,95 mM para a avaliação às 24 e 48 horas. No entanto, verifica-se que a avaliação da proliferação às 72 e 96 horas se traduz numa diminuição do valor do IC50 obtido (0,6 mM e 0,8 mM respetivamente). Isto pode significar que, nesta linha celular, a toxicidade induzida pelo AA pode ser dependente do tempo após a sua exposição, sendo superior para tempos de incubação mais prolongados. Pelo contrário, nas linhas celulares LS1034 e WiDr não se verificou uma dependência temporal do efeito anti-proliferativo do AA. Através de uma análise estatística ao longo do tempo dos valores de IC50 obtidos para as LS1034 verifica-se um aumento significativo das 24 e 48 horas de incubação para as 72 horas ($p = 0,001$) e 96 horas ($p < 0,001$). Nas células WiDr obteve-se um comportamento muito semelhante com valores de IC50 estatisticamente inferiores para o tempo de incubação de 48 horas em comparação com 72 horas ($p = 0,001$) e 96 horas ($p < 0,001$). Esta diminuição do efeito anti-proliferativo pode dever-se a danos reversíveis induzidos nas células que possibilitaram a sua recuperação ou a uma possível resistência à vitamina C desenvolvida pelas células para períodos de incubação maiores. Esta última questão foi avaliada posteriormente através dos ensaios clonogénicos.

O tratamento com 5FU originou, ao nível das três linhas celulares, uma descida abrupta do valor de IC50 com o aumento do tempo de incubação. Nas células C2BBe1 não se regista nenhuma diminuição com significado estatístico no entanto, na linha celular LS1034, a diferença entre o valor de IC50 obtido para as 24 e 96 horas de incubação é significativa ($p < 0,001$), o mesmo acontece para as WiDr às 48 e 96 horas de incubação ($p < 0,001$). Mais uma vez, isto é indicativo de que o efeito do 5FU poderá ser dependente do tempo de incubação, aumentando com o tempo de exposição ao fármaco.

Atendendo aos valores de IC50 obtidos nas três linhas celulares para cada tempo de incubação (Tabela 3.5), nomeadamente aqueles obtidos às 72 e 96 horas, as células C2BBe1 parecem ser as mais resistentes ao tratamento com 5FU, o que é corroborado pelo facto de, nos dois períodos de incubação, o IC50 obtido nas células C2BBe1 ser significativamente superior ao obtido nas outras duas. Contrariamente, as células que

parecem ser mais sensíveis são as WiDr, sendo o valor de IC50 obtido às 96 horas significativamente inferior ($p=0,042$) ao registado nas células LS1034.

De facto, o 5FU é um agente quimioterapêutico já usado convencionalmente na prática clínica, contudo, este estudo de avaliação da proliferação celular era imprescindível para, posteriormente, se poder avaliar o efeito da sua combinação com o AA.

Quanto ao AA, é importante comprovar os resultados anti-proliferativos obtidos através do SRB com outras técnicas. Os ensaios clonogénicos permitiram avaliar, a longo prazo, a eficácia do tratamento com AA nas linhas de cancro do cólon. Denota-se pela observação do gráfico da Figura 3.17 que este composto interfere com a capacidade de proliferar e formar colónias das três linhas celulares pois, à medida que a sua concentração aumenta, o fator de sobrevivência diminui, corroborando os resultados obtidos através do ensaio SRB e evidenciando possíveis danos irreversíveis. Apesar de ser na linha C2BBel que se verifica um maior efeito anti-proliferativo na presença de AA, é possível verificar que, nos ensaios clonogénicos, esta não é a linha celular mais afetada pela presença de AA para períodos de tempo mais prolongados, em comparação com as outras duas linhas celulares. No entanto, atendendo a que as concentrações de AA usadas não são exatamente iguais entre as três linhas celulares, não foi possível determinar se existe diferenças significativamente estatísticas entre os valores de fator de sobrevivência obtidos

Como referido anteriormente, os resultados obtidos pelo ensaio SRB evidenciaram que nas células LS1034 e WiDr há um aumento da concentração de AA que inibe a proliferação celular em 50%, para tempos de incubação superiores, pelo que uma das hipóteses colocadas foi o facto do aumento do tempo de incubação permitir às células adquirir resistência ao AA. No entanto, segundo os resultados obtidos pelos ensaios clonogénicos, esta hipótese é colocada de parte. Conclui-se desta forma que o que poderá acontecer é que, numa fase inicial, as células conseguem reverter os danos induzidos mas, com a continuação da exposição ao composto e o sucessivo aumento do stresse oxidativo, haverá enfraquecimento desses mecanismos de defesa.

Os estudos de citotoxicidade efetuados com recurso ao ensaio SRB apenas permitem aferir acerca da capacidade proliferativa das células, não fornecendo qualquer tipo de informação relativamente à morte celular e à participação de ROS, entre outros. Para tal foi necessário recorrer à citometria de fluxo. Esta técnica, além de permitir analisar a viabilidade e o tipo de morte celular induzida através da dupla marcação com

AV e IP, permite avaliar a presença intracelular de ROS, nomeadamente radical superóxido e peróxidos, através da marcação com as sondas DHE e DCFH₂-DA, respetivamente. Também é possível analisar se existem alterações ao nível do ciclo celular, através da marcação com a solução de IP/RNase.

De referir que a avaliação da viabilidade celular/morte celular foi executada tanto para a monoterapia com AA como para a terapia combinada. No entanto, a avaliação do envolvimento de radical superóxido e peróxidos na morte celular, bem como a presença de glutatona foi efetuada apenas para a monoterapia com AA, porque interessava-nos perceber os mecanismos envolvidos na morte celular, no que diz respeito à produção de ROS, provocada apenas pelo AA.

Para realizar a citometria de fluxo, na monoterapia com AA, escolheram-se as concentrações de AA com base nos resultados previamente obtidos pelos ensaios de SRB.

Como referido, avaliar o tipo de morte celular por citometria de fluxo é possível devido à utilização de sondas específicas como AV-FITC e o IP. A AV associada ao fluorocromo FITC constitui um corante utilizado para a deteção de apoptose uma vez que se liga à fosfatidilserina indicando a translocação deste fosfolípido do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. Por outro lado o IP possui a capacidade de se intercalar no DNA quando existe perda de integridade membranar, situação que ocorre em morte celular por necrose ou apoptose tardia [58].

O tratamento com AA induz a diminuição da viabilidade nas três linhas celulares à medida que a concentração de AA aumenta.

Verifica-se para a linha celular LS1034 que à medida que a concentração de AA aumenta, aumenta também a morte por apoptose inicial, sendo significativo o aumento que se regista na presença de 20 mM de AA, em relação ao controlo ($p=0,005$). Este é o tipo de morte que mais se manifesta nesta linha celular. A morte por apoptose tardia/necrose aumenta consideravelmente na presença de 20 mM de AA face ao controlo ($p=0,002$).

Denota-se a existência de uma percentagem considerável de células em necrose no controlo das linhas celulares C2BBel e LS1034. Este facto deve-se provavelmente a questões experimentais e às características destas células. Devido à forma como estão dispostas, torna-se mais demorada a sua desagregação da superfície do frasco de cultura. Assim, estas células necessitam de mais tempo de exposição ao tryple, para haver desagregação da superfície dos frascos de cultura. Apesar de o tryple não ser tóxico para as células, o tempo que elas permanecem nesta solução que não é detentora de qualquer

composto essencial às células, juntamente com todo o manuseamento necessário para auxiliar a sua desagregação, pode justificar a existência de morte celular nas células controlo. Como se pode ver na Figura 3.18-B, a necrose verificada no controlo está presente em todas as outras condições, o que valida o que foi sugerido.

Nas linhas celulares de cancro do cólon esquerdo (C2BBe1 e WiDr) houve o aumento da morte celular por necrose e apoptose tardia/necrose à medida que a concentração de AA aumentou. Na linha celular C2BBe1 o tipo de morte que mais se manifesta é necrose e apoptose tardia/necrose, principalmente na presença de 10 mM de AA e na linha celular WiDr verifica-se que há mais morte por necrose. Há autores que referem que a vitamina C pode levar à apoptose celular mas também pode levar à necrose, dependendo da sua concentração, da duração da exposição e, conseqüentemente, do stress oxidativo que se origina [21, 39, 69, 70]. A apoptose poderá ser induzida por um estímulo oxidativo moderado enquanto que, para a indução da necrose, é necessário um efeito oxidativo mais intenso [3]. Estas ilações corroboram o facto de, na presença de 10 mM de AA, diminuir significativamente a viabilidade celular em comparação com o controlo em ambas as linhas celulares ($p < 0,001$ para C2BBe1 e $p = 0,005$ para WiDr) e aumentar consideravelmente a morte por apoptose tardia/necrose nas células C2BBe1 ($p = 0,002$) e a morte por necrose e apoptose tardia/necrose nas células WiDr ($p = 0,002$ e $p = 0,038$ respetivamente).

A linha celular C2BBe1 é aquela que apresenta maior diminuição da viabilidade celular, contrariamente à linha celular LS1034 que apresenta maior população de células viáveis. Estes resultados estão de acordo com os obtidos na avaliação da proliferação celular pelo ensaio SRB, segundo os quais, a linha celular C2BBe1 parece ser a mais sensível e as células LS1034 as mais resistentes ao tratamento. Um estudo realizado por Maulén *et al.* (2003) levou à conclusão de que nas células CaCo-2, há expressão de SVCT2 e sobre-expressão de SVCT1, o que incrementa a concentração de AA no meio intracelular [71]. As células C2BBe1 são um clone das células CaCo-2 [47]. Por outro lado, segundo o estudo de Chen *et al.* (2005), o AA funciona como um pró-fármaco para a entrega de H_2O_2 aos tecidos, pelo que a morte celular é mediada pelo H_2O_2 proveniente do meio extracelular embora os alvos do H_2O_2 possam estar localizados tanto no exterior da célula (lípidos membranares), como no interior (DNA, proteínas reparadoras de erros no DNA e mitocôndria), uma vez que a membrana é permeável ao H_2O_2 [39]. Assim, os danos provocados pela presença de AA presente no meio extracelular, aliados à presença crescente de AA no meio intracelular devido à sobre-expressão de SVCT1, permitem um

aumento considerável do stresse oxidativo no interior da célula, tornando-a mais sensível a esta terapia.

Atendendo a que as ROS possuem um papel essencial na citotoxicidade mediada pela vitamina C, recorreu-se a diferentes ensaios para analisar a produção de diferentes espécies e a influência das defesas antioxidantes responsáveis pela sua inativação.

A análise da fluorescência da sonda DHE mostrou que existe uma tendência para o aumento da produção intracelular de $O_2^{\cdot-}$, de forma dependente da concentração de AA utilizado, nas linhas C2BBe1 e WiDr, com significado estatístico. Estes resultados são corroborados pelo mecanismo proposto pelos autores Chen *et al.* (2007) para a atuação do AA, segundo o qual o AA é oxidado formando-se $Asc^{\cdot-}$ com libertação de um eletrão disponibilizado para a redução do ião metálico presente numa metaloproteína. A doação desse eletrão ao oxigénio por parte do ião metálico reduzido leva à formação de radical superóxido. Portanto, quanto maior a concentração de AA, maior a produção de superóxido. Adicionalmente, o aumento de $O_2^{\cdot-}$ nas células C2BBe1, está relacionado com a presença de maiores concentrações de AA no seu interior, como resultado da sobre-expressão de SVCT1, tal como referido anteriormente [71].

Pela ação da SOD, o $O_2^{\cdot-}$ é por sua vez convertido a H_2O_2 [38]. No entanto, segundo os resultados obtidos pelos mesmos autores, a morte celular é mediada pelo H_2O_2 formado a partir do AA presente no meio extracelular embora os alvos do H_2O_2 possam estar localizados tanto no interior da célula (DNA, proteínas reparadoras de erros no DNA e mitocôndria) como no exterior (lípidos membranares), uma vez que a membrana é permeável ao H_2O_2 [39]. Outro facto importante que foi referido anteriormente é que, nas células tumorais, a presença de determinadas enzimas como a SOD e a CAT está diminuída pelo que, o radical superóxido presente no meio intracelular não é totalmente convertido a H_2O_2 [36, 38]. Assim sendo, será de esperar que a elevada produção intracelular de radical superóxido que de facto se observa nestas duas linhas celulares devido à administração de AA, não esteja relacionada com os efeitos citotóxicos deste composto, mas sim a presença deste radical no meio extracelular. Desta forma, teria sido relevante para este trabalho, medir também a produção extracelular de radical superóxido, para a poder relacionar com a variação na produção intracelular de peróxidos. A metodologia que utilizámos neste ensaio permite apenas a medição da produção intracelular de $O_2^{\cdot-}$, pelo que seria necessário o envolvimento de outra metodologia para avaliar a produção extracelular do mesmo radical.

Nas células LS1034 não se observam variações significativas na produção de radical superóxido. Esta linha é resistente a vários fármacos e, segundo os resultados de proliferação obtidos pelo ensaio SRB para o tratamento com AA, as células LS1034 revelam resistência a este composto. No entanto, há alguma ação por parte do AA, já que este é capaz de reduzir a proliferação celular em 50%, não estando esta ação relacionada com a produção intracelular de radical superóxido e peróxidos. Segundo o que foi referido anteriormente e que vai de acordo com os estudos de Chen *et al.* (2005), o $O_2^{\bullet-}$ formado no interior da célula não deverá estar relacionado com os danos devido à presença de AA, mas sim o $O_2^{\bullet-}$ presente no meio extracelular que origina por sua vez H_2O_2 [39]. O facto de não haver uma produção intracelular significativa de radical superóxido, poderá ser indicativo de que existe um baixo influxo de AA nesta linha celular. Assim, seria de todo o interesse realizar a análise da expressão dos transportadores SVCT1 e 2 através de *Western Blot*.

Por seu lado, como é possível verificar através dos resultados da marcação com a sonda DCF nestas células, não há qualquer produção significativa de peróxidos no meio intracelular. Assim o H_2O_2 que se forma no meio extracelular poderá estar a exercer a sua função no exterior da célula, por exemplo, ao nível da membrana celular ou, o H_2O_2 que atravessa a membrana celular é convertido a espécies mais reativas, tais como o radical hidroxilo, através da reação de Fenton. De referir que, para além do radical hidroxilo, outras espécies radicalares também poderão ser formadas, nomeadamente as RNS. Ora, se ocorre um aumento na quantidade de ROS mais lesivas para as células, é de esperar uma maior vulnerabilidade à terapia, que não é o que se verifica nas células LS1034. Segundo os autores Barrera (2012) e Landriscina *et al.* (2009), o facto do aumento de ROS mais lesivas e, conseqüentemente, o aumento do stresse oxidativo não afetar diretamente alguns tipos de células tumorais, deve-se à adaptação que estas conseguem desenvolver ao stresse oxidativo. Esta adaptação permite, por um lado, que as células consigam sobreviver em condições de elevado stresse oxidativo como consequência do aumento de ROS como, por outro lado, fornece-lhes uma forma de resistência à quimioterapia e radioterapia [72, 73]. Como forma de validar esta suposição, poderia ser avaliada a presença intracelular de radical hidroxilo ou de outras espécies radicalares, através da utilização de sondas específicas para o efeito.

A marcação com a sonda DCF revelou um decréscimo acentuado e significativo ($p < 0,001$) da concentração de H_2O_2 com o uso da concentração mais elevada de AA na linha C2BBe1. Na linha celular WiDr há um aumento da concentração de H_2O_2 na

concentração de AA correspondente ao IC50, diminuindo na concentração mais elevada de AA, contudo não é uma alteração com significado estatístico. De modo a obter mais informação acerca dos mecanismos envolvidos nas alterações de peróxidos, mediu-se a quantidade da enzima GSH livre por citometria de fluxo. A enzima GSH protege as células de danos ao nível do DNA provocados por ROS e outras espécies oxidativas, pois tem a capacidade de reagir com radicais livres e reduzir peróxidos, tal como o peróxido de hidrogénio. Em conjunto com a glutathione peroxidase atua na decomposição do substrato desta enzima, o H_2O_2 ou outro peróxido, a água (ou a um álcool) havendo oxidação da GSH a GSSH [62]. Neste ensaio verifica-se que, a concentração crescente de AA influencia a diminuição da presença de GSH livre nas três linhas celulares, sendo esta diminuição significativa, relativamente ao controlo, na linha celular C2BBel na presença de 10 mM de AA ($p < 0,001$) e na linha celular WiDr quando o AA está presente nas concentrações de 2 mM e 10 mM ($p = 0,006$ e $p = 0,012$ respetivamente).

Anteriormente verificámos que a concentração de peróxidos nas células C2BBel diminui com concentrações crescentes de AA, resultados que são corroborados pela diminuição da glutathione livre nestas células. Para a redução de cada molécula de H_2O_2 são necessárias duas moléculas de GSH e verifica-se que a diminuição de peróxidos é mais acentuada do que a diminuição de GSH livre, quando deveria verificar-se a situação contrária. Isto é possível devido à entrada do H_2O_2 na reação de Fenton, dando origem a espécies de oxigénio muito mais reativas, tais como o radical hidroxilo. De facto, o pico de produção de radical superóxido obtido na presença de 10 mM de AA é indicativo de que está a haver muita produção de superóxido na presença de concentrações mais elevadas de AA (devido à grande entrada de AA nestas células), e este radical estimula a libertação de Fe^{2+} , que reage com H_2O_2 favorecendo a reação de Fenton [3]. Assim, também para as células C2BBel, teria sido de grande relevância a medição da produção intracelular de radical hidroxilo.

Nas linhas LS1034 e WiDr há um aumento da concentração de peróxidos nas concentrações 5 mM e 2 mM de AA, respetivamente, apesar da concentração de GSH ser decrescente. Esta situação não vai de encontro ao que acontece nas células C2BBel. No entanto, há que ter em consideração que esse aumento na concentração de peróxidos não é significativo nem para as células LS1034 nem para as WiDr e que na concentração máxima de AA a presença de peróxidos diminui e passa a ser inferior à que se regista nas duas concentrações de AA mais baixas, ou seja, parece haver uma tendência para a diminuição da concentração de peróxidos.

Após a comprovação do efeito citotóxico do AA na linha celular WiDr com envolvimento das ROS, procurou-se determinar se o AA tem a capacidade de provocar danos ao nível do DNA nestas células, efetuando o ensaio cometa. Neste ensaio, as células saudáveis e sem danos no seu DNA formam uma esfera densa e compacta sem arrastamento de fragmentos, enquanto que células cujo DNA esteja danificado com quebras ao longo das cadeias formam uma cauda menos intensa que o núcleo. Os três parâmetros analisados através do *software* utilizado, nomeadamente a percentagem de DNA na cauda, o tamanho da cauda e o momento da cauda, refletem a extensão dos danos causados, constituindo uma forma de avaliação quantitativa. Ao longo do ensaio, pode haver a formação de cometas com uma cauda de determinado comprimento e determinada percentagem de DNA, que possuem um momento de cauda superior ao de cometas com o mesmo tamanho de cauda mas com uma percentagem de DNA mais baixa. O momento de cauda é, portanto, um parâmetro muito importante neste tipo de análise. Os resultados, apesar de preliminares, demonstram que o AA é capaz de provocar quebras no DNA destas células e que parece haver um aumento do dano provocado pelo aumento da concentração de AA. Esta constatação denota-se claramente pelo gráfico da Figura 3.23, que representa o momento da cauda dos cometas em cada condição. Os resultados obtidos vão de encontro a um estudo realizado por Herst *et al.* (2012), em que o AA presente numa concentração de 5 mM, foi capaz de provocar quebras nas duas cadeias de DNA em células primárias de glioblastoma multiforme [74]. Embora o estudo referido tenha sido efetuado numa linha celular diferente das linhas utilizadas no presente trabalho, não deixa de destacar a capacidade que este composto tem em infligir danos no DNA. Como foi referido, estes resultados são preliminares sendo necessário aumentar o número de experiências e realizar uma análise estatística adequada. Também seria interessante efetuar este ensaio nas outras duas linhas celulares utilizadas neste trabalho.

Nos estudos de terapia combinada, consideraram-se os valores de IC50 obtidos para ambos os compostos às 96 horas de incubação para o cálculo das concentrações de AA e 5FU a utilizar em cada condição e verificou-se que com a junção dos compostos, é possível diminuir o IC50 do 5FU em todos os períodos de incubação (48, 72 e 96 horas) relativamente ao obtido para os mesmos períodos de incubação na monoterapia com este fármaco. Também foi possível baixar o IC50 do AA para todas as condições na linha C2BBel, às 72 e 96 horas ($f=0,5$ e $0,75$) na linha LS1034 e às 96 horas ($f=0,5$ e $0,75$) nas células WiDr. Para além deste facto, também se verificou que, ao contrário do que

acontecia na terapia com AA nas linhas celulares LS1034 e WiDr, o IC50 diminui com o aumento do tempo de incubação ou seja, de alguma forma na terapia combinada, as células já não são capazes de reverter os danos induzidos pelo AA do mesmo modo que acontecia na monoterapia.

O grande objetivo por detrás da utilização da combinação destes dois compostos é a redução das concentrações de 5FU, relativamente às concentrações que se tem de usar em monoterapia, para o mesmo período de exposição ao fármaco. Assim, atendendo a que este composto é tóxico, tal como outros fármacos quimioterapêuticos, ao reduzir as concentrações administradas, minimizam-se os efeitos secundários envolvidos. Com a combinação do 5FU com o AA, foi possível baixar significativamente, em algumas condições, a concentração de 5FU necessária para diminuir a proliferação celular em 50% em relação à concentração necessária em monoterapia, para o mesmo período de incubação. Tal acontece na linha celular C2BBe1 para um tempo de incubação de 24 horas com os compostos na mesma proporção ($f=0,5$) ($p=0,029$), na linha celular LS1034 às 48 horas de incubação quando os compostos estão na mesma proporção ($p<0,001$) e quando o AA está em maior proporção ($f=0,75$) ($p=0,006$) e, por último, nas células WiDr às 48 horas de incubação quando $f=0,5$ ($p<0,001$) e $f=0,75$ ($p=0,014$).

À partida, a junção dos fármacos não iria resultar num efeito antagónico. De facto o AA é um antioxidante mas quando administrado em concentrações farmacológicas (3 mM a 20 mM) possui um efeito pró-oxidante [24, 29]. Por seu lado, o 5FU tem um mecanismo de ação que afeta diretamente a síntese de DNA e de RNA bem como a sua estabilidade, alongação entre outros, não estando envolvidas diretamente espécies reativas de oxigénio, tal como foi corroborado pelo estudo de Kim *et al.* (2012), segundo o qual, os efeitos provocados pelo 5FU quando presente isoladamente foram independentes da formação de ROS [15, 17, 44]. Deste modo, para além de não haver conflitos entre as terapias, poderá até haver uma certa complementação de efeitos. No entanto, verificou-se através do cálculo do índice de combinação (I) que, em certas condições, existe efeito antagónico. Contudo, a combinação também originou um efeito sinérgico em determinadas condições. Verificou-se a existência de efeito sinérgico, às 96 horas para $f=0,5$ e $f=0,75$ na linha celular C2BBe1 e houve também efeito sinérgico na condição em que houve redução significativa do IC50 do 5FU em relação à monoterapia. Esta ilação, relativa aos efeitos sinérgicos obtidos nestas células que advêm da combinação dos dois compostos, é muito importante e reveladora pois, não só houve diminuição da concentração de 5FU necessária para a obtenção do mesmo efeito relativamente à

monoterapia como também, adicionalmente, houve sinergia nessas condições. O mesmo acontece nas células LS1034, ou seja, houve efeito sinérgico às 96 horas de incubação com os compostos (para $f=0,5$ e $f=0,75$), assim como, nas células WiDr (apenas para $f=0,5$) Curiosamente, estas são as condições em que são administradas concentrações de AA e 5FU mais baixas. Aliás, para $f=0,75$ o 5FU está presente em menor proporção do que o AA. Estes resultados parecem indicar que a presença de maior proporção de um dos compostos pode levar a que o efeito de um deles, seja anulado pelo outro, resultando num efeito antagonista. De facto, um estudo realizado por Frömberg *et al.* (2011) levou à conclusão de que aparentemente, as concentrações de AA são muito importantes para o estabelecimento de efeitos sinérgicos ou antagónicos de uma combinação de AA com um fármaco citostático [75].

Todo o conjunto dos resultados obtidos neste ensaio para a combinação do AA com o 5FU apontam para que esta terapia consiga atingir maior eficácia na linha celular C2BBel e, pelo contrário, tenha menor eficácia na linha WiDr. Como referido anteriormente, os resultados do mesmo ensaio em relação à monoterapia com AA indicaram que a linha celular LS1034 é a mais resistente a essa terapia. Isto é concordante com o facto de estas células serem quimiorresistentes, tal como foi confirmado num estudo realizado por Casalta *et al.* (2011) [48]. Assim sendo, é plausível considerar a hipótese de que a combinação do 5FU com o AA permitiu diminuir a resistência desta linha celular a ambos os fármacos.

De forma a avaliar a eficácia do tratamento, a longo prazo, das três linhas celulares de cancro do cólon com a combinação de AA e 5FU, efetuaram-se ensaios clonogénicos. Como se pode verificar pelos gráficos da Figura 3.30, o tratamento das três linhas celulares com AA e com AA em combinação com 5FU origina a diminuição significativa da capacidade de crescimento e formação de colónias em relação ao controlo. Contudo, apenas na linha celular WiDr a diminuição do fator de sobrevivência que se regista na terapia combinada é inferior ao fator de sobrevivência observado na monoterapia com AA. Pelo contrário, quando as células são tratadas com 5FU, nas linhas celulares LS1034 e WiDr não há qualquer alteração significativa em relação ao controlo e nas células C2BBel há apenas uma diminuição com significado estatístico na presença da concentração mais alta de 5FU. Estes resultados sugerem que a diminuição do fator de sobrevivência que se observa para todas as linhas celulares na terapia combinada, parece advir dos efeitos do AA. Apenas nas células WiDr é que poderá haver uma maior contribuição por parte do 5FU para a redução do fator de sobrevivência.

Os resultados obtidos neste ensaio contrastam com os obtidos no ensaio SRB, pois no ensaio clonogénico, a linha celular em que a terapia combinada exerce mais eficazmente o seu efeito é a WiDr e as células que demonstraram possuir maior capacidade de formação de colónias na presença da combinação de AA e 5FU foram as C2BBe1. No ensaio SRB, como referido anteriormente, acontece a situação oposta. Há então que ter em consideração que os ensaios clonogénicos permitem avaliar a resposta à presença de fármacos, para um período de tempo muito superior ao que se avalia no ensaio SRB. Assim, é possível concluir que os danos provocados nas células C2BBe1 pela combinação do AA com o 5FU poderão ser reversíveis, o que permite à célula recuperar mais tarde. Em relação às células WiDr, é possível que os danos provocados nestas células pela terapia combinada sejam dependentes do tempo de exposição aos dois compostos, sendo mais complexos e menos suscetíveis a reparação, com o aumento do tempo de exposição.

Para a escolha das concentrações de AA e 5FU a testar em combinação para a realização da citometria de fluxo, foi selecionada a combinação que, sendo composta por concentrações de AA ou 5FU inferiores ao valor de IC50 obtido na monoterapia às 96 horas, originou valores de proliferação celular inferiores às demais. De modo a termos um meio de comparação, essas mesmas concentrações foram administradas isoladamente e em combinação. Assim, na linha celular C2BBe1 testámos as concentrações 613,5 µM e 5,03 µM de AA e 5FU respetivamente, 4025,28 µM de AA e 1,67 µM de 5FU nas células LS1034 e para a linha celular WiDr as concentrações testadas foram 6641,76 µM de AA e 1,06 µM de 5FU.

No estudo da viabilidade/morte celular, relativamente à linha C2BBe1 não se verificam diferenças ao nível da viabilidade celular entre a monoterapia com ambos os compostos e, a terapia combinada, não havendo também um tipo de morte predominante. Os três tipos de morte estão presentes de forma muito semelhante nos três tratamentos, sendo que qualquer tipo de alteração entre cada tratamento que se possa observar no gráfico da Figura 3.31-A não tem significado estatístico.

Os níveis de viabilidade celular e diferentes tipos de morte na linha celular LS1034 também não variam muito nos três tipos de tratamento. A diminuição da viabilidade celular em relação ao controlo é significativa para qualquer tratamento ($p=0,013$ para o tratamento com AA e $p=0,024$ para os tratamentos com 5FU e terapia combinada) e a morte celular por apoptose inicial é o tipo de morte mais presente nestas células em todos os tratamentos, aumentando significativamente em relação ao controlo

($p=0,019$ para tratamento com AA, $p=0,021$ para tratamento com 5FU e $p=0,018$ para tratamento com terapia combinada).

Nas células WiDr o nível de viabilidade celular é muito semelhante quando as células são tratadas com AA ou com a terapia combinada, sendo inferior à viabilidade no tratamento com 5FU, embora não exista significado estatístico. Para além da viabilidade celular, também os níveis de apoptose inicial, apoptose tardia/necrose e necrose são muito semelhantes entre os dois tratamentos. A grande diferença entre o tratamento com AA e terapia combinada é que a terapia combinada leva a que maior percentagem de células sofra morte por necrose e que diminua a percentagem de células que sofre morte por apoptose tardia/necrose. Apesar dos valores que se registam nesta terapia, nos dois tipos de morte referidos, serem significativos em relação ao controlo, não há qualquer significado quando os comparamos com a monoterapia com AA e 5FU.

Como foi referido anteriormente, o AA tem a capacidade de provocar morte celular por apoptose ou necrose, dependendo de vários fatores, entre os quais, as características individuais de cada célula e a concentração de AA, bem como o tempo de exposição das células a este composto [21]. De facto, em todas as linhas celulares há um aumento na apoptose inicial e apoptose tardia/necrose provocada pela terapia combinada em comparação com os valores obtidos relativos à monoterapia com AA (com concentrações de AA próximas), em que o tempo de incubação das células com AA era de 24 horas. No entanto, há-que ter em atenção o facto de esta análise ser meramente qualitativa, pois como as concentrações não são exatamente iguais, não foi possível efetuar uma comparação estatística.

O 5FU leva à diminuição de dTTP, o que origina quebras das cadeias de DNA e poderá induzir apoptose celular. Por outro lado, danos no DNA de células com a p53 mutada, como é o caso das LS1034 e WiDr, poderão não resultar em morte celular por apoptose que é normalmente induzida por p53 *wild-type*. Assim, neste tipo de células a morte celular pode ser provocada pela existência de danos ao nível do DNA, resultando em necrose [76]. Estas ilações justificam a existência de qualquer um dos tipos de morte celular quando as células são tratadas com 5FU e também o facto de existir maior morte por necrose nas células WiDr.

No tratamento com a combinação dos dois compostos, ao comparar as três linhas celulares, verifica-se que não existe nenhuma diferença significativa em relação à viabilidade celular obtida entre elas. Apenas entre as linhas celulares LS1034 e WiDr registam-se diferenças significativas na percentagem de células em apoptose inicial e

apoptose tardia/necrose. A apoptose inicial está mais presente na linha LS1034 ($p=0,018$) e a apoptose tardia/necrose manifesta-se mais nas células WiDr ($p=0,009$). As células WiDr apresentam uma maior percentagem de células por necrose, que é significativa ($p=0,004$) em relação apenas às células C2BBel.

Apesar dos resultados promissores obtidos ao nível da proliferação celular com a combinação do AA e 5FU, estes não se refletiram em termos de diminuição da viabilidade celular. Quando uma célula sofre danos, pode responder a essa alteração entrando em senescência ou em morte, neste último caso, como a apoptose ou autofagia. A senescência está muitas vezes envolvida na carcinogénese, mas pode também ser o resultado de terapia com fármacos. Há, portanto, vários estímulos que conduzem a senescência, tais como danos ao nível do DNA ou stresse oxidativo, entre outros. Existe alguma confusão no que diz respeito à definição de senescência, havendo autores que igualam o atraso no ciclo celular a senescência. No entanto, são acontecimentos diferentes, sendo o atraso em qualquer fase do ciclo celular suficiente para causar senescência em células tumorais. Face ao que foi exposto, é possível que a terapia combinada com as doses utilizadas na citometria em que houve maior proporção de AA do que 5FU, seja suficiente para diminuir drasticamente a proliferação celular mas não induzir morte celular, ficando as células num estado de senescência. Desta forma, num próximo estudo deverá ser testada outra combinação de concentrações, tendo sempre em atenção o facto de não se poder diminuir em demasia a concentração de AA, para que não passe a atuar como antioxidante.

A citometria de fluxo permite avaliar a influência de um tratamento na progressão do ciclo celular. Assim, para a avaliação da fase do ciclo celular em que as células se encontram, procedeu-se a esta análise apenas para a terapia combinada, uma vez que nesta fase é de todo o interesse relacionar os resultados de proliferação celular com a fase do ciclo celular.

As fases G1, S, G2 e M constituem as fases do ciclo celular. As células na fase G1 podem seguir dois destinos, ou seguem para a fase S onde irá haver replicação do seu DNA ou ficam na fase G0 indefinidamente, interrompendo a divisão. Após a fase S, as células entram na fase G2 onde poderá existir algum tipo de reparação do DNA de modo à preparação da célula para entrar na mitose (fase M). A passagem de uma fase do ciclo celular à outra é regulada por cinases. Os dois pontos de controlo do ciclo celular situam-se então na fase G1 e G2, prevenindo a progressão do ciclo celular para a fase S e M respetivamente, em caso de deteção de erros ao nível do DNA [77, 78].

Pela análise dos gráficos da Figura 3.32-A, B e C é possível constatar que, de uma forma geral, as três terapias vão produzir um efeito semelhante ao nível do ciclo celular nas três linhas celulares.

Verifica-se que em todas as linhas celulares, principalmente nas células WiDr, existe um elevado número de células em fase G0/G1 no controlo que diminui significativamente quando as células são tratadas com 5FU ($p=0,001$ para C2BBe1, $p<0,001$ para LS1034 e $p=0,025$ para WiDr), ao mesmo tempo que aumenta também significativamente o número de células em fase S ($p=0,001$ para C2BBe1, $p<0,001$ para LS1034 e para WiDr).

A proteína p53 é uma importante proteína reguladora do ciclo celular e apoptose pelo que, a presença de p53 *wild-type* leva, quando necessário, à paragem do ciclo celular em fase G0/G1. Os danos podem posteriormente ser reparados, o que possibilita a progressão do ciclo celular ou, dependendo do tipo de danos, as células podem sofrer apoptose [76]. A linha celular WiDr possui uma mutação no gene *TP53*, fazendo com que a proteína p53 seja sobre-expressa [79]. O facto de a p53 se encontrar sobre-expressa nestas células tumorais, leva a que exista uma maior tendência para o bloqueio do ciclo celular em fase G0/G1, o que permite justificar a elevada percentagem (cerca de 85%) de células nesta fase, no controlo. O facto de a linha celular C2BBe1 expressar p53 *wild-type*, também permite justificar a percentagem de células em fase G0/G1 obtida no controlo. Quanto à linha celular LS1034 sabe-se que tem uma mutação no gene *TP53* que origina a troca de glicina por serina no codão 245, no entanto, não é conhecida a influência que essa mutação possui, contudo, verifica-se um comportamento semelhante ao das células WiDr.

O 5FU é um fármaco conhecido por provocar a paragem do ciclo celular em fase S, devido à inibição da TS [80]. De facto, como referido anteriormente é possível observar o aumento de células na fase S no tratamento com 5FU, nas três linhas celulares. Estudos realizados por Dimanche-Boitrel *et al.* (1998) evidenciam que células de carcinoma do cólon que sofrem maioritariamente bloqueio do ciclo em fase G0/G1 são menos suscetíveis à quimioterapia devido à elevada expressão de uma proteína reguladora da fase G0/G1, a p27^{Kip1} [81]. Assim, há necessidade de utilizar, neste tipo de células, fármacos que consigam exercer efeitos ao nível do bloqueio do ciclo na fase S, tais como o 5FU. Há também a necessidade de aumentar os efeitos destes fármacos. No entanto, é possível verificar que a combinação de AA com 5FU não é suficiente para aumentar o número de células com o ciclo parado na fase S em comparação com o 5FU. Apenas nas

células WiDr há um ligeiro aumento na fase S em relação ao tratamento com 5FU, mas sem significado estatístico. De qualquer forma, há aumento significativo de células nesta fase na terapia combinada em relação à monoterapia com AA em todas as linhas celulares, embora seja apenas estatisticamente significativo estatístico nas células WiDr ($p < 0,001$).

Também se pode verificar que para cada linha celular a população de células em fase pré-G1 se mantém praticamente inalterada entre os três tratamentos. Em todas as linhas celulares existe aumento desta população celular em relação ao controlo, no entanto, apenas é significativo na linha celular C2BBe1 nos três tratamentos ($p = 0,041$ para o tratamento com AA, $p = 0,003$ para o tratamento com 5FU e $p = 0,021$ para tratamento com terapia combinada). As células em fase pré-G1 são caracterizadas por possuírem um baixo conteúdo de DNA, ou seja, células cujo conteúdo de DNA está diminuído devido à fragmentação deste, uma das características iniciais da apoptose [82]. Estes resultados corroboram a existência de apoptose, sem alterações significativas entre condições, obtida no ensaio em que se utilizou a dupla marcação com AV-IP para avaliar a viabilidade e morte celular.

Há evidências de que o peróxido de hidrogénio possa causar, dependendo da concentração em que está presente, paragem do ciclo celular nas fases G1 ou S por mecanismos dependentes da p53 ou nas fases G2/M, estando ainda o mecanismo envolvido neste bloqueio por determinar [83]. Por outro lado, um estudo desenvolvido por Herst *et al.* (2012) demonstrou que a presença de 5 mM de AA isoladamente provocou um elevado dano ao nível do DNA através da indução de quebras na dupla hélice mas não foi capaz de provocar nenhuma alteração significativa no ciclo celular. Por outro lado, quando combinado com radiação, o AA provocou um grande bloqueio do ciclo na fase G2/M [74]. Nos resultados obtidos neste trabalho é possível constatar algo semelhante, ou seja, o AA quando presente isoladamente é incapaz de provocar alterações significativas relativamente ao controlo (exceto na linha C2BBe1, pois dá-se o aumento da fase pré-G1), mas quando combinado com o 5FU, dá-se o aumento do número de células com o ciclo bloqueado na fase S (em comparação com o controlo e tratamento com AA) e na fase G2/M. De facto, nas linhas celulares C2BBe1 e WiDr, o aumento da fase G2/M na terapia combinada é estatisticamente significativo em relação ao tratamento com AA isoladamente ($p = 0,001$ para C2BBe1 e $p = 0,025$ para WiDr) e em relação ao controlo apenas nas células WiDr ($p = 0,002$).

Este trabalho teve como objetivo fundamental avaliar a existência de efeito sinérgico entre a combinação de AA com 5FU no tratamento do cancro do cólon. As várias técnicas utilizadas nos diferentes contextos permitiram tirar várias conclusões acerca desta interação.

Os estudos *in vitro* realizados para avaliar o efeito do AA isoladamente permitiram verificar que este composto interfere com a capacidade de proliferação e formação de colónias das células, sendo o seu efeito dependente da linha celular, da sua concentração e do período durante o qual as células estão em contacto com este composto. Isto é confirmado quando após exposição das células por 24 horas ao AA se verifica a diminuição da viabilidade celular, o que poderá estar relacionado com o aumento da produção intracelular de ROS nas linhas celulares C2BBel e WiDr. Na linha celular LS1034, o efeito do AA não parece estar associado ao aumento das ROS, o que poderá estar relacionado com a adaptação destas células ao stresse oxidativo. Por outro lado, o aumento de ROS nas células WiDr pode levar à presença de danos ao nível do DNA.

Os estudos que envolveram a avaliação do efeito do 5FU ao nível da proliferação celular, em que se concluiu que há diminuição do seu IC50 com o aumento do tempo de incubação, foram desempenhados de forma a poder ser feita a avaliação do efeito da combinação desse fármaco com o AA.

A combinação do AA com o 5FU permitiu demonstrar que, não só é possível diminuir a concentração de 5FU quando o combinamos com AA, mas também obter sinergia entre os dois, resultados muito relevantes no tratamento do cancro. Apesar destes resultados promissores ao nível da proliferação celular, não se verificaram diferenças nos níveis de viabilidade/morte celular entre as três condições, ou seja, a combinação dos dois compostos e a concentração de cada composto individualmente, pelo que se postula a hipótese das combinações utilizadas em cada linha celular estarem a induzir a senescência das células. Ao nível do ciclo celular, a combinação dos dois compostos induz o aumento do número de células com o ciclo bloqueado na fase S (em comparação com o controlo e tratamento com AA) e na fase G2/M.

Em suma, os resultados obtidos confirmam a pertinência e encorajam a continuidade desta investigação em torno da combinação do ácido ascórbico com o 5FU no tratamento do cancro do cólon.

Capítulo 5

CONCLUSÕES

Ao longo deste trabalho, cujo objetivo principal foi verificar a possível sinergia na combinação do ácido ascórbico com o 5FU, foram avaliados o efeito do AA quando administrado isoladamente, bem como o efeito da combinação deste composto com o 5FU, em três linhas celulares de cancro do cólon.

O efeito do AA ao nível da proliferação celular foi avaliado através do ensaio SRB, o que permitiu concluir que a citotoxicidade deste composto é dependente da concentração em que está presente. A linha celular C2BBe1 revelou ser a mais sensível ao AA, o que poderá estar relacionado com a sobre-expressão de SVCT1, favorecendo a formação de um ambiente mais oxidativo nestas células. Por outro lado, as células que aparentam ser mais resistentes ao AA, são as LS1034, descritas na literatura como sendo quimiorresistentes. A realização do mesmo ensaio para averiguar o efeito do 5FU constituiu uma ferramenta para posterior avaliação do efeito da combinação dos dois compostos. Nas três linhas celulares, o seu IC50 diminuiu com o aumento do tempo de incubação, sendo a linha celular WiDr a mais sensível a este tratamento e, pelo contrário, a linha celular C2BBe1 a mais resistente.

A realização dos ensaios clonogénicos permitiu avaliar, a longo prazo, a eficácia do tratamento com AA nas linhas de cancro do cólon. Concluiu-se que este composto interfere com a capacidade de proliferar e formar colónias das três linhas celulares pois, à medida que a sua concentração aumenta, o fator de sobrevivência diminuiu.

A análise da viabilidade celular permitiu concluir que o tratamento com AA induz a diminuição significativa da viabilidade à medida que a concentração deste composto aumenta não se verificando, contudo, a presença predominante de um tipo de morte comum às três linhas celulares.

Nas linhas celulares C2BBe1 e WiDr há um aumento significativo da produção intracelular de radical superóxido havendo, no entanto, uma maior probabilidade de que o efeito pró-oxidante do AA esteja maioritariamente relacionado com a formação do radical superóxido no meio extracelular. Deste modo, será relevante averiguar a produção extracelular deste radical. Verifica-se nas células C2BBe1 um decréscimo acentuado e significativo na produção intracelular de peróxidos, o que se correlaciona com a diminuição da presença de GSH livre e, possivelmente, com a formação de outras espécies mais lesivas para as células a partir de peróxido de hidrogénio, tais como o radical hidroxilo. Assim, é de grande interesse a avaliação da presença do radical hidroxilo ou de outras espécies radicalares, através da utilização de sondas específicas para o efeito. Nas células WiDr parece haver uma ligeira tendência para a diminuição da

produção intracelular de peróxidos o que poderá estar relacionado com a diminuição da GSH livre.

Na linha celular LS1034 não se observam variações significativas na produção de radical superóxido, o que levanta a possibilidade de existir um baixo influxo de AA nesta linha celular, que poderá ser comprovado num trabalho futuro, através da avaliação da expressão dos transportadores SVCT1 e 2 por *Western Blot*. Na análise da produção intracelular de peróxidos verificou-se que não há alterações significativas neste parâmetro, o que poderá estar relacionado com a atuação de peróxidos a nível extracelular ou com a adaptação crescente ao stresse oxidativo, proveniente de espécies mais lesivas formadas a partir do peróxido de hidrogénio. Também nesta situação, a avaliação da presença de outras espécies mais lesivas, fará sentido. A presença de GSH livre não apresenta grandes variações, o que corrobora o que foi anteriormente afirmado.

Resultados preliminares revelaram que na linha celular WiDr parece existir algum efeito do AA ao nível do DNA, tal como sugere o ensaio cometa realizado, sendo esse dano proporcional à concentração de AA presente. Num trabalho futuro será importante aumentar o número de experiências, bem como realizar este ensaio para as outras duas linhas celulares.

A terapia combinada de AA com 5FU possibilita a diminuição significativa da concentração de 5FU necessária para atingir o mesmo efeito que na terapia isolada com este fármaco, tendo-se obtido sinergia entre ambos os compostos em algumas condições. Parece haver maior eficácia desta terapia na linha celular C2BBel e, pelo contrário, menor eficácia na linha WiDr. Os resultados dos ensaios clonogénicos, em que houve tratamento das células com a combinação dos dois compostos durante um maior período de tempo, parecem indicar que, para as condições testadas, a diminuição do fator de sobrevivência que se observa para todas as linhas celulares sujeitas à terapia combinada, advém dos efeitos do AA. Apenas nas células WiDr é que poderá haver uma maior contribuição por parte do 5FU para a redução do fator de sobrevivência.

Apesar dos resultados promissores ao nível da proliferação celular, não se verificaram diferenças nos níveis de viabilidade/morte celular entre a combinação dos dois compostos e a utilização de cada um individualmente, pelo que se postula a hipótese das combinações utilizadas em cada linha celular estarem a induzir a senescência das células. Ao nível do ciclo celular, a utilização de AA individualmente não produz alterações significativas em comparação com o controlo e, por sua vez, o 5FU induz maioritariamente bloqueio do ciclo celular na fase S. A combinação dos dois compostos

induz o aumento do número de células com o ciclo bloqueado na fase S (em comparação com o controlo e tratamento com AA), o que poderá advir dos efeitos do 5FU e na fase G2/M como resultado, possivelmente, do aumento de peróxido de hidrogénio.

De referir, que as concentrações de AA e de 5FU usadas na terapia combinada para a avaliação da sobrevivência e da viabilidade celulares, tipos de morte induzida e alterações ao nível do ciclo celular foram baseados nos resultados de proliferação celular obtidos, tendo sido escolhidas condições em que o AA estivesse presente em maior proporção ($f=0,75$). De facto, nos ensaios supracitados estas condições não revelaram efeitos significativos, sugerindo-se assim a repetição dos mesmos para as condições de $f=0,5$, com igual proporção de AA e 5FU, para as quais se verificou efeito sinérgico ao nível da proliferação celular.

Bibliografia

- [1] World Health Organization, *The World Health Organization's Fight Against Cancer: Strategies That Prevent, Cure and Care*. 2007.
- [2] J. Verrax, H. Taper, and P. Buc Calderon, "Targeting cancer cells by an oxidant-based therapy.," *Current molecular pharmacology*, vol. 1, no. 1, pp. 80–92, Jan. 2008.
- [3] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.," *Chemico-biological interactions*, vol. 160, pp. 1–40, Mar. 2006.
- [4] L. Duan, R. Wu, L. Ye, H. Wang, X. Yang, Y. Zhang, X. Chen, G. Zuo, Y. Zhang, Y. Weng, J. Luo, M. Tang, Q. Shi, T. He, and L. Zhou, "S100A8 and S100A9 Are Associated with Colorectal Carcinoma Progression and Contribute to Colorectal Carcinoma Cell Survival and Migration via Wnt/ β -Catenin Pathway.," *PloS one*, vol. 8, no. 4, pp. 1–13, Jan. 2013.
- [5] S. R. Hamilton and L. A. Aaltonen, *WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours*. IARC Press: Lyon 2000, 2000, pp. 103–05.
- [6] M. Fleming, S. Ravula, S. F. Tatishev, and H. L. Wang, "Colorectal carcinoma: Pathologic aspects.," *Journal of gastrointestinal oncology*, vol. 3, no. 3, pp. 153–73, Sep. 2012.
- [7] S. J. Winawer, "The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. Colorectal cancer screening.," *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, vol. 21, no. 6, pp. 1031–48, Jan. 2007.
- [8] J. D. Potter, "Colorectal cancer: molecules and populations.," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 91, no. 11, pp. 916–32, Jun. 1999.
- [9] T. C. He, a B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L. T. da Costa, P. J. Morin, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler, "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 281, no. 5382, pp. 1509–12, Sep. 1998.
- [10] R. Davies, R. Miller, and N. Coleman, "Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis," *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, pp. 199–209, 2005.
- [11] M. Verma, "Personalized Medicine and Cancer," *Journal of Personalized Medicine*, vol. 2, pp. 1–14, Jan. 2012.
- [12] C. L. Arteaga, "Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia," *Seminars in oncology*, vol. 29, no. 5 Suppl 14, pp. 3–9, Oct. 2002.
- [13] I. Chau and D. Cunningham, "Adjuvant therapy in colon cancer: current status and future directions," *Cancer Treatment Reviews*, vol. 28, pp. 223–236, Oct. 2002.

- [14] D. Catenacci, M. Kozloff, H. Kindler, and B. Polite, "Personalized Colon Cancer Care in 2010," *Seminars in Oncology*, vol. 38, no. 2, pp. 284–308, 2011.
- [15] A. Van Kuilenburg, "Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil.," *European journal of cancer*, vol. 40, pp. 939–950, 2004.
- [16] D. B. Longley, D. P. Harkin, and P. G. Johnston, "5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies," *Nature reviews. Cancer*, vol. 3, no. 5, pp. 330–8, May 2003.
- [17] R. Matuo, F. G. Sousa, A. E. Escargueil, D. G. Soares, I. Grivicich, J. Saffi, A. K. Larsen, and J. A. P. Henriques, "DNA repair pathways involved in repair of lesions induced by 5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP," *Biochemical Pharmacology*, vol. 79, pp. 147–153, 2010.
- [18] M. W. Saif, A. Choma, S. J. Salamone, and E. Chu, "Pharmacokinetically guided dose adjustment of 5-fluorouracil: a rational approach to improving therapeutic outcomes.," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 101, no. 22, pp. 1543–52, Nov. 2009.
- [19] B. E. Gamelin, V. Gue, R. Delva, A. Lortholary, F. Genevieve, F. Larra, N. Ifrah, and J. Robert, "Tolerance in Patients With Advanced Colorectal Cancer: A Potential Interest for Predicting 5-FU Toxicity and Determining Optimal 5-FU Dosage," vol. 17, no. 4, pp. 1105–1110, 1999.
- [20] K. N. Prasad, a Kumar, V. Kochupillai, and W. C. Cole, "High doses of multiple antioxidant vitamins: essential ingredients in improving the efficacy of standard cancer therapy.," *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 18, no. 1, pp. 13–25, Feb. 1999.
- [21] A. C. Mamede, S. D. Tavares, A. M. Abrantes, J. Trindade, J. M. Maia, and M. F. Botelho, "The role of vitamins in cancer: a review.," *Nutrition and cancer*, vol. 63, no. 4, pp. 479–94, Jan. 2011.
- [22] K. Iqbal, A. Khan, and M. M. A. K. Khattak, "Biological Significance of Ascorbic Acid (Vitamin C) in Human Health - A Review," *Pakistan Journal of Nutrition*, vol. 3, no. 1, pp. 5–13, Jan. 2004.
- [23] O. Arrigoni and M. C. De Tullio, "Ascorbic acid: much more than just an antioxidant," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1569, pp. 1–9, 2002.
- [24] J. Du, J. J. Cullen, and G. R. Buettner, "Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1826, no. 2, pp. 443–57, Dec. 2012.
- [25] S. J. Padayatty, A. Katz, Y. Wang, P. Eck, O. Kwon, J.-H. Lee, S. Chen, C. Corpe, A. Dutta, S. K. Dutta, and M. Levine, "Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention.," *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 22, no. 1, pp. 18–35, Feb. 2003.

- [26] J. Verrax and P. B. Calderon, "The controversial place of vitamin C in cancer treatment.," *Biochemical pharmacology*, vol. 76, no. 12, pp. 1644–52, Dec. 2008.
- [27] S. C. Rumsey and M. Levine, "Absorption , transport , and disposition of ascorbic acid in humans," *Nutritional Biochemistry*, vol. 9, pp. 116–130, 1998.
- [28] S. J. Padayatty and M. Levine, "New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C.," *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, vol. 164, no. 3, pp. 353–5, Feb. 2001.
- [29] Y. Li and H. E. Schellhorn, "New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C.," *The Journal of nutrition*, vol. 137, no. 10, pp. 2171–84, Oct. 2007.
- [30] S. J. Padayatty, H. Sun, Y. Wang, H. D. Riordan, S. M. Hewitt, A. Katz, R. A. Wesley, and M. Levine, "Vitamin C Pharmacokinetics: Implications for Oral and Intravenous Use," *Annals of Internal Medicine*, vol. 140, no. 7, pp. 533–538, 2004.
- [31] A. Corti, A. F. Casini, and A. Pompella, "Cellular pathways for transport and efflux of ascorbate and dehydroascorbate.," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 500, no. 2, pp. 107–15, Aug. 2010.
- [32] J. Mandl, a Szarka, and G. Bánhegyi, "Vitamin C: update on physiology and pharmacology.," *British journal of pharmacology*, vol. 157, no. 7, pp. 1097–110, Aug. 2009.
- [33] J. Myllyharju, "Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis.," *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, vol. 22, no. 1, pp. 15–24, Mar. 2003.
- [34] K. L. Gorres and R. T. Raines, "Direct and continuous assay for prolyl 4-hydroxylase.," *Analytical biochemistry*, vol. 386, no. 2, pp. 181–5, Mar. 2009.
- [35] N. R. Sahyoun, P. F. Jacques, and R. M. Russell, "Carotenoids, vitamins C and E, and mortality in an elderly population.," *American journal of epidemiology*, vol. 144, no. 5, pp. 501–11, Sep. 1996.
- [36] J. a Drisko, J. Chapman, and V. J. Hunter, "The use of antioxidants with first-line chemotherapy in two cases of ovarian cancer," *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 22, no. 2, pp. 118–23, Apr. 2003.
- [37] S. J. Padayatty, H. D. Riordan, S. M. Hewitt, A. Katz, L. J. Hoffer, and M. Levine, "Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases.," *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, vol. 174, pp. 937–42, Mar. 2006.
- [38] Q. Chen, M. G. Espey, A. Y. Sun, J.-H. Lee, M. C. Krishna, E. Shacter, P. L. Choyke, C. Pooput, K. L. Kirk, G. R. Buettner, and M. Levine, "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*, vol. 104, no. 21, pp. 8749–54, May 2007.
- [39] Q. Chen, M. G. Espey, M. C. Krishna, J. B. Mitchell, C. P. Corpe, G. R. Buettner, E. Shacter, and M. Levine, "Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 38, pp. 13604–9, Sep. 2005.
- [40] L. J. Hoffer, M. Levine, S. Assouline, D. Melnychuk, S. J. Padayatty, K. Rosadiuk, C. Rousseau, L. Robitaille, and W. H. Miller, "Phase I clinical trial of i.v. ascorbic acid in advanced malignancy.," *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, vol. 19, no. 11, pp. 1969–74, Nov. 2008.
- [41] T. Ozben, "Oxidative Stress and Apoptosis : Impact on Cancer Therapy," *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 96, no. 9, pp. 2181–2196, 2007.
- [42] M. J. González, J. R. Miranda-Massari, E. M. Mora, A. Guzmán, N. H. Riordan, H. D. Riordan, J. J. Casciari, J. a Jackson, and A. Román-Franco, "Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later.," *Integrative cancer therapies*, vol. 4, no. 1, pp. 32–44, Mar. 2005.
- [43] T. Chou, "Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies," *Pharmacological reviews*, vol. 58, no. 3, pp. 621–681, 2006.
- [44] K. K. Kim, T. S. Lange, R. K. Singh, L. Brard, and R. G. Moore, "Tetrathiomolybdate sensitizes ovarian cancer cells to anticancer drugs doxorubicin, fenretinide, 5-fluorouracil and mitomycin C.," *BMC cancer*, vol. 12, no. 1, pp. 147–57, Jan. 2012.
- [45] C. Vollbracht, B. Schneider, V. Leendert, G. Weiss, L. Auerbach, and J. Beuth, "Intravenous vitamin C administration improves quality of life in breast cancer patients during chemo-/radiotherapy and aftercare: results of a retrospective, multicentre, epidemiological cohort study in Germany.," *In vivo (Athens, Greece)*, vol. 25, no. 6, pp. 983–90, 2011.
- [46] K. Naidu, "Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview," *Nutrition Journal*, vol. 2, no. 7, pp. 1–10, 2003.
- [47] T. M. Straub, J. R. Hutchison, R. a Bartholomew, C. O. Valdez, N. B. Valentine, a Dohnalkova, R. M. Ozanich, and C. J. Bruckner-Lea, "Defining cell culture conditions to improve human norovirus infectivity assays.," *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, vol. 67, no. 4, pp. 863–8, Jan. 2013.
- [48] J. Casalta-Lopes, A. M. Abrantes, M. Laranjo, J. Rio, A. C. Gonçalves, B. Oliveiros, A. B. Sarmiento-Ribeiro, and M. F. Botelho, "Efflux Pumps Modulation

- in Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines: The Role of Nuclear Medicine,” *Journal of Cancer Therapy*, vol. 2, pp. 408–417, 2011.
- [49] M. Ilyas, I. P. Tomlinson, A. Rowan, M. Pignatelli, and W. F. Bodmer, “Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 19, pp. 10330–4, Sep. 1997.
- [50] R. Straetemans, T. O’Brien, L. Wouters, J. Van Dun, M. Janicot, L. Bijmens, T. Burzykowski, and M. Aerts, “Design and Analysis of Drug Combination Experiments,” *Biometrical Journal*, vol. 47, no. 3, pp. 299–308, Jun. 2005.
- [51] A. Shalmashi and A. Eliassi, “Solubility of L-(+)-Ascorbic Acid in Water, Ethanol, Methanol, Propan-2-ol, Acetone, Acetonitrile, Ethyl Acetate, and Tetrahydrofuran from (293 to 323) K,” *Journal of Chemical & Engineering Data*, vol. 53, no. 6, pp. 1332–1334, 2008.
- [52] P. Houghton, R. Fang, I. Techatanawat, G. Steventon, P. J. Hylands, and C. C. Lee, “The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity,” *Methods (San Diego, Calif.)*, vol. 42, no. 4, pp. 377–87, Aug. 2007.
- [53] N. a P. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, and C. van Bree, “Clonogenic assay of cells in vitro,” *Nature protocols*, vol. 1, no. 5, pp. 2315–9, Jan. 2006.
- [54] Y. Wang, F. Hammes, K. De Roy, W. Verstraete, and N. Boon, “Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology,” *Trends in biotechnology*, vol. 28, no. 8, pp. 416–24, Aug. 2010.
- [55] I. Vermes, C. Haanen, and C. Reutelingsperger, “Flow cytometry of apoptotic cell death,” *Journal of immunological methods*, vol. 243, no. 1–2, pp. 167–90, Sep. 2000.
- [56] R. Sgonc and J. Gruber, “Apoptosis detection: an overview,” *Experimental gerontology*, vol. 33, no. 6, pp. 525–33, Sep. 1998.
- [57] Z. Darzynkiewicz, G. Juan, X. Li, W. Gorczyca, T. Murakami, and F. Traganos, “Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis),” *Cytometry*, vol. 27, no. 1, pp. 1–20, Jan. 1997.
- [58] M. van Engeland, L. J. Nieland, F. C. Ramaekers, B. Schutte, and C. P. Reutelingsperger, “Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure,” *Cytometry*, vol. 31, no. 1, pp. 1–9, Jan. 1998.
- [59] A. Gomes, E. Fernandes, and J. L. F. C. Lima, “Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species,” *Journal of biochemical and biophysical methods*, vol. 65, no. 2–3, pp. 45–80, Dec. 2005.

- [60] O. Myhre, J. M. Andersen, H. Aarnes, and F. Fonnum, "Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation," *Biochemical Pharmacology*, vol. 65, no. 10, pp. 1575–1582, May 2003.
- [61] S. Dikalov, K. K. Griendling, and D. G. Harrison, "Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies," *Hypertension*, vol. 49, no. 4, pp. 717–727, 2007.
- [62] D. W. Hedley and S. Chow, "Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry," *Cytometry*, vol. 15, pp. 349–58, Apr. 1994.
- [63] A. D. Deitch, H. Law, and R. deVere White, "A stable propidium iodide staining procedure for flow cytometry," *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 30, no. 9, pp. 967–972, Sep. 1982.
- [64] J. Fried, a G. Perez, and B. D. Clarkson, "Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. Properties of the method and mathematical analysis of the data.," *The Journal of cell biology*, vol. 71, no. 1, pp. 172–81, Oct. 1976.
- [65] H. a Crissman and J. a Steinkamp, "Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations," *The Journal of Cell Biology*, vol. 59, no. 3, pp. 766–71, Dec. 1973.
- [66] A. R. Collins, "The Comet Assay for DNA Damage and Repair," *Molecular Biotechnology*, vol. 26, pp. 249–61, 2004.
- [67] P. L. Olive and J. P. Banáth, "The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells.," *Nature protocols*, vol. 1, no. 1, pp. 23–9, Jan. 2006.
- [68] C. R. Kent, J. J. Eady, G. M. Ross, and G. G. Steel, "The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay.," *International journal of radiation biology*, vol. 67, no. 6, pp. 655–60, Jun. 1995.
- [69] S.-W. Hong, D.-H. Jin, E.-S. Hahm, S.-H. Yim, J.-S. Lim, K.-I. Kim, Y. Yang, S.-S. Lee, J.-S. Kang, W.-J. Lee, W.-K. Lee, and M.-S. Lee, "Ascorbate (vitamin C) induces cell death through the apoptosis-inducing factor in human breast cancer cells.," *Oncology reports*, vol. 18, no. 4, pp. 811–5, Oct. 2007.
- [70] J. S. Kang, D. Cho, Y.-I. Kim, E. Hahm, Y. Yang, D. Kim, D. Hur, H. Park, S. Bang, Y. Il Hwang, and W. J. Lee, "L-ascorbic acid (vitamin C) induces the apoptosis of B16 murine melanoma cells via a caspase-8-independent pathway.," *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, vol. 52, no. 11, pp. 693–8, Nov. 2003.
- [71] N. P. Maulén, E. a Henríquez, S. Kempe, J. G. Cárcamo, A. Schmid-Kotsas, M. Bachem, A. Grünert, M. E. Bustamante, F. Nualart, and J. C. Vera, "Up-regulation and polarized expression of the sodium-ascorbic acid transporter SVCT1 in post-

- confluent differentiated CaCo-2 cells.,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 11, pp. 9035–41, Mar. 2003.
- [72] G. Barrera, “Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy.,” *ISRN oncology*, vol. 2012, no. Article ID 137289, p. 21 pages, Jan. 2012.
- [73] M. Landriscina, F. Maddalena, G. Laudiero, and F. Esposito, “Adaptation to oxidative stress, chemoresistance, and cell survival.,” *Antioxidants & redox signaling*, vol. 11, no. 11, pp. 2701–16, Nov. 2009.
- [74] P. M. Herst, K. W. R. Broadley, J. L. Harper, and M. J. McConnell, “Pharmacological concentrations of ascorbate radiosensitize glioblastoma multiforme primary cells by increasing oxidative DNA damage and inhibiting G2/M arrest.,” *Free radical biology & medicine*, vol. 52, pp. 1486–93, Apr. 2012.
- [75] A. Frömberg, D. Gutsch, D. Schulze, C. Vollbracht, G. Weiss, F. Czubayko, and A. Aigner, “Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells towards cytostatic drugs.,” *Cancer chemotherapy and pharmacology*, vol. 67, pp. 1157–66, May 2011.
- [76] G. J. Peters, B. van Triest, H. H. Backus, C. M. Kuiper, C. L. van der Wilt, and H. M. Pinedo, “Molecular downstream events and induction of thymidylate synthase in mutant and wild-type p53 colon cancer cell lines after treatment with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed.,” *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, vol. 36, no. 7, pp. 916–24, May 2000.
- [77] R. S. DiPaola, “To Arrest or Not To G2-M Cell-Cycle Arrest,” *Clinical cancer research*, vol. 8, pp. 3311–3314, 2002.
- [78] K. Vermeulen, D. R. Van Bockstaele, and Z. N. Berneman, “The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer.,” *Cell proliferation*, vol. 36, no. 3, pp. 131–49, Jun. 2003.
- [79] N. R. Rodrigues, A. Rowan, M. E. F. Smith, I. A. N. B. Kerr, W. F. Bodmer, J. V Gannon, and D. P. Lane, “p53 mutations in colorectal cancer,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, pp. 7555–7559, 1990.
- [80] A. Jordan and J. Stein, “Effect of an omega-3 fatty acid containing lipid emulsion alone and in combination with 5-fluorouracil (5-FU) on growth of the colon cancer cell line Caco-2.,” *European journal of nutrition*, vol. 42, pp. 324–31, Dec. 2003.
- [81] M.-T. Dimanche-Boitrel, O. Micheau, A. Hammann, M. Haugg, B. Eymin, B. Chauffert, and E. Solary, “Contribution of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 KIP1 to the confluence-dependent resistance of HT29 human colon cancer.,” *International Journal of Cancer*, vol. 77, pp. 796–802, 1998.

- [82] C. J. Li and T. H. Elsasser, "Butyrate-induced apoptosis and cell cycle arrest in bovine kidney epithelial cells : Involvement of caspase and proteasome pathways," *Journal of animal science*, vol. 83, pp. 89–97, 2005.
- [83] G. N. Bijur, B. Briggs, C. L. Hitchcock, and M. V Williams, "Ascorbic acid-dehydroascorbate induces cell cycle arrest at G2/M DNA damage checkpoint during oxidative stress.," *Environmental and molecular mutagenesis*, vol. 33, no. 2, pp. 144–52, Jan. 1999.

