



2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ação do Radical Hidroxilo na Resposta Celular
do Cancro da Próstata

Cláudia Maria da Cunha Maio

2013

Ação do Radical Hidroxilo na Resposta Celular do
Cancro da Próstata

Cláudia Maria da Cunha Maio



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ação do Radical Hidroxilo na Resposta Celular do Cancro da Próstata

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 Anabela Mota Pinto (Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Maria Carmen Alpoim (Universidade de Coimbra)

Cláudia Maria da Cunha Maio

2013

Science is wonderfully equipped to answer the question "How?" but it gets terribly confused when you ask the question "Why?"

Erwin Chargaff

Agradecimentos

Este trabalho marca o fim de uma longa jornada no meu percurso académico e pessoal e, como tal, não posso deixar de agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, estiveram envolvidos na sua concretização.

À Professora Doutora Anabela Mota Pinto, orientadora desta tese de dissertação de mestrado, que me acolheu no Instituto de Patologia Geral e, aceitou guiar-me durante todo o processo de aprendizagem. Pela sua honestidade e espírito crítico que contribuíram (e contribuirão!) para o meu crescimento, tanto a nível profissional, como a nível pessoal. Muito Obrigada!

À minha co-orientadora Mariana Freitas pela amizade, por todo o tempo despendido a tornar-me uma melhor profissional, pela ENORME paciência e disponibilidade incondicional para me ajudar em tudo o que foi necessário. Muito Obrigada!

À Professora Doutora Maria Carmen Alpoim, orientadora desta tese de dissertação de mestrado, pela partilha de conhecimentos a nível científico, enquanto docente do curso de Bioquímica. Muito Obrigada!

À Mestre Sofia Vale Pereira pela amizade, pelos conselhos, pela partilha de conhecimentos que foram essenciais para a realização desta tese, e que seguramente me serão úteis no futuro, ao longo de toda a carreira de investigação. Muito Obrigada!

À D. Leonor Salguinho pela amizade, pelos conselhos e pelo apoio administrativo. Muito Obrigada!

À Professora Doutora Isabel Carreira, Diretora do Centro de Investigação em Meio Ambiente Genética e Oncologia, CIMAGO, pela possibilidade de realização desta Dissertação. Muito Obrigada!

Ao Professor Doutor Santos Rosa, Diretor do Laboratório de Imunologia, pela possibilidade de realização de parte deste trabalho. Muito Obrigado!

À Dra. Vera Alves, pelos ensinamentos científicos que contribuíram para a realização deste projeto. Muito Obrigada!

À Doutora Inês Baldeiras do Laboratório de Neuroquímica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, pela colaboração e ensinamentos científicos que tanto contribuíram para a realização deste projeto. Muito Obrigada!

À Carla Santos, pela amizade e momentos de companheirismo, pelo apoio incondicional, pelos conhecimentos (Jamie Cullum!), pelas longas conversas que tivemos juntas, por estares sempre presente nos bons e nos maus momentos, pela ENORME paciência que tiveste comigo, por tudo! Muito Obrigada!

À Maria Inês pela amizade, pelos conhecimentos (Manga e Anime!), pelas conversas e risos, pela troca de experiências e pela ENORME paciência que tiveste comigo, por tudo! Muito Obrigada! ありがとう!

Às Meninas do “eterno n.º 9”, Raquel, Tânia, Sílvia e Sofia, pela amizade, pelos conhecimentos (da vida noturna!), pelas conversas e risos durante longas noites, por estarem sempre presente nos bons e nos maus momentos e pela ENORME paciência que tiveram comigo. Muito Obrigada!

À Andreia, madrinha de curso, pela amizade, pelos conhecimentos (aulas de Japonês!), pelos fabulosos apontamentos que me emprestaste ao longo do curso, pelas conversas e trocas de experiências que tivemos, tanto a nível pessoal, como a nível científico. Muito Obrigada! 谢谢!

Ao grupo de Japonês, pela amizade, pelo convívio, pelas tertúlias que tivemos ao longo destes anos, pelos conhecimentos (mundo da cultura asiática!), pelas

parvoíces, pelos momentos de descontração, por tudo! Um especial agradecimento a Erica-chan, por me ter ajudado a formatar as imagens dos meus resultados, por ter tratado do *design* da capa dos CDs e pelo conhecimento “mais profundo” da cultura japonesa (アニメ と 漫画)! どうも有り難うございます!!!

À Carolina, colega de curso de Inglês, a eterna sobrevivente que me acompanhou ao longo destes quatro anos, obrigado pela amizade e pelos conselhos que me deste! Muito Obrigada! Thank you!

À minha família, em especial aos meus pais, aos meus avós maternos, aos meus padrinhos e ao meu irmão, por me terem proporcionado meios para que eu pudesse continuar os meus estudos e, pelo apoio e carinho incondicional que sempre me transmitiram em todos os momentos. Muito Obrigado!

A todos os meus amigos e colegas que de uma maneira ou outra marcaram esta fase da minha vida, aqui em Coimbra e em Aveiro, e que continuarão a marcar... cada um à sua maneira!

Índice

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 – Epidemiologia do cancro da próstata	1
1.2 – Fatores de risco	2
1.3 – Stresse oxidativo	4
1.3.1 – Espécies reativas de oxigénio (ROS)	5
1.3.1.1 – Mitocôndria: fonte de ROS	7
1.3.3.2 – Ação das ROS no cancro da próstata	9
1.3.2 – Sistema de defesas antioxidantes	10
1.4 – Terapias antineoplásicas	14
1.4.1 – Tratamento convencional	14
1.4.2 – Resistência das células metastizadas ao stresse oxidativo	15
1.5 – O papel do peróxido de hidrogénio e do ferro nos processos biológicos	17
1.5.1 – Peróxido de hidrogénio	17
1.5.1.1 – O papel do peróxido de hidrogénio na carcinogénese	17
1.5.2 – Ferro	18
1.6 – Objetivos	19
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	22
2.1 – Caracterização do modelo experimental	22
2.1.1 – Manutenção e cultura da linha celular	22
2.1.2 – Incubação da linha celular com os compostos selecionados	23
2.2 – Determinação da proliferação e viabilidade celular	24
2.2.1 – Método de exclusão do azul tripano	24
2.2.2 – Análise da proliferação celular pelo método do <i>Alamar Blue</i>	24
2.2.3 – Análise da morte celular por citometria de fluxo utilizando a marcação dupla com anexina V e iodeto de propídio	26

2.2.4 – Análise da expressão de moléculas envolvidas na morte celular por citometria de fluxo	28
2.2.5 – Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	29
2.3. Estudos de stresse oxidativo em linhas celulares	31
2.3.1. Preparação de lisados celulares	31
2.3.2. Quantificação de proteína	31
2.3.3. Avaliação da atividade enzimática da redutase do glutatião	32
2.3.4. Quantificação de glutatião reduzido	33
2.3.5. Avaliação da peroxidação lipídica	34
2.3.6. Análise da produção de ROS	35
2.3.6.1. Determinação da produção de peróxidos intracelulares	36
2.3.6.2. Determinação da produção de anião superóxido	36
2.4. Análise de dados e tratamento estatístico	37
Capítulo 3 – Resultados	40
3.1 – Indução de stresse oxidativo como estratégia terapêutica	40
3.1.1 – Efeito do radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) induzido por peróxido de hidrogénio e ferro na proliferação celular	40
3.1.2 – Efeito do radical hidroxilo induzido por peróxido de hidrogénio e ferro na viabilidade e morte celular	47
3.1.3 – Efeito da indução de $\bullet\text{OH}$ no stresse oxidativo	51
3.1.3.1 – Avaliação da produção de peróxidos intracelulares	51
3.1.3.2 – Avaliação da produção de anião superóxido	52
3.1.3.3 – Avaliação da peroxidação lipídica	54
3.1.3.4 – Análise das defesas antioxidantes	55
Capítulo 4 – Discussão	60

Capítulo 5 – Conclusão	68
5.1 – Conclusões gerais e perspectivas futuras	68
Capítulo 6 – Referências Bibliográficas	72

Resumo

O cancro da próstata é uma doença multifatorial resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais. Trata-se da neoplasia maligna sólida mais frequente nos indivíduos do sexo masculino.

O stresse oxidativo, resultante do balanço entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e as defesas antioxidantes, tem vindo a ser reconhecido pela sua participação no desenvolvimento e progressão desta patologia. As ROS apresentam potencial capacidade para induzir lesão oxidativa de biomoléculas, nomeadamente, proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. Por sua vez, a lesão oxidativa de ADN pode originar mutações genéticas cuja acumulação contribui para o desenvolvimento e progressão do cancro, nomeadamente, da próstata. Por oposição, as defesas antioxidantes contrariam a ação das ROS.

A terapêutica convencional do cancro da próstata, nomeadamente, a quimioterapia, a radioterapia e o tratamento hormonal, são ineficazes na doença avançada devido ao desenvolvimento de resistência por parte das células neoplásicas. Alguns autores justificam a adaptação à radioterapia com base na capacidade de resposta do sistema antioxidante. Resultados prévios revelam que o aumento de defesas antioxidantes em células de metástase da próstata, poderá explicar parte da sua resistência ao aumento de ROS, como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), evitando a sua conversão no radical hidroxilo ($\bullet OH$), altamente lesivo para as células. No entanto, desconhece-se a resistência destas células ao aumento de $\bullet OH$. Desta forma pretendemos avaliar se a indução de stresse oxidativo, através da exposição das

células de cancro da próstata ao $\bullet\text{OH}$, poderá constituir uma estratégia terapêutica e/ou coadjuvante da terapêutica em cancro da próstata.

Para o efeito o estudo foi realizado na linha celular PC-3, representativa da doença metastizada, sendo a mesma tratada com H_2O_2 e ferro (sulfato de ferro (FeSO_4) e cloreto de ferro (FeCl_3)), de forma isolada e combinada, a fim de induzir a formação do radical $\bullet\text{OH}$, de acordo com a reação de Fenton e Haber-Weiss.

Os nossos resultados evidenciam que o radical $\bullet\text{OH}$, resultante da combinação de H_2O_2 e ferro, induziu um efeito inibitório da proliferação celular superior ao efeito isolado de cada um dos compostos. A inibição da proliferação celular foi acompanhada de bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1. Para além da inibição da proliferação celular, a combinação de peróxido e ferro induziu aumento significativo de morte, a qual ocorreu maioritariamente por necrose. Também se observou aumento significativo da morte celular, por apoptose, sobretudo em resultado da combinação de 250 μM de H_2O_2 com 500 μM FeCl_3 , sugerindo que este composto é mais eficaz do que o FeSO_4 como indutor de stresse oxidativo. Concomitantemente, observou-se diminuição da produção de peróxidos o que poderá resultar da sua conversão no radical $\bullet\text{OH}$. Ainda se observou aumento do anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e da peroxidação lipídica evidenciada pelo aumento de malondialdeído (MDA). Paralelamente, estudamos a eficácia das defesas antioxidantes na resposta ao aumento de stresse oxidativo. Os resultados evidenciaram um aumento significativo da concentração de glutatião (GSH) nas células tratadas com os compostos isoladamente, mas não em resultado da combinação sugerindo a saturação do sistema antioxidante mediante o

aumento de stresse oxidativo. Relativamente à redutase do glutatião (Gl-Red), não se observaram variações na sua atividade.

Assim, este estudo sugere que $\bullet\text{OH}$ é mais eficaz do que o H_2O_2 na indução de stresse oxidativo, o que poderá constituir uma nova estratégia terapêutica do cancro da próstata.

Palavras-Chave: Cancro da Próstata, Radical Hidroxilo, Stresse Oxidativo, Peróxido de Hidrogénio, Ferro.

Abstract

Prostate cancer is a multifactorial disease with genetic and environmental factors involved in its etiology and is the most frequently solid cancer in males.

Oxidative stress, which reflects the imbalance between reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant system, has been associated to prostate cancer development and progression. ROS have the capacity to induce oxidant damage in biomolecules such as proteins, lipids and nucleic acid. Furthermore, oxidative damage can cause genetic mutations which accumulation contributes to pathology development and progression. Oppositely, antioxidant defences counteract the action of ROS.

Conventional therapy of prostate cancer, namely chemotherapy, radiotherapy and hormonal treatment are ineffective in advanced disease due to the development of cancer cells resistance. Some authors explain radiotherapy adaptation, in part, due to the antioxidant system response. Previous results show that an increase of antioxidant defences, in prostate cancer metastasis, induces resistance to an increase of ROS, such as hydrogen peroxide (H_2O_2), avoiding hydroxyl radical ($\bullet OH$) formation which is harmful to cells. However, prostate cancer cells resistance against $\bullet OH$ is not well established. Therefore, we intend to evaluate if oxidative stress induction, by exposing prostate cancer cells to $\bullet OH$, may represent a new therapeutic approach and/or an adjuvant therapy in prostate cancer.

The study was performed in the PC-3 cancer cell line, which represents metastatic disease. This cancer cell line was treated with H_2O_2 , iron (II) sulfate ($FeSO_4$) and iron

(III) chloride (FeCl_3), alone and in combination, in order to produce $\bullet\text{OH}$, via Fenton and Haber-Weiss reaction.

Results show that $\bullet\text{OH}$ radical, resulting from H_2O_2 and iron combination, induced an inhibitory effect on cell proliferation, higher than the other compounds alone. This inhibition was accomplished by cell cycle arrest during G0/G1 phase.

Cell viability and death studies showed that H_2O_2 and iron combination induced a significant increase in cell death, mainly by necrosis, particularly, in the presence of $250\ \mu\text{M}$ of H_2O_2 with $500\ \mu\text{M}$ of FeCl_3 . This suggests that FeCl_3 is more efficient than FeSO_4 in inducing oxidative stress. Concomitantly, we observed a decrease in peroxides production, which may result from its conversion to $\bullet\text{OH}$ radical. Likewise, we observed an increase of superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) and lipid peroxidation detected by the increase of malondialdehyde (MDA). Moreover, we evaluated the antioxidant defenses response to the increase of $\bullet\text{OH}$. We found a significant increase of glutathione (GSH) in the cells treated with the compounds alone, but not in the cells treated with the combined compounds. Therefore these results suggest the antioxidant system saturation under the increase of oxidative stress. Relatively to glutathione reductase (G1-Red), we did not observe changes in its activity.

Moreover, this study suggests that $\bullet\text{OH}$ is more effective than H_2O_2 in the induction of oxidative stress which may represent a new therapeutic approach in prostate cancer.

Keywords: Prostate Cancer, Hydroxyl Radical, Oxidative Stress, Hydrogen Peroxide, Iron.

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
AR	Recetor do androgénio (<i>androgen receptor</i>)
ATP	Trifosfato de adenosina
ATTC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAX	Proteína <i>BCL2-associated X protein</i>
BCA	Ácido bicinconínico (<i>bicinchoninic acid</i>)
BCL-2	Proteína <i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre (II) pentahidratado
Cu,Zn-SOD	SOD de cobre e zinco (citosólica)
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH	2',7'- diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	2',7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato
DHE	Dihidroetidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC-SOD	SOD extracelular
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FBS	Soro fetal bovino
FeCl ₃	Cloreto de ferro (III)

FeSO ₄	Sulfato de ferro (II)
FICT	Isotiocianato de fluoresceína
GI-Px	Peroxidase do glutatião
GI-Rx	Redutase do glutatião
GSH	Glutatião (forma reduzida)
GSSH	Glutatião (forma oxidada)
GST	Glutathione-S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfónico
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
IC ₅₀	Concentração para a qual se observa 50% de inibição da proliferação celular
IP	Iodeto de propídio
JC-1	5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol carbocianina iodada
KH ₂ PO ₄	Di-hidrogenofosfato de potássio
MDA	Malondialdeído
MIF	Média de intensidade de fluorescência
Mn-SOD	SOD de manganésio (mitocondrial)
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato)
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio

OH ⁻	Ião hidróxilo
PBS	Tampão fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PS	Fosfatidilserina
ROO [•]	Radical peróxido
ROS	Espécies reativas de oxigénio
RPM	Rotações por minuto
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SOD	Superóxido dismutase
Trx	Tioredoxina
HOCl	Ácido hipocloroso
O ₂ ^{•-}	Anião superóxido
ONOO ⁻	Anião peroxinitrito
[•] OH	Radical hidróxilo
ΔΨ _{mit}	Potencial de membrana mitocondrial

Capítulo 1 – Introdução

1.1 – Epidemiologia do cancro da próstata

O carcinoma da próstata é a neoplasia sólida mais frequente nos indivíduos do sexo masculino e, constitui a segunda causa de morte por cancro nos Estados Unidos da América e a terceira na Europa. Dados estatísticos da Sociedade Americana de Cancro estimaram cerca de 241 740 novos casos e 28 170 mortes nos Estados Unidos para o ano de 2012^{1,2}. Em Portugal, a GLOBOCAN, previu cerca de 5 140 novos casos e 2 021 mortes por cancro da próstata para o ano de 2008³.

A taxa de incidência desta patologia varia no mundo, observando-se uma maior ocorrência nos países ocidentais comparativamente aos países orientais (Figura 1.1). A etnia também parece estar envolvida no desenvolvimento desta neoplasia. Em particular, a população afro-americana surge como a mais atingida, contrastando com a população asiática. No entanto, estudos epidemiológicos evidenciam aumento do risco de cancro da próstata nos indivíduos asiáticos que emigram para países ocidentais e adotam o respetivo estilo de vida, sugerindo o efeito combinado de fatores genéticos e ambientais no desenvolvimento desta patologia^{4,5,6,7}.

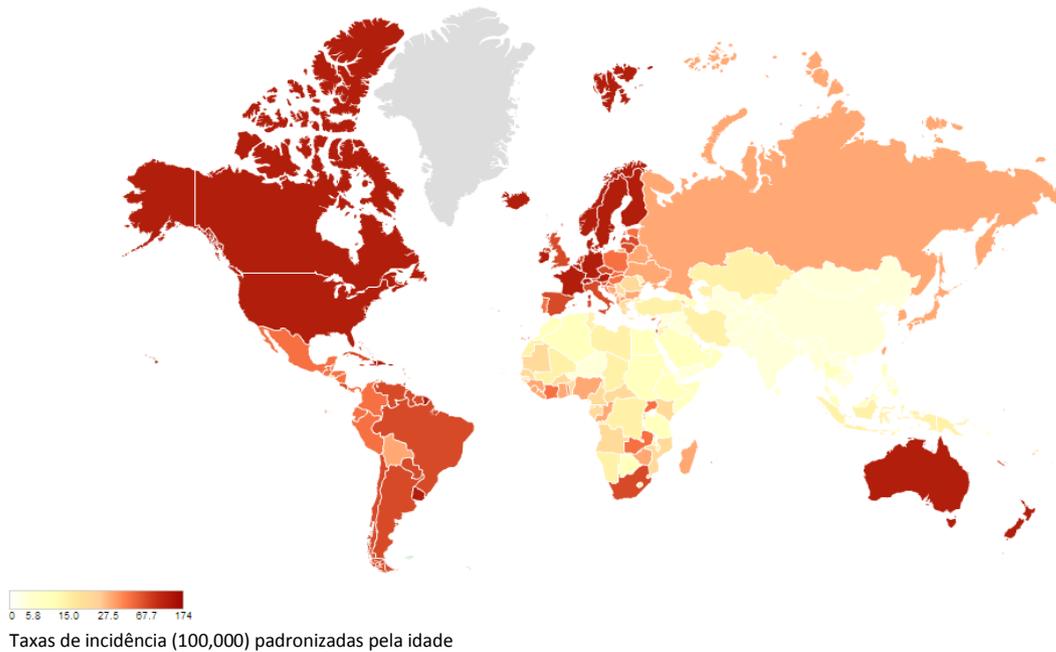


Figura 1.1 – Mapa representativo da incidência mundial do cancro da próstata. Retirado de *GLOBOCAN 2008, International Agency for Research on Cancer*³.

1.2 – Fatores de risco para o desenvolvimento do cancro da próstata

A interação entre os fatores genéticos e ambientais influencia o desenvolvimento e progressão desta patologia. O envelhecimento, a etnia e a história clínica familiar constituem fatores de risco devidamente estabelecidos para o desenvolvimento desta neoplasia^{8,9}.

Outros estudos também sugerem o estilo de vida, a dieta alimentar, a exposição a carcinogéneos, a inflamação prostática crónica ou recorrente, como fatores de risco desta doença. O efeito destes fatores no desenvolvimento e progressão do cancro da próstata está, em parte relacionado com o aumento de stresse oxidativo, resultante do balanço entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e as defesas antioxidantes^{1,9,10,11}.

Nomeadamente, no que concerne à dieta alimentar, a ingestão abusiva de alimentos ricos em gordura animal, como por exemplo as carnes vermelhas e produtos lácteos, associado a uma ingestão pobre em vegetais e fruta, ricos em antioxidantes, relaciona-se com maior risco de cancro da próstata^{9,12,13}.

Aproximadamente 20% de todos os tipos de cancro em adultos resultam de um processo inflamatório crónico, sendo que, durante este processo, existe uma acentuada produção de ROS¹⁴. As células fagocíticas e determinados mediadores inflamatórios como as citocinas ativam a enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase, a qual catalisa a produção de ROS como o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2), necessários na defesa contra os microrganismos^{1,15}.

Outro fator também muito importante é o envelhecimento. Este surge associado a perturbações fisiológicas incluindo prostatites. Os indivíduos com idades superiores aos 54 anos são mais susceptíveis de desenvolver a doença^{1,16}.

Existem várias teorias que tentam explicar o papel do stresse oxidativo no processo de envelhecimento a nível molecular e bioquímico. Harman¹⁷ sugeriu que a acumulação de lesões oxidativas em biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas e lípidos) desencadeada por radicais livres tem um papel importante no envelhecimento humano designadamente, a acumulação de mutações a nível do ADN mitocondrial (ADNmt). Adicionalmente, a deteção de marcadores de stresse oxidativo, associados ao envelhecimento, revela aumento do mesmo ao longo da vida do indivíduo^{1,18}. O aumento do stresse oxidativo, durante o envelhecimento, é potenciado pela diminuição das defesas antioxidantes, nomeadamente do glutatião reduzido (GSH) e das enzimas peroxidase do glutatião (Gl-Px) e superóxido dismutase (SOD)^{1,19}.

1.3 – Stresse oxidativo

Em condições normais, as células são capazes de manter a homeostasia resultante da formação de espécies oxidantes e antioxidantes, sendo que ambas desempenham um papel importante no metabolismo, na transdução de sinal e na regulação das funções vitais da célula^{13,20}. Níveis adequados de ROS são necessários para manter a normal função e sinalização celular, participando no crescimento, diferenciação, morte ou regulação da expressão génica^{20,21,22}. Como referido, o stresse oxidativo surge em resultado do desequilíbrio entre ROS e defesas antioxidantes, caracterizando-se pela produção em excesso de ROS e/ou a redução de defesas antioxidantes (Figura 1.2)²³.

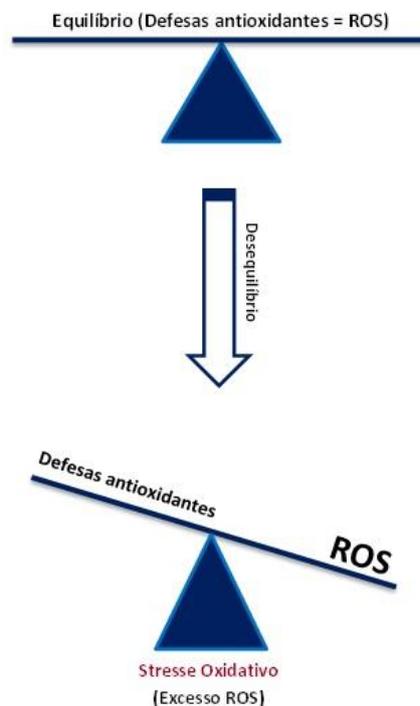


Figura 1.2 – Esquema representativo do balanço *redox* entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e as defesas antioxidantes. Em condições normais, as células são capazes de manter o equilíbrio entre a formação de ROS e ação de defesas antioxidantes. O stresse oxidativo surge em resultado da produção em excesso de ROS e/ou a redução de defesas antioxidantes. Adaptado de Scandalios²⁴.

1.3.1 – Espécies reativas de oxigênio (ROS)

Os radicais livres resultantes do metabolismo celular, bem como da ação de fontes ambientais, interagem continuamente em sistemas biológicos. Os agentes oxidantes e antioxidantes têm de ser mantidos em equilíbrio, a fim de evitar a formação de lesões moleculares, celulares e tecidulares resultantes da ação de ROS²⁵. O efeito oxidativo pode ser proveniente da infecção por microrganismos, ação de químicos e outros fatores ambientais, exposição solar à radiação ultravioleta, ingestão de alimentos calóricos, processos inflamatórios de origem crônica, atividade da cadeia respiratória mitocondrial, β -oxidação dos peroxissomas, entre outros. A exposição a estas fontes de ROS, tanto de origem exógena como endógena, aumenta o risco de desenvolvimento de neoplasias, em parte resultantes da acumulação de mutações genéticas que poderão ter origem na lesão oxidativa do ADN^{21,22,26}.

As ROS podem ser radicais livres caracterizados por conterem pelo menos um elétron não emparelhado. Estas espécies são altamente instáveis, uma vez que tendem a captar elétrons de moléculas vizinhas, de modo a completar as suas orbitais de valência^{20,21,27,28}. Sob o ponto de vista biológico, os radicais mais importantes são o $O_2^{\bullet-}$, o radical hidroxilo ($\bullet OH$) e o peróxido ($ROO\bullet$). As ROS incluem outras moléculas para além dos radicais livres, que facilmente se convertem nestes, como é o caso do H_2O_2 . Esta molécula, na presença de iões metálicos como o ferro ou cobre, pode ser facilmente convertido no radical $\bullet OH$, altamente lesivo para as células, de acordo com a reação de Fenton e Haber-Weiss (Figura 1.3)^{27,28,29}.

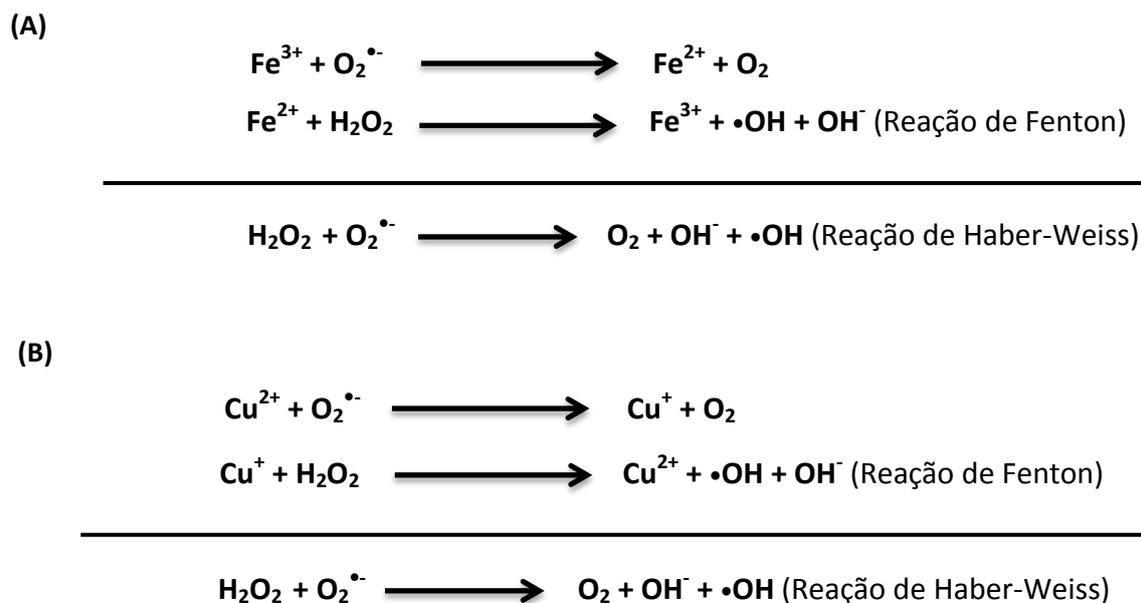


Figura 1.3 – Reação de Fenton e de Haber-Weiss na presença de iões metálicos, como o ferro (A) e cobre (B).

Na Tabela I.1 estão representados alguns exemplos de ROS, tanto radicais livres como espécies não radicalares²⁷.

Tabela I.1 – Alguns exemplos representativos de espécies reativas de oxigénio (ROS).
Adaptado de Toyokuni²⁷.

Radicais livres	
O_2^-	Superóxido
$\text{HO}_2\bullet$	Radical hidroperoxilo
$\bullet\text{OH}$	Radical hidroxilo
$\text{RO}\bullet$	Radical alcoxilo
$\text{ROO}\bullet$	Radical peróxido
Espécies não radicalares	
$^1\text{O}_2$	Oxigénio singuleto
H_2O_2	Peróxido de hidrogénio
HClO	Ácido Hipocloroso
O_3	Ozono

1.3.1.1 – Mitocôndria: fonte de ROS

A mitocôndria é um organelo intracelular, presente nas células eucarióticas, que desempenha um papel fundamental na obtenção de energia, através da produção de adenosina trifosfato (ATP). Para além desta função, a mitocôndria é crucial para a regulação da homeostasia celular, uma vez que está envolvida na regulação da sinalização intracelular, na formação de ROS, na apoptose e no metabolismo celular³⁰.

Estruturalmente, estes organelos citoplasmáticos são envolvidos por um sistema de dupla membrana, separadas por um espaço intermembranar. A membrana interna apresenta inúmeras dobras – cristas – que se estendem para o interior (matriz) do organelo nas quais estão localizados os componentes da cadeia respiratória³¹.

A síntese de ATP na mitocôndria depende do transporte de eletrões e da ejeção simultânea de prótons através da membrana mitocondrial interna para o espaço intermembranar. Este processo é mediado por um sistema enzimático, organizado em quatro complexos: o Complexo I ou NADH coenzima Q redutase, o Complexo II ou succinato coenzima Q redutase, o Complexo III ou ubiquinol citocromo *c* redutase e o Complexo IV ou citocromo *c* oxidase (Figura 1.4). A energia libertada, pela transferência de eletrões entre os complexos da cadeia respiratória mitocondrial, é aproveitada no bombeamento de prótons para o espaço intermembranar, que resulta na formação de um gradiente eletroquímico entre o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial. A energia proveniente deste gradiente é utilizada na síntese de ATP, a partir de adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (P_i), no Complexo V ou ATP Sintase^{32,33}.

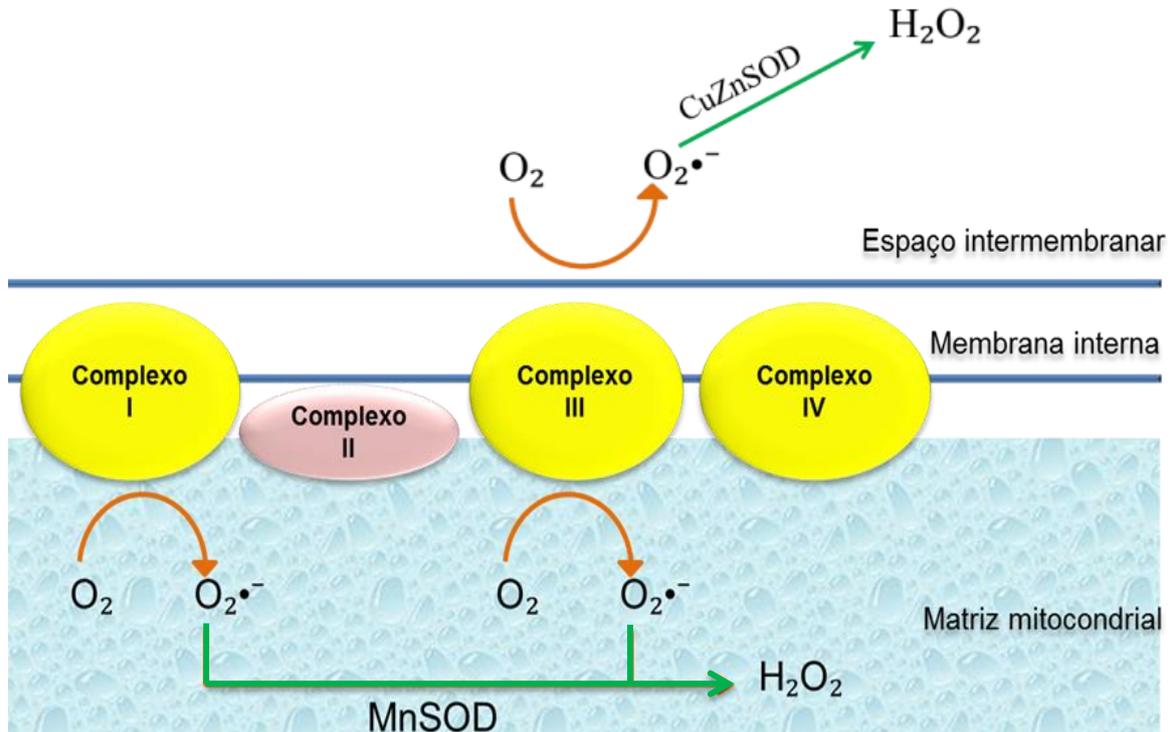


Figura 1.4 – Esquema representativo da produção de ROS ao nível da respiração mitocondrial. Está representada a conversão do radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 resultante da ação da enzima manganésio superóxido dismutase (MnSOD), ao nível da matriz mitocondrial, ou da enzima cobre-zinco superóxido dismutase (Cu,ZnSOD), ao nível do espaço intermembranar. Complexo I: NADH coenzima Q redutase; Complexo II: succinato coenzima Q redutase; Complexo III: ubiquinol citocromo c redutase; Complexo IV: citocromo C oxidase. Retirado de Freitas³⁴.

Contudo, uma pequena porção de moléculas de O_2 (1-2%), não é completamente reduzido a água (H_2O), mas sim no anião $O_2^{\bullet-}$, principalmente, ao nível dos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial³⁵. O H_2O_2 também é gerado como produto celular ao nível da respiração mitocondrial,²¹ sendo que a partir destas duas espécies é possível formar outras, nomeadamente o radical $\bullet OH$, com capacidade de interferir na atividade mitocondrial³² bem como induzir a lesão oxidativa ao nível do ADNmt, de proteínas e de lípidos³⁶.

1.3.1.2 – Ação das ROS no cancro

Como referido as ROS podem causar lesão nas células através da sua reação com biomoléculas nomeadamente, lípidos da membrana, os nucleótidos, grupos sulfidril das proteínas ou ribonucleoproteínas²².

A oxidação de lípidos designada por peroxidação lipídica ocorre frequentemente ao nível dos ácidos gordos polinsaturados da bicamada lipídica, comprometendo as propriedades biofísicas da membrana, nomeadamente a fluidez e permeabilidade. A peroxidação lipídica processa-se por reação em cadeia originando diversos radicais capazes de iniciar novas reações^{20,37}. Como resultado formam-se também produtos não radicalares, como é o caso do malondialdeído (MDA), cuja quantificação permite avaliar a extensão da lesão oxidativa de lípidos³⁸.

A oxidação das proteínas origina alterações conformacionais, modificações nos aminoácidos e mesmo rutura nas ligações peptídicas. A lesão de alguns aminoácidos como a lisina, a arginina e a prolina conduz à formação de derivados carbonil, cuja quantificação permite avaliar a extensão da lesão oxidativa de proteínas^{39,40}.

Dentro dos vários danos que as ROS podem originar, nomeadamente o $\bullet\text{OH}$, a lesão oxidativa do ADN é considerada a principal causa para o desenvolvimento do cancro sobretudo, em resultado de mutações em genes envolvidos na proliferação celular ou resistência à morte (oncogenes e genes supressores tumorais, respetivamente)²¹.

A carcinogénese da próstata é um processo que resulta da acumulação de mutações genéticas e epigenéticas ao longo do tempo, as quais conduzem inicialmente à transformação neoplásica e posteriormente à progressão e metastização do cancro (Figura 1.5)^{1,21,22}.

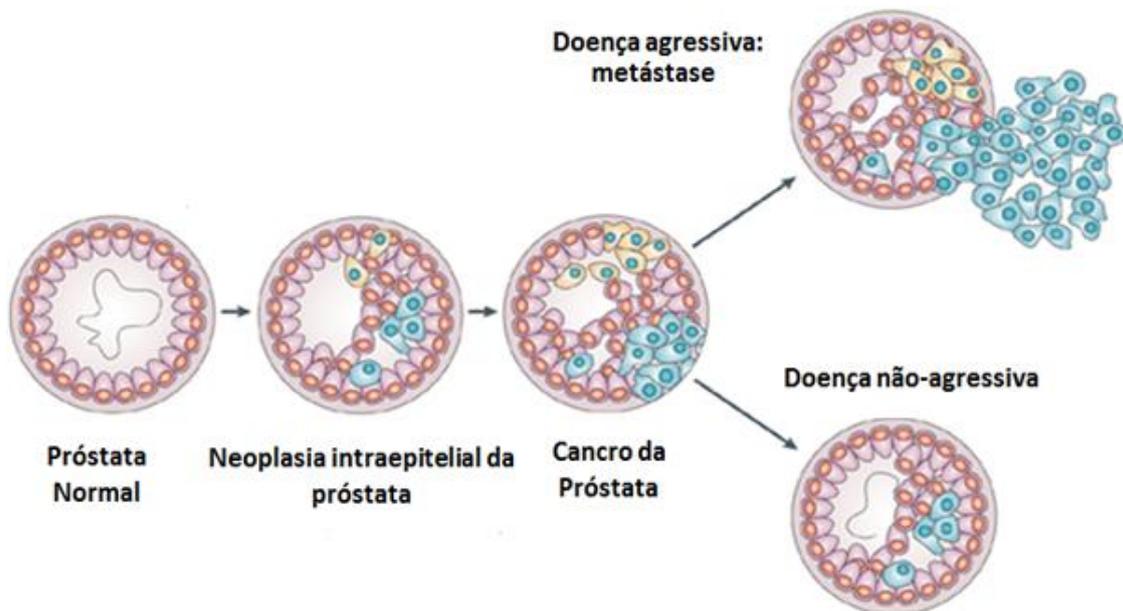


Figura 1.5 – Esquema representativo da formação, desenvolvimento e progressão do carcinoma da próstata. Adaptado de Witte⁴¹.

1.3.2 – Sistema de defesa antioxidante

Um aumento das ROS requer a adaptação do sistema antioxidante. Os antioxidantes são capazes de combater os efeitos adversos das ROS evitando que as mesmas reajam com alvos biológicos. Assim, poderão prevenir a conversão do O_2 , em produtos altamente reativos⁴².

Estes sistemas podem ter origem endógena ou exógena. Os de origem endógena, também designados por defesas antioxidantes, podem ser do tipo enzimático ou não-

enzimático (Tabela I.2). As enzimas antioxidantes incluem a SOD, a catalase, a GI-Px, a redutase do glutatião (GI-Red), a glutathione S-transferase (GST), entre outras. As defesas antioxidantes não enzimáticas incluem o GSH, o ácido úrico, melatonina, entre outros^{28,29,42,43}. Por seu lado, os de origem exógena são obtidos essencialmente através da dieta alimentar. É o caso dos polifenóis, carotenóides, as vitaminas C e E, compostos organossulfurados, entre outros⁴².

Tabela I.2 – Alguns exemplos de antioxidantes de origem endógena e exógena.
Adaptado de Ratnam *et al*⁴².

Agentes não enzimáticos	Agentes enzimáticos
Glutatião reduzido	Superóxido dismutase
Ácido úrico	Catalase
β -caroteno	Peroxidase do glutatião
Melatonina	Redutase do glutatião
Vitamina C e E	Glutathione-S-transferase
Flavanóides	Redutase da tioredoxina
Ácidos fenólicos	

A defesa antioxidante enzimática SOD, apresenta três isoformas, a citosólica dependente de cobre e zinco como cofatores (Cu, Zn-SOD), a mitocondrial dependente de manganésio (SOD-Mn) e a extracelular (EC-SOD). Esta enzima cataliza a reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ com formação de H_2O_2 (Figura 1.6)^{28,29,44}.

A GI-Px é uma enzima dependente de selénio, existe no citoplasma e na mitocôndria e, com a catalase, coopera na remoção do H_2O_2 (Figura 1.6)^{29,42,43}. A GI-Px

está presente no organismo humano sob a forma de cinco isoenzimas: a Gl-Px-1 presente no citosol, a Gl-Px-2 no trato gastrointestinal, a Gl-Px-3 no plasma, a Gl-Px-4 que atua em lípidos oxidados e a Gl-Px-sn presente no núcleo de espermatozoides⁴⁵.

O GSH (γ -glutamilcisteinilglicina) é o tiol não proteico mais abundante nas células dos mamíferos. Trata-se de um tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina. É sintetizado a nível intracelular e a sua regulação está a cargo de três enzimas: sintase da γ -glutamilcisteína na biossíntese de GSH, Gl-Red na regeneração/reciclagem de glutatião oxidado (GSSG) e γ -glutamiltranseptidase na degradação de GSSG⁴⁶.

A fim de evitar a conversão de H_2O_2 no radical $\bullet OH$, a catalase e a Gl-Px induzem a sua transformação em H_2O e/ou O_2 ^{24,28,29}. A Gl-Red é responsável por regular o par glutatião reduzido/glutatião oxidado (GSH/GSSG), regenerando a forma reduzida a partir da sua forma oxidada. Para o efeito, utiliza a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH) como agente redutor, proveniente da via das pentoses-fosfato (Figura 1.6). A NADPH é formada no metabolismo da glicose, numa reação catalisada pela desidrogenase da glicose-6-fosfato (G6PD)^{24,28,29,42}.

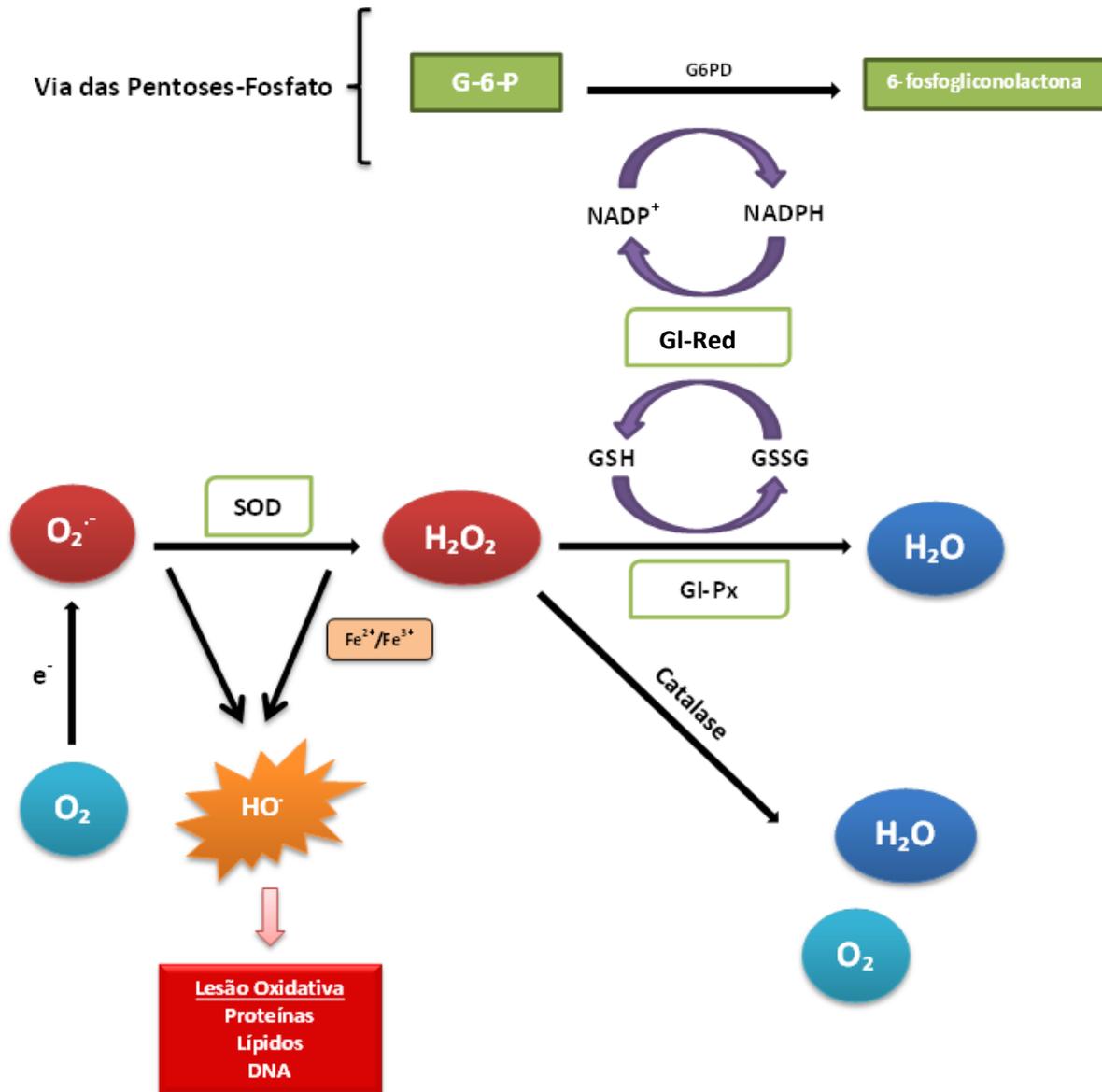


Figura 1.6 – Esquema representativo da ação de defesas antioxidantes ao nível dos mecanismos biológicos. A formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) pode resultar da adição de um eletrão ao oxigénio, no seu estado fundamental, originando o anião superóxido ($O_2^{\bullet -}$). Este, pela ação da superóxido dismutase (SOD), é convertido em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) que, na presença de iões metálicos como o ferro, é convertido no radical hidroxilo $\bullet OH$. A fim de evitar a conversão de H_2O_2 no radical $\bullet OH$, a catalase e a peroxidase do glutatião (GI-Px) induzem a sua transformação em H_2O e/ou O_2 . A redutase do glutatião (GI-Red) é responsável por regular o par glutatião reduzido/glutatião oxidado (GSH/GSSG), regenerando a forma reduzida a partir da sua forma oxidada. Para o efeito, utiliza a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH) como agente redutor, proveniente da via das pentoses-fosfato. A NADPH é formada no metabolismo da glicose, numa reação catalisada pela desidrogenase da glicose-6-fosfato (G6PD). Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺); glicose-6-fosfato (G-6-P). Adaptado de Haddad⁴⁴.

1.4 – Terapias antineoplásicas

1.4.1 – Tratamento convencional

Os androgénios desempenham um papel importante na normal diferenciação e maturação sexual masculina, bem como na espermatogénese e no desenvolvimento e maturação da glândula prostática⁴⁷. Por outro lado, também é conhecido o papel destas hormonas no desenvolvimento e progressão do carcinoma da próstata, uma descoberta que valeu a Hughsins o prémio Nobel da Medicina^{48,49}. Os efeitos dos androgénios resultam da ligação ao recetor de androgénio (AR), que atua como um fator de transcrição nuclear dependente de um ligando (as hormonas testosterona e a 5 α -di-hidrotestosterona)^{50,51}.

A terapêutica convencional do cancro da próstata localizado apresenta uma elevada taxa de cura, contudo, o mesmo não se verifica para a doença metastizada¹. A intervenção cirúrgica, a radioterapia, a quimioterapia e o tratamento hormonal constituem algumas das possibilidades terapêuticas⁵².

Quando a doença se encontra localizada na glândula prostática, a prostatectomia radical é uma das opções mais frequentemente adotadas e consiste na remoção cirúrgica da próstata⁵². Quanto à radioterapia, a técnica assenta no princípio da indução de níveis elevados de ROS sobre as células neoplásicas, com a finalidade de induzir lesão oxidativa e consequente morte celular por apoptose^{25,53}. No entanto, as células metastizadas apresentam resistência a esta terapêutica o que foi demonstrado por Erenpreisa e seus colaboradores (2000)⁵⁴.

Sendo o cancro da próstata geralmente dependente dos androgénios (maioritariamente produzidos nos testículos), a privação androgénica tem constituído uma estratégia terapêutica do cancro da próstata eficaz no início do tratamento do cancro metastizado^{47,55}. Porém, as células da glândula prostática tornam-se independentes dos androgénios e proliferam em indivíduos castrados (sob supressão androgénica)^{47,51,55}.

Uma outra terapia é a quimioterapia na qual é usado um agente anticancerígeno, designado por *docetaxel*. Este fármaco tem a capacidade de se ligar aos microtúbulos promovendo a sua polimerização e, conseqüentemente bloquear a progressão do ciclo celular ao nível da fase G2/M induzindo, posteriormente, a apoptose das células neoplásicas. Todavia, verificou-se que a exposição contínua a este fármaco induz a formação de células cancerígenas resistentes à sua ação^{54,55,56}.

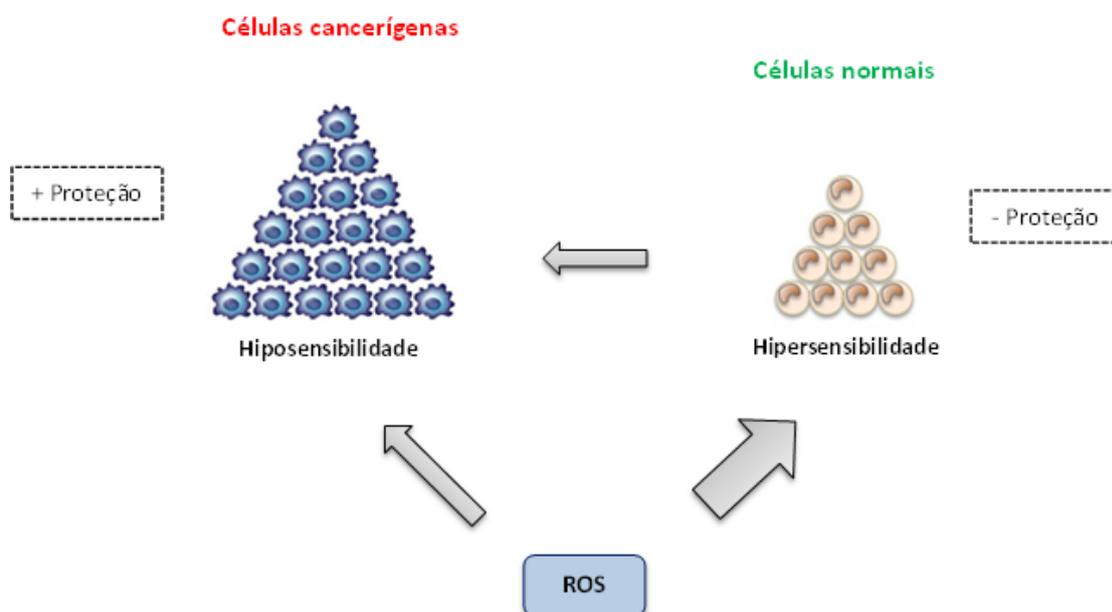
1.4.2 – Resistência das células metastizadas ao stresse oxidativo

Os tratamentos convencionais mencionados, como a quimioterapia, a radioterapia e o tratamento hormonal falham em eliminar tumores avançados devido ao desenvolvimento de resistência por parte das células metastizadas. Alguns autores justificam a adaptação destas células à radioterapia com base na capacidade de adaptação do sistema antioxidante, como o aumento dos níveis de GSH^{57,58,59,60}.

O GSH tem duplo papel uma vez é capaz de contribuir para a prevenção da transformação neoplásica atendendo ao seu caráter antioxidante. Por outro lado, pode promover a progressão da patologia através de mecanismos de resistência dependentes de GSH, contribuindo para uma maior agressividade das células

cancerígenas⁴⁶. Resultados prévios revelam que o aumento de GSH, em células de metástase da próstata, poderá explicar parte da sua adaptação ao aumento de ROS como o H_2O_2 , evitando a sua conversão no radical $\bullet OH$, altamente lesivo para as células,^{61,62} contribuindo para a resistência à radioterapia.

A Figura 1.7 representa um modelo explicativo da sensibilidade das células normais e das células cancerígenas às ROS resultantes da radioterapia. Enquanto as células normais são sensíveis à morte celular induzida pela radiação ionizante, as células cancerígenas poderão ser mais resistentes por apresentarem mecanismos antioxidantes (glutatião, SOD, catalase, entre outros) sobre regulados. Como consequência, estas células encontram-se protegidas da ação das ROS⁶⁰.



1.7 – Modelo representativo da sensibilidade das células normais e das células cancerígenas às espécies reativas de oxigênio (ROS). Nas células normais as ROS resultantes da radioterapia induzem morte celular, uma vez que os mecanismos antioxidantes não estão preparados para a intensidade do insulto, tornado estas células hipersensíveis à radioterapia. Em contraste, as células cancerígenas apresentam mecanismos antioxidantes (glutatião, SOD, catalase, entre outros) sobre regulados, protegendo-as da ação das ROS resultantes da radioterapia. Adaptado de Reuter⁶⁰.

1.5 – O papel do peróxido de hidrogénio e do ferro nos processos biológicos

1.5.1 – Peróxido de hidrogénio

O H_2O_2 é um agente oxidante, conhecido pela sua capacidade de se difundir livremente pela membrana celular^{20,63}. Esta espécie, apesar de ser menos reativa que o anião $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o radical $\bullet\text{OH}$, é capaz de remover eletrões de outras espécies, potenciando assim a sua oxidação. A toxicidade do H_2O_2 deve-se em grande parte à sua conversão no radical $\bullet\text{OH}$, na presença de metais de transição (ferro e cobre), do anião $\text{O}_2^{\bullet-}$ e da radiação ionizante^{20,63,64}.

O H_2O_2 é capaz de se acumular na célula em concentrações relativamente elevadas^{20,63}. A concentração desta espécie nas células é de $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ ^{20,65}.

1.5.1.1 – O papel do peróxido de hidrogénio na carcinogénese

Apesar de diversos estudos revelarem que o H_2O_2 contribui para o desenvolvimento do cancro próstata⁶⁶, a sua presença em níveis elevados pode induzir a morte das células cancerígenas desde que o sistema antioxidante não se encontre suficientemente eficaz^{67,68}.

Diferentes concentrações de H_2O_2 ou diferentes capacidades do sistema antioxidante podem refletir-se em efeitos celulares distintos. Assim, concentrações adequadas de H_2O_2 têm um papel fundamental na sinalização intracelular. Um aumento parcial dos seus níveis na célula pode contribuir para a carcinogénese através da indução e acumulação de mutações genéticas. No entanto, níveis mais elevados de

H₂O₂ podem induzir a morte celular⁶⁸. Assim sendo, os investigadores têm avaliado o aumento de stresse oxidativo como possível estratégia terapêutica²⁰.

1.5.2 – Ferro

O ferro (Fe) desempenha um papel crucial na regulação da homeostasia celular. A presença deste metal no organismo é fundamental para o crescimento celular, o normal funcionamento do sistema imunitário, o transporte de O₂ no sangue (ex. hemoglobina), a atividade enzimática, uma vez que faz parte do centro catalítico de muitas enzimas^{20,69}.

Do ponto de vista químico, o Fe é um metal de transição que apresenta dois estados de oxidação: o estado ferroso (+2) e férrico (+3). Os iões ferrosos (Fe²⁺) são solúveis em fluídos biológicos e, na presença do O₂, geram radicais •OH. Contudo, em meio aquoso, os iões Fe²⁺ são instáveis e tendem a reagir com o O₂, formando os iões Fe³⁺ e o anião O₂^{•-}. A forma oxidada do ferro, o ião férrico (Fe³⁺), é insolúvel em água a pH neutro e precipita na forma de hidróxido férrico (Fe(OH)₃)^{20,69,70}. Como a solubilidade do Fe³⁺, na presença do O₂, é reduzida, os sistemas biológicos tiveram que ultrapassar esta situação. Para tal, os organismos evoluíram, de modo a sintetizar proteínas capazes de se ligarem ao Fe³⁺ como a transferrina. Esta ligação tem ser estável em termos termodinâmicos e, ao mesmo tempo, cineticamente viável para os processos biológicos⁶⁹.

1.6 – Objetivos

Pretende-se com este trabalho contribuir para uma melhor compreensão do papel do radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) e do stresse oxidativo na resposta celular do cancro da próstata e avaliar de que forma a indução do stresse oxidativo, através da exposição das células de cancro da próstata ao radical, poderá constituir uma nova abordagem terapêutica para esta neoplasia.

Para a concretização desta proposta de trabalho foi utilizado, como modelo de estudo *in vitro*, uma linha celular de cancro da próstata (PC-3), representativa da doença metastizada. Assim sendo, os objetivos deste trabalho são:

- Avaliar o efeito de $\bullet\text{OH}$, resultante da combinação de H_2O_2 e ferro (FeSO_4 e FeCl_3) na proliferação celular, na viabilidade e na morte celular;
- Avaliar o efeito de $\bullet\text{OH}$ nas alterações de stresse oxidativo, em particular, na produção de peróxidos intracelulares, anião superóxido e lesão oxidativa;
- Determinar a eficácia das defesas antioxidantes, Gl-Red e GSH, na resposta ao aumento do radical $\bullet\text{OH}$.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1 – Caracterização do modelo experimental

No presente trabalho foi utilizado, como modelo de estudo *in vitro*, uma linha celular de cancro da próstata, representativa da doença metastizada, isolada a partir de metástases ósseas. A referida linha celular, designada por PC-3^{71,72}, foi adquirida no *American Type Culture Collection* (ATCC) e mantida em cultura nas condições ótimas de crescimento.

2.1.1 – Manutenção e cultura da linha celular

A linha celular tumoral PC3 foi mantida em meio RPMI 1640 (Sigma) enriquecido com 8% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) (Biochrom AG) inativado, 2 mM de L-glutamina (Sigma) e suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Invitrogen) e 5 µg/mL de canamicina (Sigma). As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25 ou 75 cm² ou em placas de cultura com 6 e 24 compartimentos, e mantidas numa incubadora humidificada a uma temperatura de 37°C com 5% de CO₂.

Tratando-se de células aderentes, foi necessário destacá-las da superfície de crescimento, a fim de realizar os ensaios pretendidos e proceder à manutenção das culturas celulares. A separação foi realizada com recurso à tripsina. Para o efeito, procedeu-se à aspiração do meio de cultura e à lavagem com tampão fosfato salino 1X (PBS) (Gibco). Em seguida, adicionou-se a tripsina-EDTA (0,25%/0,02%) (p/v) (Biochrom AG) e colocaram-se as células na incubadora a 37°C, durante 2-5 minutos.

Subsequentemente, procedeu-se à inibição da tripsina com recursos às propriedades do FBS, presente no meio RPMI 1640. Desta forma adicionou-se à tripsina o respetivo meio, sendo que o volume deste era duplo do volume de tripsina. Posteriormente, todas as células foram colhidas e centrifugadas a 1000 rpm (300 xg), durante 10 minutos.

2.1.2 – Incubação da linha celular com os compostos selecionados

Ao longo do trabalho, a linha celular tumoral foi incubada com diferentes compostos, de acordo com os estudos de interesse. Desta forma, após as células adquirirem uma confluência de aproximadamente 80%, foram incubadas com compostos indutores de stresse oxidativo, nomeadamente peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Sigma), sulfato de ferro (FeSO_4) (Sigma) e cloreto de ferro (FeCl_3) (Sigma), a fim de induzir a produção do radical $\cdot\text{OH}$, de acordo com a reação de Fenton (Equação 2.1) e Habber-Weiss (Equação 2.2)²⁸.



Para os diversos ensaios a linha celular foi incubada com uma densidade de $0,1 \times 10^6$ células/mL e mantida em cultura de acordo com as condições referidas em 2.1.1. As células foram tratadas com os compostos por períodos de 24, 48 e 72 horas.

2.2 – Determinação da proliferação e viabilidade celular

2.2.1 – Método de exclusão do azul tripano

A viabilidade celular foi inicialmente avaliada através da capacidade das células de excluírem o corante azul tripano (Sigma).

Este corante não é tóxico e interage apenas com células cuja membrana esteja lesada. Neste sentido as células viáveis, cuja membrana plasmática se encontra intacta, não absorvem o corante e, por isso, permanecem incolores. Por outro lado as células mortas, cuja membrana se encontra lesada, absorvem rapidamente o corante e adquirem uma cor azul, o que permite a sua identificação ao microscópio⁷³.

Desta forma, após a obtenção das células, em conformidade com o descrito na secção 2.1.1, procedeu-se à sua ressuspensão e colheram-se 20 µL de células para um *ependorf*, ao qual se adicionou igual volume de solução de azul de tripano numa concentração final de 0,4% (V/V). A mistura, depois de homogeneizada, foi colocada no hemocitómetro num volume correspondente a 20 µL e observada ao microscópio ótico⁷⁴. Este método foi utilizado para determinar a concentração de células.

2.2.2 – Análise da proliferação celular pelo método do *Alamar Blue*

A proliferação celular foi avaliada por espectrofotometria através do ensaio colorimétrico de oxidação-redução da resazurina (Sigma) (comercialmente designado por *AlamarBlue*®). Na sua forma oxidada, a resazurina apresenta-se como um composto de cor azul e não fluorescente. Ao ser reduzido é convertido em resorufina,

um composto cor-de-rosa e altamente fluorescente^{75,76,77} (Figura 2.1). A resazurina, ao ser incorporada pelas células, atua como um aceitador intermediário de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, ao nível do complexo IV^{78,79}. Como resultado, este composto pode ser reduzido intracelularmente, na presença de enzimas mitocondriais^{76,77}. A determinação da redução do composto permite assim avaliar a variação na atividade metabólica das células, bem como a variação da proliferação celular^{76,80,81}.

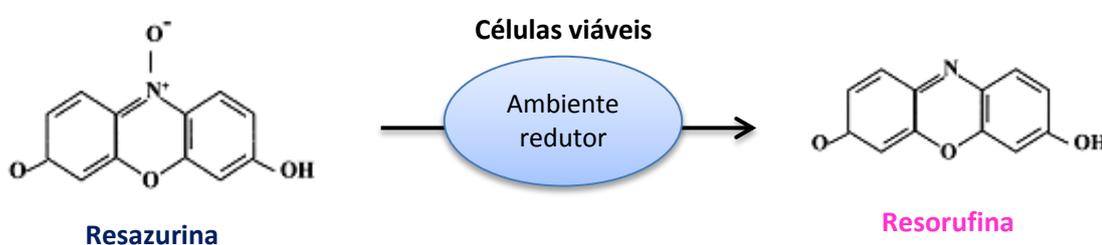


Figura 2.1 – Representação esquemática da reação de redução da resazurina a resorufina. A resazurina é um indicador azul não fluorescente, convertível em resorufina, através de reações de redução das células metabolicamente ativas. Adaptado de O'Brien *et al*⁷⁷.

Desta forma para avaliar o efeito dos compostos acima referidos na proliferação, as células foram tratadas em conformidade com o descrito na secção 2.1.2, em placas de cultura com 24 compartimentos. Aquando da adição dos compostos, acrescentou-se 0,1 mg/mL de resazurina em PBS ao meio de cultura, numa proporção de 1/10 (v/v) para um volume final de 1 mL. No final de cada período de incubação de 24, 48 ou 72 horas, retiraram-se 200 μ L de meio de cultura de células tratadas e respetivos controlos positivos (células não tratadas) e negativos (meio cultura com 10% de solução de resazurina em PBS) para uma microplaca, a fim de avaliar a redução da resazurina. Para o efeito foi utilizado o espectrofotómetro de microplacas SpectraMax[®] Plus³⁸⁴. A absorvância foi monitorizada a um comprimento de onda de 570 nm (estado

reduzido) e de 600 nm (estado oxidado)⁷⁵. A proliferação celular foi calculada, em função da percentagem de células não tratadas (controlo), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% = \frac{[(A_{570} - A_{600})_{amostra}] - [(A_{570} - A_{600})_{branco}]}{[(A_{570} - A_{600})_{controlo}] - [(A_{570} - A_{600})_{branco}]} \times 100$$

Os resultados obtidos representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes.

2.2.3 – Análise da morte celular por citometria de fluxo utilizando a marcação dupla com anexina V e iodeto de propídio

A avaliação do tipo de morte celular foi analisada por citometria de fluxo através da marcação das células com Anexina V (ligada à sonda fluorescente alofocianina – Anexina V-APC) em combinação com o IP. Esta técnica permite distinguir células viáveis de células não viáveis, e entre estas as que se encontram em apoptose, necrose e apoptose tardia versus necrose^{82,83,84}.

A apoptose é caracterizada pela alteração da distribuição assimétrica dos fosfolípidos na bicamada lipídica. A fosfatidilserina (PS), um fosfolípido de carga negativa que normalmente se localiza no folheto interno da membrana celular, é translocada para o folheto externo durante o processo apoptótico, mantendo-se contudo a integridade da membrana celular. Sendo a anexina V uma molécula com elevada afinidade para fosfolípidos de carga negativa, esta liga-se especificamente aos

resíduos de PS na presença de cálcio (Ca^{2+}), permitindo assim determinar a sua localização e fazer a distinção entre células em apoptose e células em necrose^{82,84,85,86}. Estas últimas caracterizam-se pela perda de integridade da membrana, tornando-se permeáveis ao iodeto de propídio que, ao intercalar-se nas moléculas de ADN, permite identificar os núcleos das células que se encontram em necrose. A marcação simultânea com anexina V e iodeto de propídio permite distinguir as células apoptóticas que coram para a anexina, mas não para o iodeto de propídio. As células em apoptose tardia e/ou em necrose coram para ambos os fluorocromos, enquanto, que as células viáveis não coram com nenhum dos corantes^{82,84}.

Após 24 horas de incubação com os compostos em estudo, recolheu-se 1×10^6 células tratadas e respetivos controlos correspondentes quer às células não viáveis, presentes no sobrenadante, quer às células viáveis, aderentes à superfície de crescimento. Estas últimas foram recolhidas de acordo com o procedimento descrito em 2.1.1, até à fase de inibição da tripsina, tendo-se posteriormente adicionado as células em suspensão no meio, e procedido à lavagem conjunta de toda a população, com PBS por centrifugação a 2500 rpm (1000 xg), durante 5 minutos.

Seguidamente recolheram-se 1×10^5 células que foram ressuspensas em 100 μL de tampão de ligação 1X (25 mM de CaCl_2 , 1,4 M de NaCl e 0,1 M de tampão HEPES; pH=7,4) e incubadas com 5 μL de anexina-V APC (BD Biosciences) e 2 μL de IP 3 μM (Invitrogen-Molecular Probes), permanecendo no escuro à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Por fim, as células foram ressuspensas em 400 μL de tampão de ligação 1X e imediatamente analisadas no citómetro FACSCalibur (488 e 635 nm) (Becton Dickinson), usando o *software* de aquisição *CellQuestTM* (BD Bioscience) e

deixando adquirir cerca de 10 000 eventos totais. Os resultados foram posteriormente analisados com o *software* de análise *Paint-a-GateTM* (BD Bioscience)⁵⁵.

Os resultados obtidos representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de um mínimo de dois ensaios independentes.

2.2.4 – Análise da expressão de moléculas envolvidas na morte celular por citometria de fluxo

Para analisar a expressão das proteínas BAX e BCL-2 envolvidas na morte celular por apoptose, recorreu-se à técnica de citometria de fluxo. Para o efeito, utilizaram-se anticorpos monoclonais anti-BAX e o anti-BCL-2 conjugados diretamente com ficoeritrina (PE) e isotiocianato de fluoresceína (FICT), respetivamente.

Para detetar as proteínas intracelulares, BAX e BCL-2, recolheram-se 1×10^6 células isoladas de acordo com o descrito na secção 2.1.1. e posteriormente lavadas com PBS 1X, por centrifugação a 1500 rpm (400 xg) durante 5 minutos. De seguida, as células foram permeabilizadas com 100 μ L de uma solução A (meio de fixação) (Caltag Laboratories, Invitrogen) no escuro, à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 1500 rpm (400 xg), durante 5 minutos. Em seguida, as células foram permeabilizadas com 100 μ L de uma solução B (meio de permeabilização) (Caltag Laboratories, Invitrogen) e posteriormente tratadas com os respetivos anticorpos (2 μ g de anti-BAX-PE (Santa Cruz Biotechnology) e 1 μ g de anti-BCL-2-FITC (DakoCytomation)), no escuro à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Findo o período de incubação, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 1500 rpm (400 xg), durante 5 minutos. Por

fim, as células foram ressuspensas em 0,5 mL de PBS e imediatamente analisadas no citómetro FACScalibur de acordo com o descrito na secção 2.2.3^{55,87}.

Os resultados obtidos são expressos em Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) e representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de um ensaio.

2.2.5 – Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Para confirmar os resultados de proliferação e morte celular procedeu-se à avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo. Esta técnica é possibilitada pela análise da variação da quantidade de ADN ao longo do ciclo mitótico. Os resultados traduzem-se na obtenção de um histograma no qual é possível a identificação de três grupos distintos de células, sendo, um com menor conteúdo em ADN, que corresponde ao pico G0/G1 do histograma e outro com maior conteúdo em ADN, com uma fluorescência dupla do primeiro e que corresponde às células em fase G2/M. Entre ambos, existe uma população intermédia de células correspondente às células em fase de síntese (S) (Figura 2.2)^{82,88}.

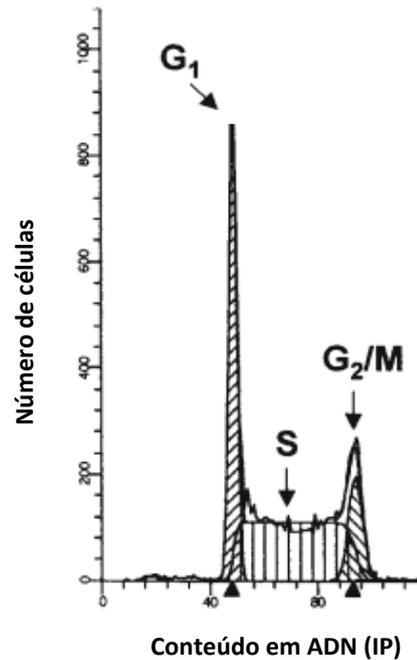


Figura 2.2 – Histograma representativo do ciclo celular. O primeiro pico corresponde a fase G₀/G₁ onde se encontram as células com menor quantidade de ADN. O segundo pico diz respeito às células em fase G₂/M, com uma fluorescência dupla do primeiro. Entre estes dois grupos existe um terceiro grupo de células, com uma quantidade de ADN intermédia, e que corresponde às células em fase de síntese (S). Adaptado de Pozarowski *et al.*⁸⁸

O conteúdo em ADN é visualizado através da marcação prévia deste com iodeto de propídio (IP)⁸². A presente técnica baseia-se na capacidade do IP se intercalar na cadeia de ADN e, quando excitado com luz de comprimento de onda de 488 nm, emitir fluorescência a 620 nm. A intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de ADN ligado, o que torna possível avaliar o seu conteúdo celular^{82,88}.

Desta forma, 1×10^6 células tratadas e respetivos controlos foram colhidas e centrifugadas a 1000 rpm (300 xg) durante 5 minutos. De seguida, após ressuspender o *pellet* no líquido residual, as células foram fixadas com 200 μ L de etanol 70% (v/v) e incubadas a -4°C, durante 20 minutos. Após este período de incubação, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 1000 rpm (300 xg), durante 5 minutos. Posteriormente, as células foram tratadas com 500 μ L de uma solução para marcação de ADN (Cytognos), contendo detergente para permeabilização celular, iodeto de

propídio e RNase, e incubadas no escuro à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Por fim, procedeu-se a análise imediata das células por citometria de fluxo, num citómetro de fluxo FACScalibur. A percentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular foi calculada utilizando um programa ModFit LT (Verity Software House).

Os resultados obtidos representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de um ensaio.

2.3. Estudos de stresse oxidativo em linhas celulares

2.3.1. Preparação de lisados celulares

Após 24 horas de incubação com os compostos em estudo, as células foram lavadas com PBS por aspiração do meio de incubação, substituição com PBS e respetiva aspiração. De seguida, as células foram destacadas da superfície aderente por raspagem, e ressuspensas em 1 mL de PBS. Posteriormente as células foram submetidas a 3 pulsos de sonicação (Bandelin Sonorex) de 10 segundos cada, com um minuto de intervalo entre cada ciclo, mantendo-as sempre em gelo.

2.3.2. Quantificação de proteína

Imediatamente após a obtenção dos lisados celulares procedeu-se à determinação da concentração de proteína através do método do ácido bicinónico (BCA), *Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit* (Sigma), de acordo com as instruções do fabricante.

Este método baseia-se na detecção da reação de redução dos íons cúpricos (Cu^{2+}) a íons cuprosos (Cu^{1+}), em meio alcalino, pelas proteínas, através da quelatação do ácido bicinconínico com íon Cu^{1+} . O produto da reação origina um composto de cor púrpura solúvel em água, com absorvância a 562 nm^{89} , que é linear com concentrações crescentes de proteína ($20 \mu\text{g/mL} - 2000 \mu\text{g/mL}$).

O método depende da construção de uma curva padrão, a partir de diferentes concentrações de proteína *standard*, a albumina sérica bovina (BSA), que se encontra 1 mg/mL . Todos os padrões e amostras são preparados num volume final de $225 \mu\text{L}$. Desta forma, a $25 \mu\text{L}$ de amostra (solução padrão e lisados celulares), adicionou-se o reagente BCA constituído por 8 partes de reagente A (solução de ácido bicinconínico) para 1 do reagente B (solução de sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a 4 %). Este ensaio foi preparado, em triplicado, numa microplaca de 96 poços. Posteriormente cobriu-se a placa com papel de prata para a proteger da luz, e incubou-se a 37°C durante 30 minutos. O método termina com a leitura da absorvância a 562 nm , no leitor de microplacas SpectraMax® Plus³⁸⁴, e com a elaboração da curva padrão e determinação da quantidade de proteína para cada uma das amostras ($\mu\text{g/mL}$).

Após a quantificação proteica, os lisados celulares foram guardados a -80°C .

2.3.3. Avaliação da atividade enzimática da redutase do glutatião

A determinação da atividade enzimática da redutase do glutatião (GI-Red) foi feita de acordo com a metodologia desenvolvida por Goldberg e Spooner (1987)⁹⁰, utilizando o glutatião oxidado (GSSG) como substrato. Este método é baseado na

capacidade desta enzima catalisar a reação de transformação do GSSG em glutatião reduzido (GSH), na presença da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH) (Equação 2.3). Para o efeito a atividade da enzima é avaliada através da quantificação do consumo de NADPH a 340 nm, num espectrofotómetro termostaticado *UVIKON 933 UV/Visible*, a 37°C.



Desta forma, a 75 µL de lisado celular, obtido de acordo com o descrito na secção 2.3.1, adicionou-se uma mistura reacional contendo 0,12 M de di-hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) (pH=7,2), 65,3 mM de GSSG e 15 mM de EDTA, perfazendo um volume final de 2175 µL. Incubou-se a mistura a 37°C durante 5 minutos e, findo esse período, adicionou-se 37,5 µL de NADPH (constituição: 9,6 mM de β-NADPH em NaHCO₃ a 1%), dando assim início a reação enzimática.

A atividade enzimática é expressa em unidades internacionais de enzima por grama de proteína (U/g prot)⁶². Os resultados obtidos representam a média mais ou menos (±) desvio padrão de um ensaio.

2.3.4. Quantificação de glutatião reduzido

A quantificação de GSH foi avaliada nas linhas celulares, a partir dos lisados obtidos de acordo com o descrito na secção 2.3.1., e realizada em simultâneo por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em fase reversa, através da utilização de um *kit* comercial (*Glutathione HPLC Kit - Immundiagnostik AG, Germany*).

Neste teste, para a determinação do GSH adicionaram-se 200 μL da solução de diluição (*DIL*) à amostra (lisado celular), ao calibrador (*CAL*) ou aos controlos (*CTRL1*, *CTRL2*). De modo a quantificar a fração reduzida, preparou-se uma mistura contendo 50 μL de lisado celular, 100 μL do tampão de reação (*REABUF*) e 100 μL da solução derivatizante (*DER*). Após uma incubação a 60°C durante 20 minutos, procedeu-se à precipitação da mistura, pela adição de 100 μL da solução de precipitação (*PREC*), a uma temperatura de 4°C durante 10 minutos. De seguida, procedeu-se a centrifugação das mesmas a 10 000 xg, durante 10 minutos. Findo esse período adicionaram-se 100 μL de sobrenadante a 100 μL de tampão de reação (*REABUF*), e injetaram-se 20 μL do preparado numa coluna de fase reversa C18 ODS-5 μm (125 x 4 mm) (*ACE*), mantida a um fluxo de 1,0 mL/minuto.

No sistema HPLC está incorporado um detetor de fluorescência para comprimento de onda de excitação e de emissão a 385 nm e 515 nm, respetivamente, que deteta o GSH. A quantificação da fração reduzida foi determinada por avaliação da altura dos picos.

Os resultados obtidos são expressos em μmol de GSH por grama de proteína ($\mu\text{mol/g prot}$) e representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de dois ensaios.

2.3.5. Avaliação da peroxidação lipídica

A lesão oxidativa dos lípidos foi avaliada nas linhas celulares, a partir dos lisados obtidos em conformidade com o descrito na secção 2.3.1., utilizando um *kit* comercial (*ClinRep® Complete Kit for Malondialdehyde in Plasma and Serum, Recipe, Germany*).

Neste teste, o malondialdeído (MDA) é separado dos restantes componentes da amostra por HPLC, equipado com uma coluna de fase reversa. O MDA foi detetado por fluorescência captada a 553 nm, após excitação a 515 nm, de acordo com as instruções do fabricante.

Para o efeito, 100 µL de amostra (branco, calibrador, controlos e lisados celulares) foram fervidas durante 60 minutos, a uma temperatura de 100°C, com 700 µL do reagente A e 200 µL do reagente B (reagente derivatizante que contém o fluorocromo). Após arrefecimento da mistura, adicionaram-se 200 µL do reagente C a 200 µL da amostra derivatizada e procedeu-se a centrifugação a 10 000 xg, durante 5 minutos. Injetaram-se 20 µL do sobrenadante centrifugado numa coluna analítica de fase reversa, mantida a um fluxo de 0,8 mL/minuto. A quantificação de MDA foi determinada por avaliação da área dos picos.

Os resultados são expressos em nmol de MDA por grama de proteína (nmol/g proteína) e representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de dois ensaios independentes.

2.3.6. Análise da produção de espécies reativas de oxigénio

A determinação da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) intracelulares foi baseada na marcação das células com as sondas fluorescentes 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma) e dihidroetidina (DHE) (Sigma) para deteção de peróxidos (H₂O₂) e anião superóxido (O₂^{•-}), respetivamente. A deteção foi efetuada por citometria de fluxo recorrendo ao equipamento já descrito anteriormente.

Os resultados foram expressos em Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) e representam a média mais ou menos (\pm) desvio padrão de dois ensaios independentes.

2.3.6.1. Determinação da produção de peróxidos intracelulares

A sonda DCFH-DA utilizada para a detecção de ROS tem a capacidade de atravessar facilmente a membrana celular sendo incorporada na região hidrofóbica da bicamada lipídica⁸². A presença de esterases intracelulares induz a desacetilação de DCFH-DA, convertendo-a em 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH), o qual é oxidado pelos peróxidos intracelulares originando o composto fluorescente 2,7-diclorofluoresceína (DCF). A fluorescência emitida, após excitação a 488 nm, é captada a 525 nm e é proporcional aos níveis intracelulares de peróxidos^{91,92}.

Neste ensaio, aproximadamente 5×10^5 células foram marcadas com 5 μ M da sonda DCFH-DA (Sigma), de acordo com adaptações aos procedimentos descritos por Rothe e Valet (1990)⁹³. Desta forma, após marcação das células com a sonda, procedeu-se à incubação durante 1 hora a 37°C, no escuro. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS por centrifugação a 1000 rpm (300 xg), durante 5 minutos. Por fim, as células foram ressuspensas em 0,5 mL de PBS e imediatamente analisadas por citometria de fluxo.

2.3.6.2. Determinação da produção de anião superóxido

A produção intracelular de anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$) foi determinada por citometria de fluxo. A DHE atravessa a membrana das células e é convertida no composto

fluorescente de cor vermelha, maioritariamente, por ação do anião $O^{2\bullet-}$. O etídio da sonda intercala-se no ADN, permanecendo no interior da célula. Uma pequena percentagem de oxidação pode ser resultante da ação de outras ROS e espécies radicalares como o H_2O_2 , o anião peroxinitrito ($ONOO^-$) ou o ácido hipocloroso ($HOCl$)^{34,83}.

Neste ensaio recolheram-se 5×10^5 células previamente lavadas com PBS, por centrifugação a 1000 rpm (300 x g) durante 5 minutos. De seguida, as células foram incubadas durante 15-30 minutos a 37°C com 5% de CO_2 , ao abrigo da luz, com uma solução de DHE preparada em DMSO, a uma concentração de 1 mM, de modo a obter uma concentração final de 5 μM . Posteriormente as células foram lavadas duas vezes com PBS por centrifugação, conforme descrito anteriormente, e ressuspensas em 0,5 mL de PBS para análise por citometria de fluxo.

2.4. Análise de dados e tratamento estatístico

A análise estatística dos resultados foi efetuada utilizando o programa Excel 2010. Para a comparação entre médias recorreu-se ao teste T-student. Para todos os testes estatísticos considerou-se o nível de significância a 95% ($p < 0,05$).

Capítulo 3 – Resultados

3.1 – Indução de stresse oxidativo como estratégia terapêutica

Para melhor compreender a ação do stresse oxidativo mediado pelo radical $\bullet\text{OH}$ na resposta celular das células de cancro da próstata, o estudo foi realizado na linha celular PC-3 representativa da doença metastizada^{71,72}. As células foram tratadas com peróxido de hidrogénio (H_2O_2), sulfato de ferro (FeSO_4) e cloreto de ferro (FeCl_3), de forma isolada e combinada, a fim de induzir a formação de $\bullet\text{OH}$.

3.1.1 – Efeito do radical hidroxilo induzido por peróxido de hidrogénio e ferro na proliferação celular

Na figura 3.1 está representado o efeito do H_2O_2 (na gama de concentrações de 10 nM a 500 μM), FeSO_4 (na gama de concentrações de 10 μM a 500 μM) e FeCl_3 (na gama de concentrações de 10 μM a 500 μM), na proliferação celular das PC-3, ao longo de 72 horas.

Os resultados obtidos pela técnica de redução da resazurina indicam que o H_2O_2 induz um efeito anti-proliferativo mais acentuado, comparativamente ao FeSO_4 e ao FeCl_3 para as concentrações testadas dos compostos. Este efeito é dependente da concentração e do tempo de exposição. Nestas células o IC_{50} (concentração para a qual se observa 50% de inibição da proliferação celular) é atingido às 24 horas de incubação para as concentrações de 250 e 500 μM . A taxa de inibição da proliferação mantém-se sempre próxima de 50%, o que sugere a capacidade de adaptação das células PC-3 a concentrações elevadas de H_2O_2 .

Nas células tratadas com FeSO_4 , observa-se uma redução de cerca de 20% da proliferação para concentração de 500 μM , após 24 horas de incubação. Já nas células tratadas com FeCl_3 , observa-se uma redução de cerca de 10% da proliferação para concentração de 500 μM , após 24 horas de incubação. Desta forma os resultados indicam que o FeSO_4 e o FeCl_3 induzem um efeito anti-proliferativo pouco acentuado nas células de metástase para as concentrações testadas.

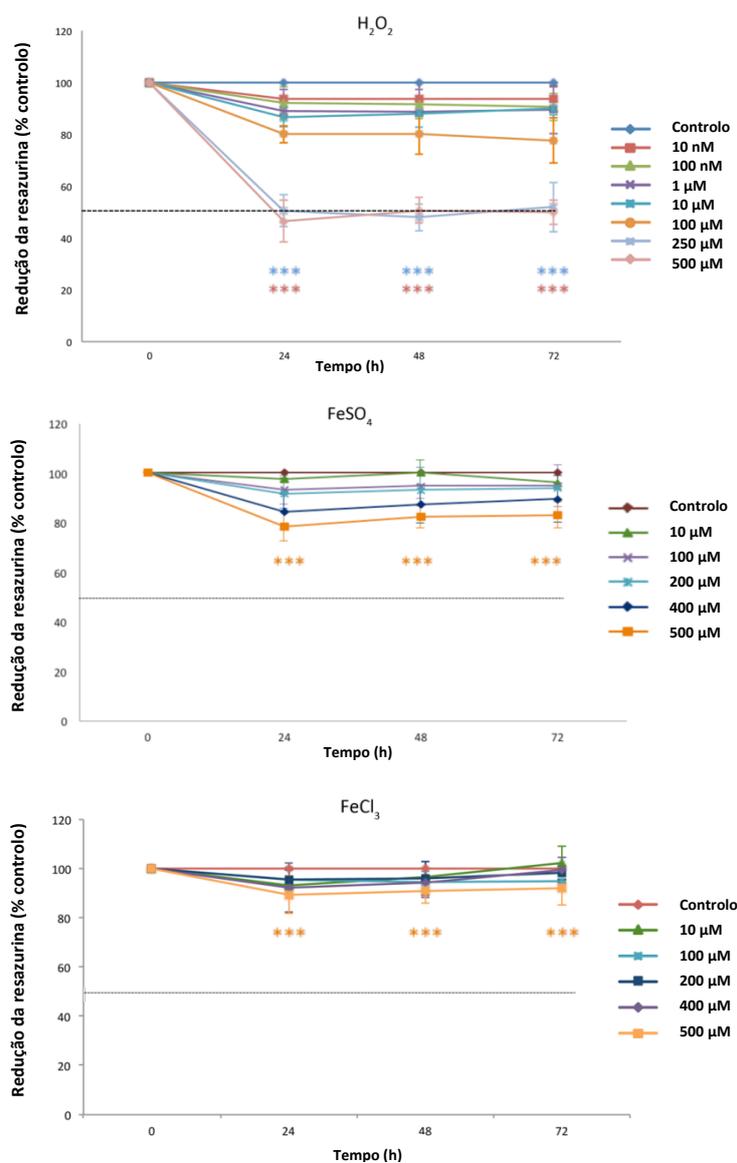


Figura 3.1 – Curvas dose-resposta - Efeito de peróxido de hidrogénio (H_2O_2), sulfato de ferro (FeSO_4) e cloreto de ferro (FeCl_3) na proliferação das células. A linha celular PC-3 foi incubada com uma densidade de $0,1 \times 10^6$ células/mL, durante 72 horas, na ausência e na presença de H_2O_2 (na gama de concentrações de 10 nM a 500 μM), FeSO_4 (na gama de concentrações de 10 μM a 500 μM) e FeCl_3 (na gama de concentrações de 10 μM a 500 μM). A proliferação celular foi avaliada, em intervalos de 24 horas, por espectrofotometria através do ensaio colorimétrico de oxidação-redução da resazurina (comercialmente designado por alamarBlue®), como descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados são expressos em percentagem de redução da resazurina por comparação com o controlo (células não tratadas) e representam a média \pm desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas são consideradas para $^{***}p < 0,001$ relativamente ao controlo.

A combinação de H_2O_2 (250 μM e 500 μM) e de FeSO_4 (500 μM) representa o efeito do $\bullet\text{OH}$ na proliferação celular (Figura 3.2). Após 24 horas de incubação observa-se, uma inibição da proliferação celular correspondente a 57,8% para a combinação de 250 μM de H_2O_2 com 500 μM de FeSO_4 (Figura 3.2 A) comparativamente ao controlo (células não tratadas). Observa-se ainda uma inibição de cerca de 16% relativamente ao efeito do peróxido e de 46,0% relativamente ao efeito do FeSO_4 isoladamente. Por seu lado, a combinação de 500 μM de H_2O_2 com 500 μM de FeSO_4 (Figura 3.2 B), após 24 horas de incubação, resultou numa inibição da proliferação celular correspondente a 63,5% comparativamente ao controlo, 21,5% relativamente ao efeito de H_2O_2 e de 53,4% relativamente ao efeito do FeSO_4 . Pelo exposto, a combinação dos compostos, nas concentrações mencionadas, resultou num efeito inibitório da proliferação celular superior ao efeito isolado de cada um dos compostos.

Na figura 3.3 está representado o efeito de H_2O_2 em combinação com o FeCl_3 de forma a obter o efeito de $\bullet\text{OH}$ na proliferação celular. A combinação de 250 μM de H_2O_2 com 500 μM de FeCl_3 (Figura 3.3 A), após 24 horas de incubação, resultou na inibição da proliferação celular correspondente a 56,7% comparativamente ao controlo, 14,1% comparativamente às células tratadas com H_2O_2 e de 51,5% comparativamente ao efeito de FeCl_3 . Por seu lado, a combinação de 500 μM de H_2O_2 com 500 μM de FeCl_3 (Figura 3.3 B), após 24 horas de incubação, resultou na inibição da proliferação celular correspondente a 63,9% comparativamente ao controlo, de 22,3% comparativamente ao H_2O_2 e de 59,6% comparativamente ao FeCl_3 . Pelo exposto a combinação dos compostos, nas concentrações mencionadas, induziu um efeito sinérgico inibidor da proliferação celular superior ao efeito isolado de cada um dos compostos.

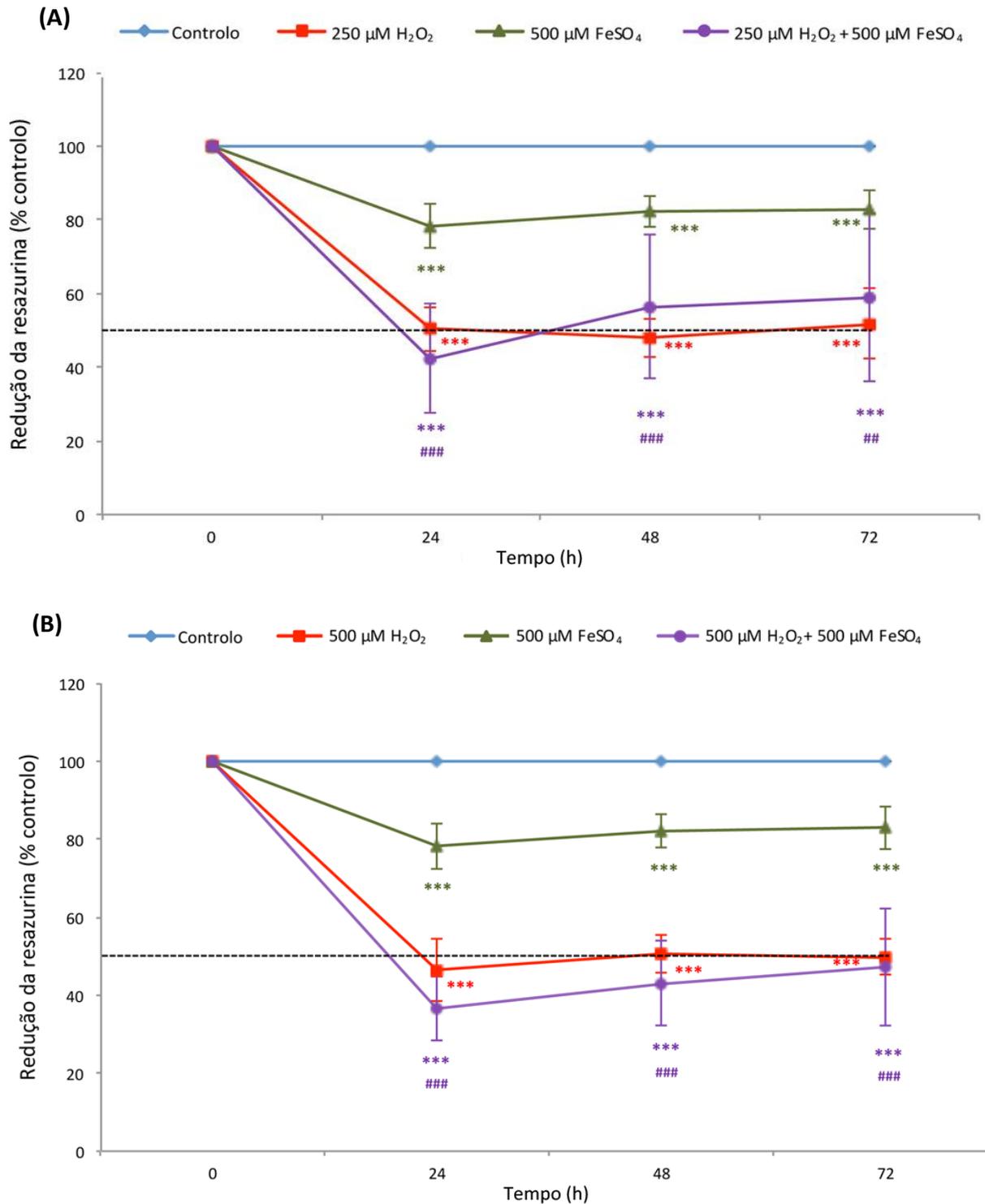


Figura 3.2 – Efeito de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em combinação com o sulfato de ferro (FeSO₄) na proliferação das células – curvas dose-resposta. A linha celular PC-3 foi incubada com uma densidade de 0,1 x 10⁶ células/mL, durante 72 horas, na ausência e na presença de H₂O₂ (250 e 500 μM) e FeSO₄ (500 μM). A proliferação celular foi avaliada, em intervalos de 24 horas, por espectrofotometria através do ensaio colorimétrico de oxidação-redução da resazurina (comercialmente designado por alamarBlue®), como descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados são expressos em percentagem de redução da resazurina por comparação com o controlo (células não tratadas) e representam a média ± desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas encontradas na proliferação são consideradas para ***p<0,001 relativamente ao controlo e ##p<0,01 e ###p<0,001 relativamente ao efeito isolado de FeSO₄ (500 μM).

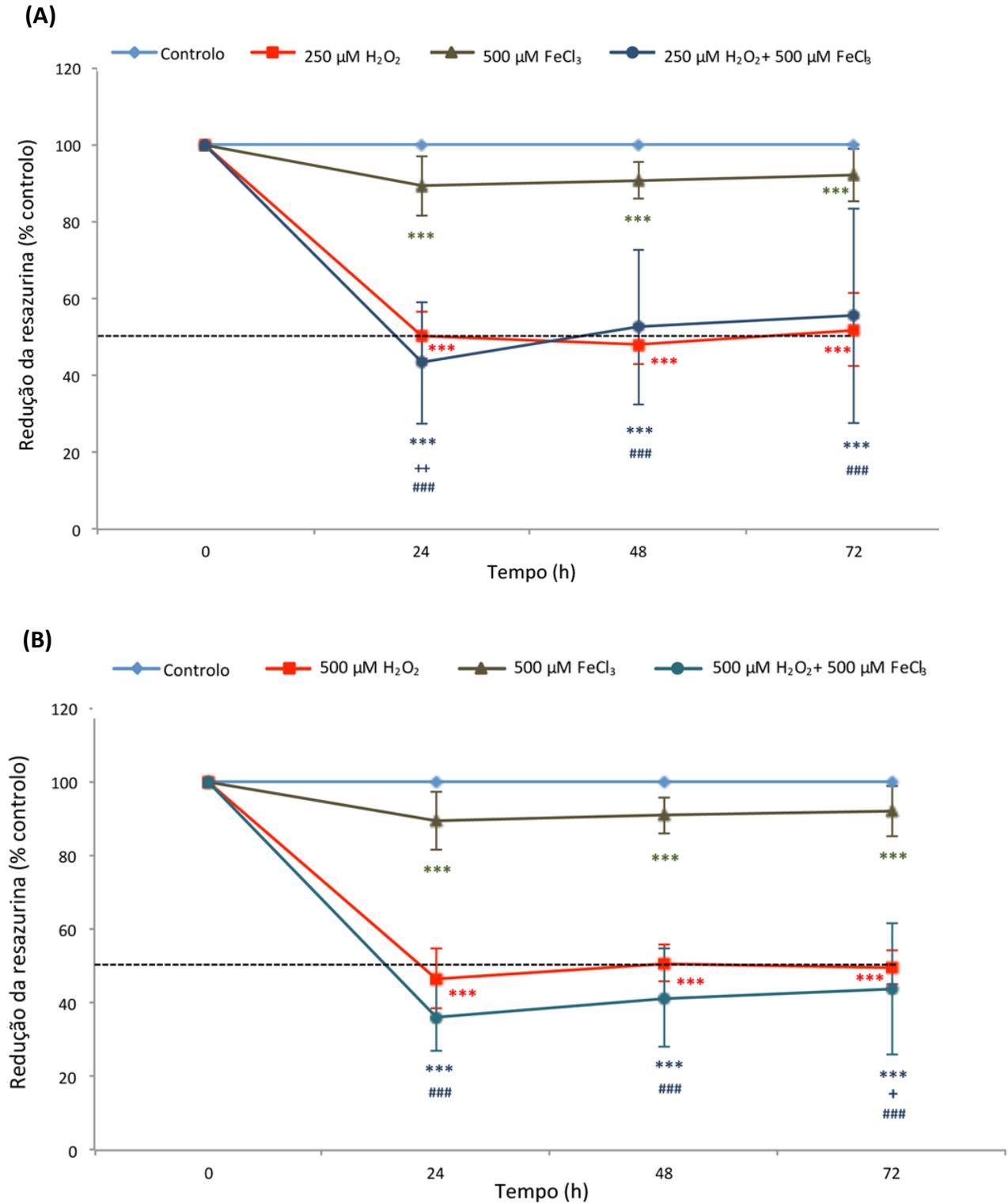


Figura 3.3 – Efeito de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em combinação com o cloreto de ferro (FeCl₃) na proliferação das células – curvas dose-resposta. A linha celular PC-3 foi incubada com uma densidade de 0,1 x 10⁶ células/mL, durante 72 horas, na ausência e na presença de H₂O₂ (250 e 500 μM) e FeCl₃ (500 μM). A proliferação celular foi avaliada, em intervalos de 24 horas, por espectrofotometria através do ensaio colorimétrico de oxidação-redução da resazurina (comercialmente designado por alamarBlue®), como descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados são expressos em percentagem de redução da resazurina por comparação com o controlo (células não tratadas) e representam a média ± desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas encontradas na proliferação são consideradas para ***p<0,001 relativamente ao controlo, **p<0,01 relativamente ao efeito isolado de H₂O₂ (250 μM), *p<0,05 relativamente ao efeito isolado de H₂O₂ (500 μM) e ###p<0,001 relativamente ao efeito isolado de FeCl₃ (500 μM).

Os estudos de proliferação celular foram complementados com a análise do ciclo celular. Os resultados estão evidenciados na tabela III.1.

Como se pode verificar nesta tabela, o tratamento com H_2O_2 nas concentrações de 250 e 500 μM induz bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1 observando-se aumento da percentagem de células nesta fase comparativamente ao controlo ((57,73% vs 49,76% para 250 μM de H_2O_2) e (61,86% vs 49,76% para 500 μM de H_2O_2)). Por seu lado, os compostos $FeSO_4$ e $FeCl_3$ pouco interferem no bloqueio do ciclo celular, o que está de acordo com um efeito reduzido na inibição da proliferação celular. No entanto, o efeito combinado de H_2O_2 com ferro resultou no aumento da percentagem de células na fase G0/G1, comparativamente ao controlo e ao efeito isolado de cada um dos compostos. Desta forma as combinações de 250 μM de H_2O_2 com 500 μM de $FeSO_4$ e 500 μM de H_2O_2 com 500 μM de $FeSO_4$ resultou no aumento da percentagem das células na fase G0/G1 (63,72% vs 49,76%) e (64,31% vs 49,76%), respetivamente. A combinação de 250 μM de H_2O_2 com 500 μM de $FeCl_3$ e 500 μM de H_2O_2 com 500 μM de $FeCl_3$ resultou no aumento da percentagem das células na fase G0/G1 (60,10% vs 49,76%) e (54,32% vs 49,76%), respetivamente.

Tabela III.1 – Efeito de peróxido de hidrogénio (H_2O_2), sulfato de ferro ($FeSO_4$) e cloreto de ferro ($FeCl_3$), de forma isolada e combinada, no ciclo celular das células PC-3.

Ciclo celular (%)	G0/G1	G2/M	S
Controlo	49,76	4,76	45,47
250 μM H_2O_2	57,73	6,54	35,74
500 μM $FeSO_4$	49,30	1,81	48,89
250 μM H_2O_2 + 500 μM $FeSO_4$	63,72	4,96	31,31
Controlo	49,76	4,76	45,47
500 μM H_2O_2	61,86	4,46	33,69
500 μM $FeSO_4$	49,30	1,81	48,89
500 μM H_2O_2 + 500 μM $FeSO_4$	64,31	5,87	29,83
Controlo	49,76	4,76	45,47
250 μM H_2O_2	57,73	6,54	35,74
500 μM $FeCl_3$	49,27	2,31	48,43
250 μM H_2O_2 + 500 μM $FeCl_3$	60,10	11,69	28,22
Controlo	49,76	4,76	45,47
500 μM H_2O_2	61,86	4,46	33,69
500 μM $FeCl_3$	49,27	2,31	48,43
500 μM H_2O_2 + 500 μM $FeCl_3$	54,32	12,16	33,53

3.1.2 – Efeito do radical hidroxilo induzido por peróxido de hidrogénio e ferro na viabilidade e morte celular

Para além de avaliar o efeito anti-proliferativo resultante da combinação do H_2O_2 com o FeSO_4 ou FeCl_3 , também foi avaliado o efeito na morte celular, por citometria de fluxo, recorrendo à marcação das células com Anexina V/Iodeto de propídio, de acordo com o descrito nos materiais e métodos. As células foram incubadas ao longo de 24 horas, com os três compostos como referido.

Os resultados evidenciados nas figuras 3.4 e 3.5 indicam que as células PC-3, em condições basais, têm uma viabilidade elevada (cerca de 92%). Na presença de $500 \mu\text{M}$ de FeSO_4 e FeCl_3 não se observou uma variação significativa na morte celular (Figura 3.4 e 3.5). Na presença de H_2O_2 observou-se uma ligeira diminuição da viabilidade celular (Figura 3.4 e 3.5). No entanto a combinação dos compostos induziu aumento significativo de morte, a qual ocorreu maioritariamente por necrose (13,6% vs 4,8%) e (10,9% vs 4,8%) na presença de 250 e $500 \mu\text{M}$ de H_2O_2 , respetivamente. Neste estudo também se observou aumento significativo da morte celular por apoptose em resultado da combinação dos compostos, sobretudo na presença de FeCl_3 e $250 \mu\text{M}$ de H_2O_2 (Figura 3.5 A).

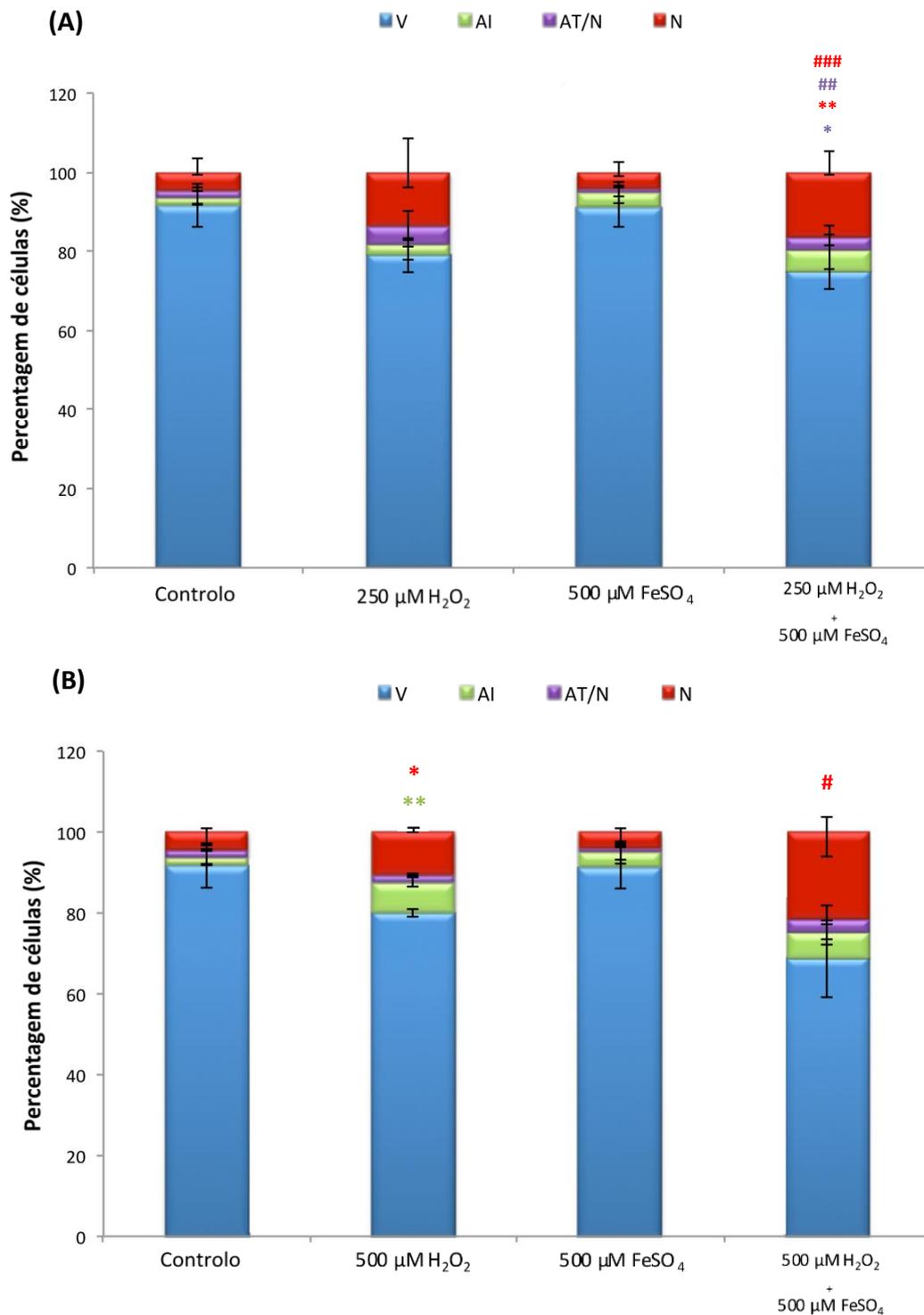


Figura 3.4 – Efeito do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em combinação com o sulfato de ferro (FeSO_4) na viabilidade e morte celular das células PC-3. Os estudos foram realizados nas células tratadas com H_2O_2 (250 e 500 μM) e FeSO_4 (500 μM), de forma isolada ou combinada e nas células não tratadas (controlo), após 24 horas de incubação com os compostos. A viabilidade celular foi analisada por citometria de fluxo através da marcação das células com Anexina V em combinação com o iodeto de propídio, de acordo com o descrito nos materiais e métodos. Legenda de cores: azul - células viáveis, verde - células em apoptose inicial, roxo - células em apoptose tardia vs necrose e vermelho - células em necrose. Os resultados são expressos em percentagem (%) e representam a média \pm desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas encontradas na apoptose inicial são consideradas para $^{**}p < 0,01$ relativamente ao controlo. As diferenças significativas encontradas na apoptose tardia vs necrose são consideradas para $^*p < 0,05$ relativamente ao controlo e $^{##}p < 0,01$ relativamente ao efeito isolado de FeSO_4 (500 μM). As diferenças significativas encontradas na necrose são consideradas para $^*p < 0,05$ e $^{**}p < 0,01$ relativamente ao controlo e $^{\#}p < 0,05$ e $^{###}p < 0,001$ relativamente ao efeito isolado de FeSO_4 (500 μM).

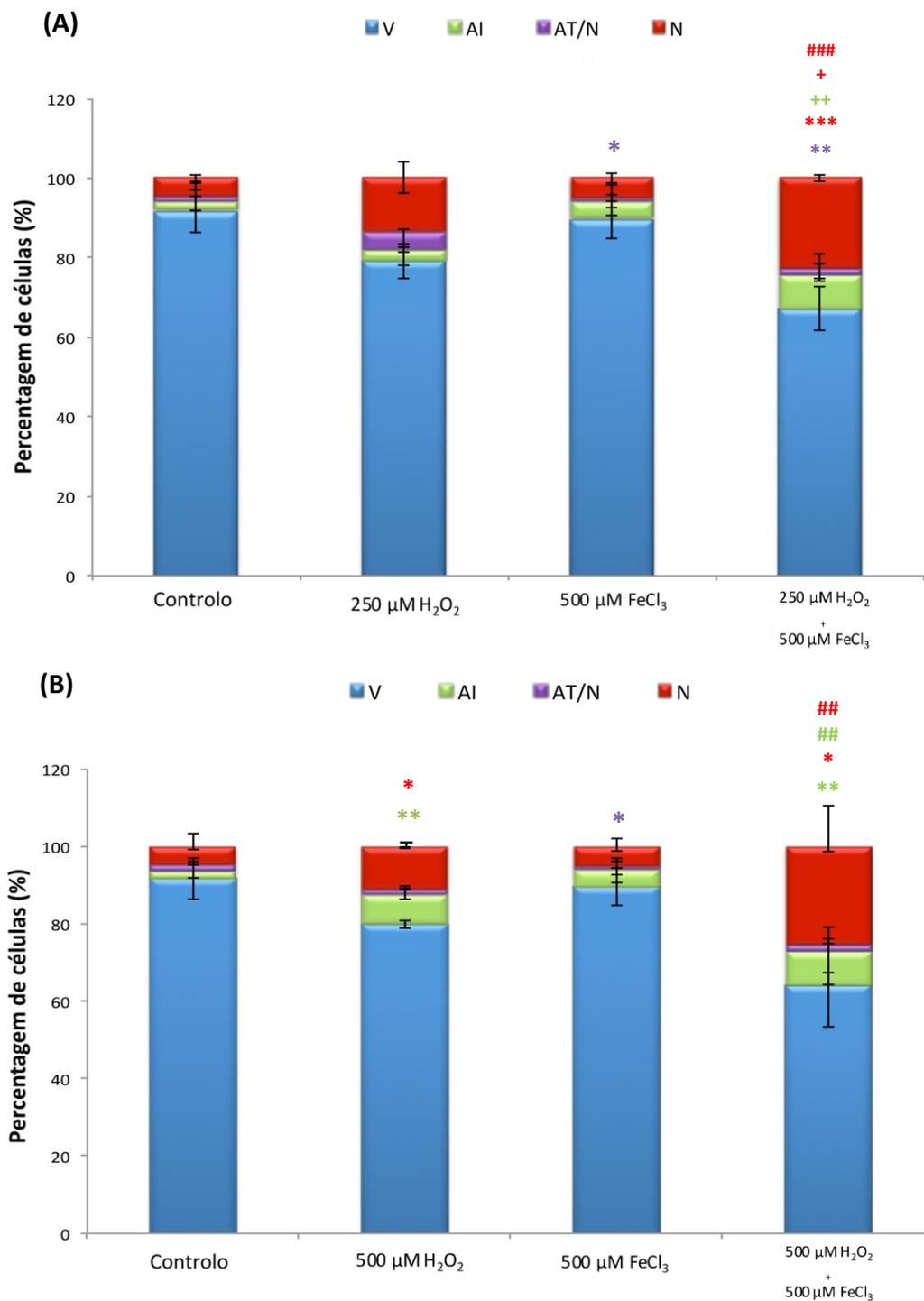


Figura 3.5 – Efeito do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em combinação com o cloreto de ferro (FeCl₃) na viabilidade e morte celular das células PC-3. Os estudos foram realizados nas células tratadas com H₂O₂ (250 e 500 μM) e FeCl₃ (500 μM), de forma isolada ou combinada e nas células não tratadas (controlo), após 24 horas de incubação com os compostos. A viabilidade celular foi analisada por citometria de fluxo através da marcação das células com Anexina V em combinação com o iodeto de propídio, de acordo com o descrito nos materiais e métodos. Legenda de cores: azul - células viáveis, verde - células em apoptose inicial, roxo - células em apoptose tardia vs necrose e vermelho - células em necrose. Os resultados são expressos em percentagem (%) e representam a média ± desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes. As diferenças significativas encontradas na apoptose inicial são consideradas para **p<0,01 relativamente ao controlo, **p<0,01 relativamente ao efeito isolado de H₂O₂ (250 μM) e ###p<0,01 relativamente ao efeito isolado de FeCl₃ (500 μM). As diferenças significativas encontradas na apoptose tardia vs necrose são consideradas para *p<0,05 e **p<0,01 relativamente ao controlo. As diferenças significativas encontradas na necrose são consideradas para *p<0,05 e ***p<0,001 relativamente ao controlo e ##p<0,01 e ###p<0,001 relativamente ao efeito isolado de FeCl₃ (500 μM).

O mecanismo de morte celular, por apoptose, envolve a participação de diversas proteínas, nomeadamente a BAX ou a BCL-2. As proteínas BCL-2 e BAX pertencem à família das proteínas BCL-2 e desempenham uma função anti e pró-apoptótico, respetivamente⁹⁴. Para analisar a participação das referidas proteínas na morte celular induzida pelo H₂O₂ e deste em associação com FeSO₄ ou FeCl₃, procedeu-se ao tratamento das células com os compostos, ao longo de 24 horas, de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. Posteriormente marcaram-se as células PC-3 com anticorpos monoclonais, para análise por citometria de fluxo.

Em resultado da combinação dos compostos, observa-se aumento da razão BAX/BCL-2, o que está de acordo com o aumento significativo de apoptose (Figura 3.6 A e B).

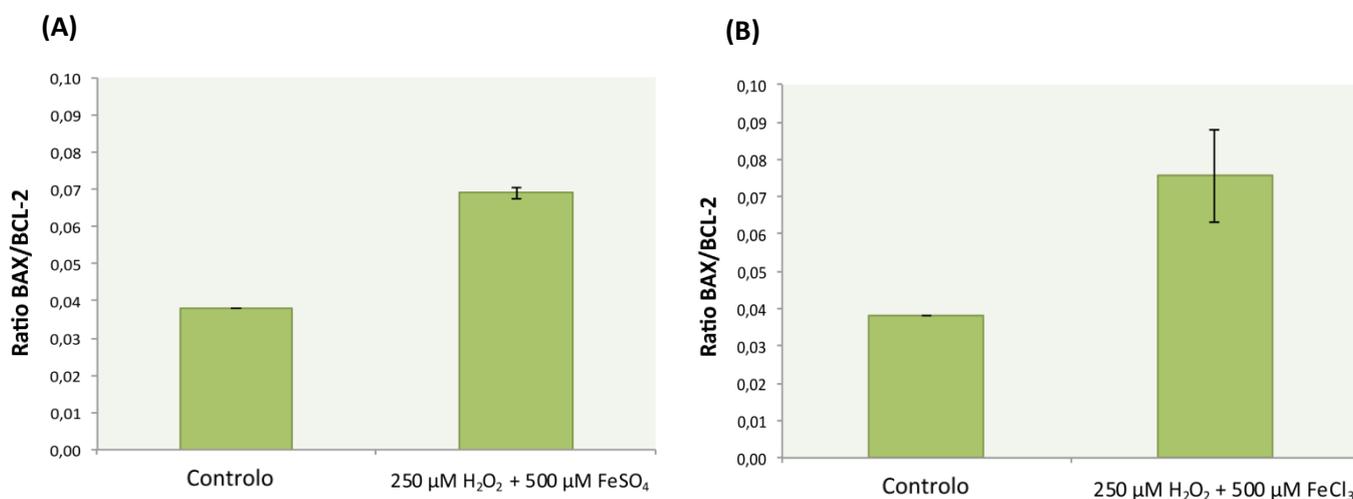


Figura 3.6 - Efeito do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em combinação com o sulfato de ferro (FeSO₄) ou cloreto de ferro (FeCl₃) na razão BAX/BCL-2 das células PC-3. Os estudos foram realizados nas células tratadas com H₂O₂ (250 μM), FeSO₄ e FeCl₃ (500 μM), de forma isolada e em associação e nas células não tratadas (controlo), após 24 horas de incubação. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais marcados com sondas fluorescentes, como descrito nos materiais e métodos, para posterior análise por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média ± desvio padrão de um ensaio.

3.1.3 – Efeito da indução de •OH no stresse oxidativo

3.1.3.1 – Avaliação da produção de peróxidos intracelulares

Para avaliar o efeito de •OH induzido pela combinação do H_2O_2 com o $FeSO_4$ ou $FeCl_3$ no stresse oxidativo, determinou-se a produção de peróxidos intracelulares por citometria de fluxo recorrendo à sonda 2',7' - diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), de acordo com o descrito nos materiais e métodos. Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) (Figura 3.7).

Nesta figura observa-se uma tendência para a diminuição da produção de peróxidos na presença de 250 μM de H_2O_2 com $FeCl_3$ (Figura 3.7 C) (931 vs 1291 MIF) e uma diminuição significativa para 500 μM de H_2O_2 com $FeCl_3$ (Figura 3.7 D) (285 vs 1291 MIF), relativamente ao controlo, o que poderá refletir a conversão de H_2O_2 em •OH e que está de acordo com os estudos de morte. No entanto, da combinação de peróxido com $FeSO_4$ não resultam variações significativas na produção de peróxidos.

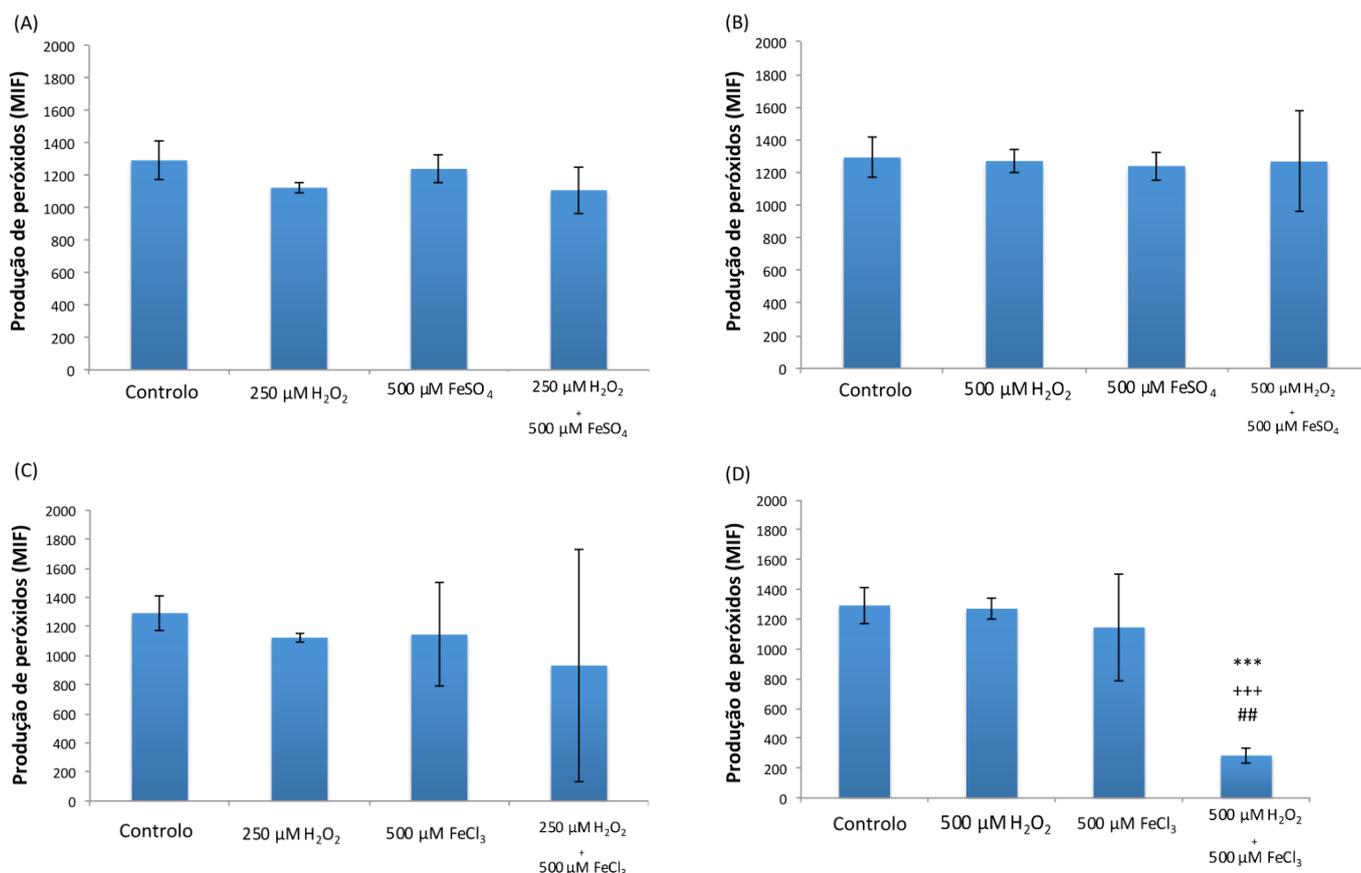


Figura 3.7 - Efeito do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em combinação com o sulfato de ferro (FeSO₄) ou cloreto de ferro (FeCl₃) na produção de peróxidos (ROS) das células PC-3. Os estudos foram realizados nas células tratadas com H₂O₂ (250 e 500 μM), FeSO₄ e FeCl₃ (500 μM), de forma isolada e em associação e nas células não tratadas (controlo), após 24 horas de incubação. A avaliação de peróxidos foi analisada por citometria de fluxo, após marcação das células com a sonda DCFH-DA. Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média ± desvio padrão de dois ensaios independentes. As diferenças significativas são consideradas para *** p<0,01 relativamente ao controlo; para *** p<0,001 relativamente ao H₂O₂ (500 μM) e para ## p<0,01 relativamente ao FeCl₃ (500 μM).

3.1.3.2 – Avaliação da produção de anião superóxido

Para avaliar o efeito de •OH induzido pela combinação do H₂O₂ com o FeSO₄ ou FeCl₃ no stresse oxidativo, determinou-se a produção de anião O₂^{•-} por citometria de fluxo, recorrendo à sonda dihidroetidina (DHE), de acordo com o descrito nos materiais e métodos. Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) (Figura 3.8).

Como se pode observar, este anião está significativamente aumentado em resultado da combinação de 250 μM de H_2O_2 com FeSO_4 (86 vs 46 MIF) (Figura 3.8 A) e de 250 μM de H_2O_2 com FeCl_3 (97 vs 46 MIF) (Figura 3.8 C). Contudo, para as células tratadas com a combinação de 500 μM de H_2O_2 com FeSO_4 (44 vs 46 MIF) (Figura 3.8 B) e com 500 μM de H_2O_2 com FeCl_3 (29 vs 46 MIF) (Figura 3.8 D), este anião está significativamente diminuído. Esta situação poderá estar relacionada com o aumento da produção intracelular de peróxidos, uma vez que o anião superóxido é convertido em H_2O_2 por ação da enzima Mn-SOD.

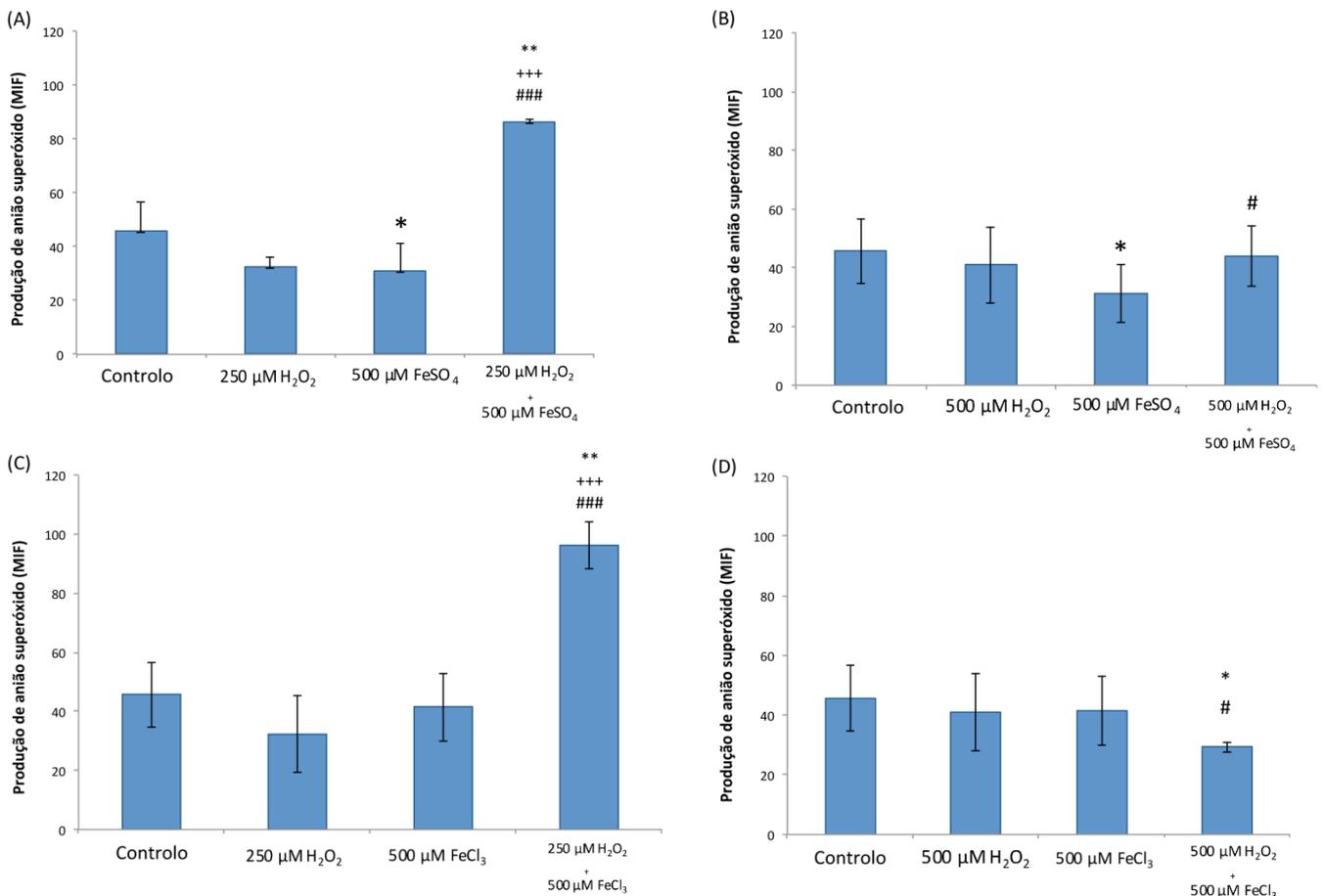


Figura 3.8 - Efeito do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em combinação com o sulfato de ferro (FeSO_4) ou cloreto de ferro (FeCl_3) na produção do anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) nas células PC-3. Os estudos foram realizados nas células tratadas com H_2O_2 (250 e 500 μM), FeSO_4 e FeCl_3 (500 μM), de forma isolada e em associação e nas células não tratadas (controlo), após 24 horas de incubação. A avaliação de $\text{O}_2^{\cdot-}$ foi analisada por citometria de fluxo, após marcação das células com a sonda DHE. Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média \pm desvio padrão de um mínimo de dois ensaios independentes. As diferenças significativas são consideradas para * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ relativamente ao controlo; para * $p < 0,05$ relativamente a H_2O_2 (250 μM), para # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ relativamente ao FeSO_4 (500 μM) e para # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ relativamente FeCl_3 (500 μM).

3.1.3.3 – Avaliação da peroxidação lipídica

Para avaliar o efeito de $\bullet\text{OH}$ induzido pela combinação do H_2O_2 com o FeSO_4 ou FeCl_3 na lesão oxidativa, determinou-se a produção de malondialdeído (MDA) por HPLC, de acordo com o descrito nos materiais e métodos.

Os resultados evidenciam tendência para aumento de MDA (Figura 3.9) nas células tratadas com H_2O_2 em combinação com FeSO_4 ou FeCl_3 , ou mesmo aumento significativo como se observa para a condição de $250\ \mu\text{M}$ de H_2O_2 com FeCl_3 relativamente ao controlo, o que está de acordo com os resultados anteriores.

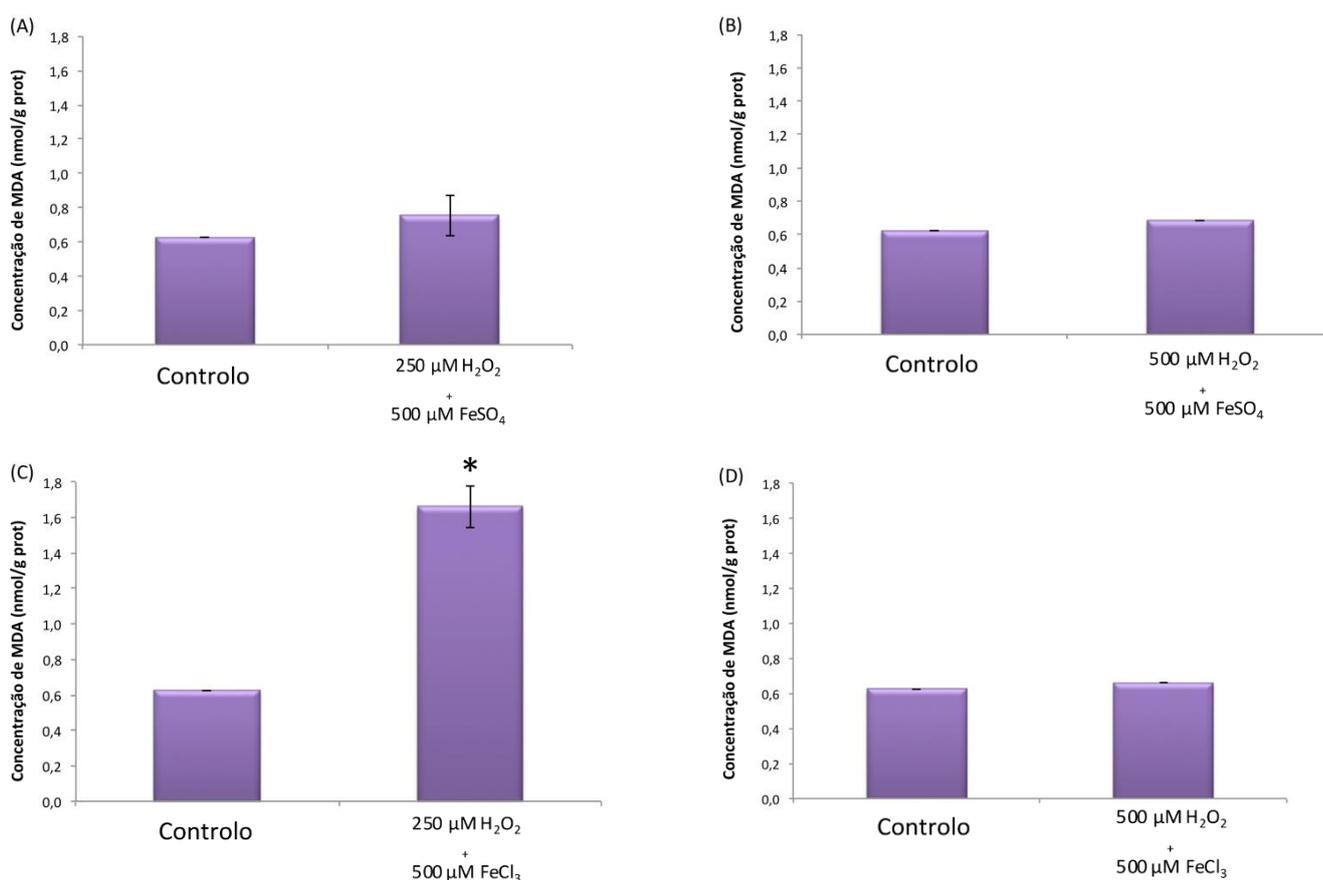


Figura 3.9 - Efeito do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em combinação com o sulfato de ferro (FeSO_4) ou cloreto de ferro (FeCl_3) na peroxidação lipídica da linha celular PC-3. Os estudos foram realizados nas células tratadas com H_2O_2 (250 e 500 μM), FeSO_4 e FeCl_3 (500 μM), de forma isolada e em associação e nas células não tratadas (controlo), após 24 horas de incubação. A peroxidação lipídica foi avaliada pela determinação da produção de malondialdeído (MDA) e, a sua quantificação foi efetuada de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados são expressos em nmol de MDA por grama de proteína (nmol/g proteína) e representam a média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes. As diferenças significativas são consideradas para * $p < 0,05$ relativamente ao controlo.

3.1.3.4 – Análise das defesas antioxidantes

No sentido de avaliar a contribuição do sistema antioxidante na resposta ao aumento de ROS, foi determinado o conteúdo em glutatião reduzido (GSH), bem como a atividade da redutase do glutatião (G1-Red), na linha celular PC-3.

Nos resultados apresentados, observa-se um aumento significativo da concentração de GSH (Figura 3.10), nas células tratadas com 500 μ M de H_2O_2 , $FeSO_4$ e $FeCl_3$, de forma isolada e em combinação. É de notar que o aumento das defesas é significativamente superior nas células tratadas com os compostos isoladamente, comparativamente ao observado nas células tratadas com ambos os compostos. Simultaneamente, esta observação reflete a capacidade das células de se adaptarem ao stresse oxidativo induzido pelos compostos de forma isolada, mas não ao induzido pela sua combinação. No entanto não se observam variações na atividade da G1-Red (Figura 3.11).

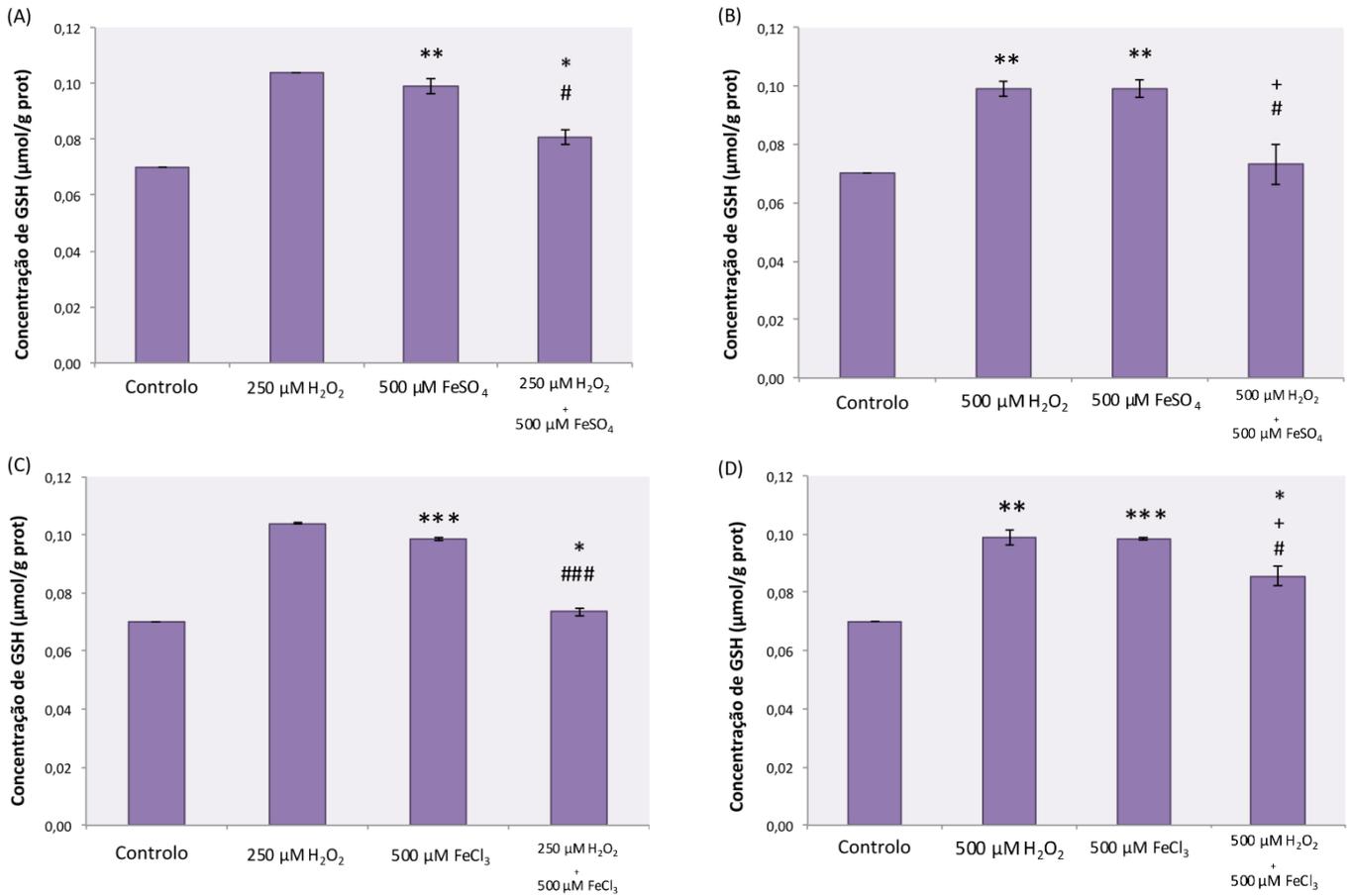


Figura 3.10 - Efeito do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em combinação com o sulfato de ferro (FeSO₄) ou cloreto de ferro (FeCl₃) no teor de GSH. Os estudos foram realizados nas células tratadas com H₂O₂ (250 e 500 µM), FeSO₄ e FeCl₃ (500 µM), de forma isolada e em associação e nas células não tratadas (controlo), após 24 horas de incubação. A determinação de GSH foi efetuada de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados obtidos são expressos em µmol de GSH por grama de proteína (µmol/g prot) e representam a média mais ou menos (±) desvio padrão de dois ensaios. As diferenças significativas são consideradas para * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 relativamente ao controlo; para + p<0,05 relativamente a H₂O₂ (500 µM); para # p<0,05 relativamente ao FeSO₄ (500 µM) e para # p<0,05 e ### p<0,001 relativamente FeCl₃ (500 µM).

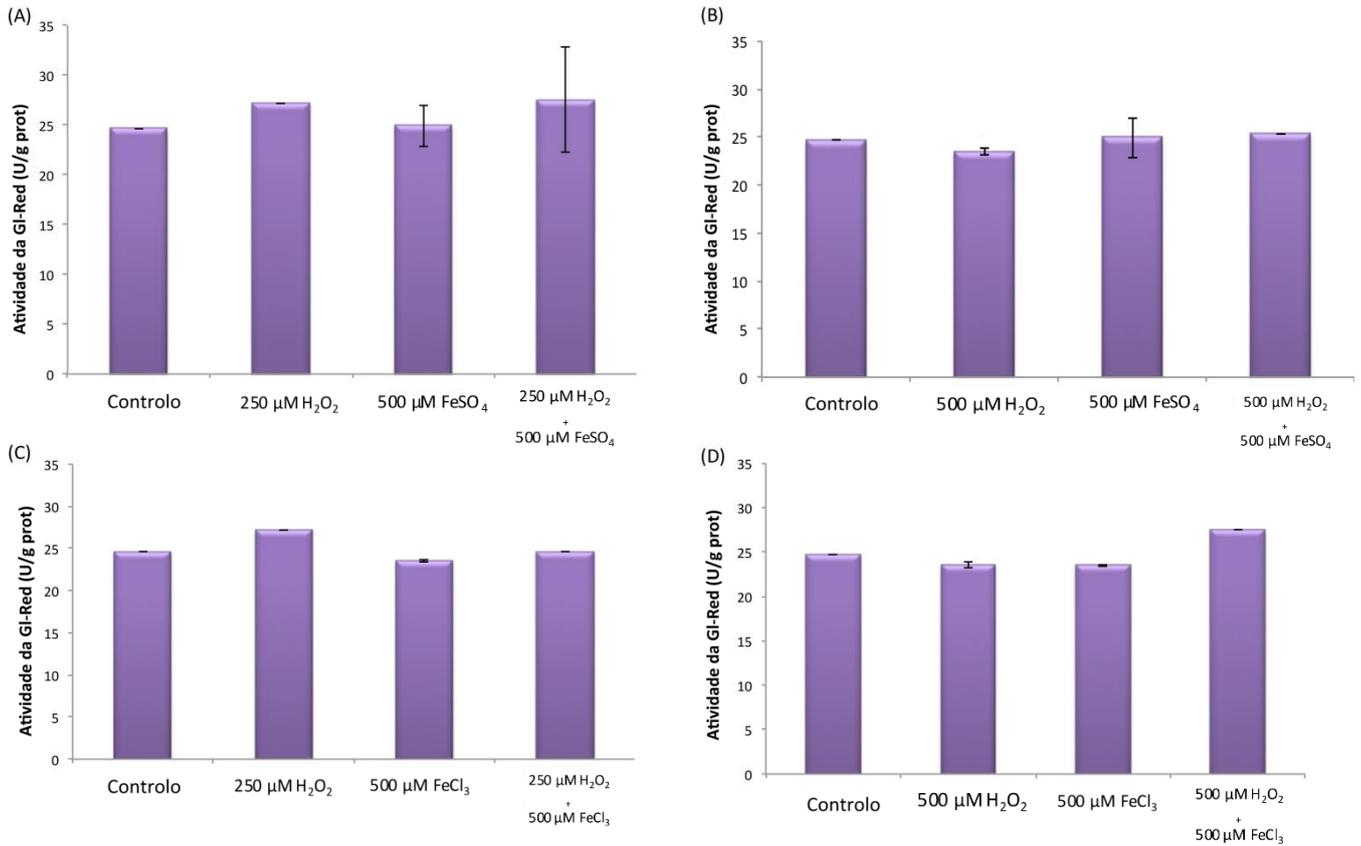


Figura 3.11 - Efeito do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em combinação com o sulfato de ferro (FeSO₄) ou cloreto de ferro (FeCl₃) na atividade da redutase do glutatião (GI-Rx). Os estudos foram realizados nas células tratadas com H₂O₂ (250 e 500 μM), FeSO₄ e FeCl₃ (500 μM), de forma isolada e em associação e nas células não tratadas (controlo), após 24 horas de incubação. A determinação de GI-Rx foi efetuada de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. A atividade enzimática é expressa em unidades internacionais de enzima por grama de proteína (U/g prot). Os resultados obtidos representam a média mais ou menos (±) desvio padrão de um ensaio. As diferenças significativas são consideradas para *p<0,05 e **p<0,01 relativamente ao controlo.

Capítulo 4 – Discussão

4 – Discussão

Apesar dos avanços científicos e clínicos, ainda não existe uma terapêutica eficaz para o tratamento do cancro da próstata metastizado⁵⁵. A terapêutica convencional privilegia a recessão do tumor, a hormonoterapia, a radioterapia (braquiterapia) e a quimioterapia com o docetaxel. A fase precoce de cancro da próstata é geralmente dependente de androgénios, sendo a terapêutica hormonal, com privação androgénica ou inibidora dos recetores dos androgénios, uma estratégia inicialmente eficaz. No entanto, a progressão do cancro para estádios avançados, é acompanhada de uma dessensibilização das células cancerígenas a esta estratégia terapêutica, concomitantemente com a evolução para o cancro da próstata hormono-refratário (HRPC)^{55,95}. Alguns estudos sugerem que alterações genéticas e funcionais do recetor do androgénio (AR) podem influenciar o crescimento celular descontrolado e a resistência à apoptose em doentes com cancro da próstata contribuindo para a resistência hormonal^{96,97}. A dificuldade de controlo da doença metastizada observa-se também no tratamento com quimioterapia em que o docetaxel é o fármaco de eleição. Este composto pertence à família dos taxanos, e atua através da sua ligação à subunidade IV da tubulina, induzindo desta forma a estabilização de microtúbulos, o que resulta no atraso do ciclo celular na fase G2/M, inibição da mitose e indução da apoptose^{58,98,99}. Assim, os tratamentos convencionais, como a quimioterapia, a radioterapia e o tratamento hormonal falham em eliminar o cancro da próstata avançado devido ao desenvolvimento de resistência por parte das células metastizadas^{57,58,60}. O desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o tratamento do cancro da próstata requer uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes

à resistência celular. Vários estudos têm proposto a modulação de stresse oxidativo, com indução deste, como uma estratégia terapêutica do cancro da próstata^{62,100}. Inclusivamente, a radioterapia é uma técnica usada no tratamento desta neoplasia, tendo por objetivo a indução de níveis elevados de ROS sobre as células neoplásicas, com conseqüente lesão oxidativa e morte celular⁵³.

Alguns autores justificam a resistência à radioterapia com base na capacidade de adaptação do sistema antioxidante das células neoplásicas, para o qual poderá contribuir o aumento do glutatião GSH^{57,58,59,60}. O GSH, uma defesa antioxidante não enzimática, é considerado o tiol *major* do sistema antioxidante dos mamíferos, sendo responsável pela manutenção de um potencial *redox* ótimo, em parte através da inativação de H₂O₂. A contribuição da GSH e da Gl-Red na proteção das células PC-3 contra as ROS foi também defendida por Lim e colaboradores (2005)⁶¹. Os autores desse estudo compararam as células PC-3 com outra linha celular representativa de metástase de cancro da próstata, as células LNCaP, e verificaram que as células PC-3 tinham níveis inferiores de ROS. Tal facto foi fundamentado pela presença de um maior conteúdo celular em GSH, bem como pelo aumento da atividade da Gl-Red, da redutase de tioredoxina (TRxr) e da glutathione-S-transferase (GST). Pelo contrário, Kumar e colaboradores (2008)¹⁰³ contrariam estes resultados demonstrando que as células PC-3 apresentavam níveis superiores de ROS, comparativamente às células LNCaP. Além disso, verificaram que a atividade da Gl-Red nas células PC-3 é da mesma ordem de grandeza dos valores determinados por Jung e colaboradores (1997)¹⁰⁴ para as mesmas células. Estes autores também descreveram um aumento da atividade da Gl-Red e diminuição das atividades da GST e Gl-Px em células de metástase de cancro da próstata (PC-3, LNCaP e DU145) comparativamente a células de culturas primárias

de origem benigna e maligna, de tecido prostático. Jung e colaboradores (1997)¹⁰⁴ também detetaram aumento da atividade da Gl-Px e diminuição da Gl-Red nas células PC-3, comparativamente a outras linhas celulares de metástase. Freitas e colaboradores (2012)⁶², evidenciaram que a diminuição de defesas antioxidantes, como o GSH e a atividade da Gl-Red, ressensibiliza as células de metástase aos peróxidos favorecendo a sua conversão no $\bullet\text{OH}$, o que poderá constituir uma estratégia terapêutica do cancro da próstata. Assim, a exposição direta das células ao radical $\bullet\text{OH}$ ultrapassa o efeito protetor das defesas o que deverá ser mais eficaz do que a exposição aos peróxidos, que poderão ser convertidos em água pela Gl-Px e/ou em água e oxigénio pela catalase.

Neste trabalho estudámos o efeito do radical $\bullet\text{OH}$ na resposta celular do cancro da próstata avaliando que forma a sua utilização poderá constituir uma estratégia terapêutica desta neoplasia. Para o efeito o estudo foi realizado na linha celular PC-3,^{71,72} sendo a mesma tratada com H_2O_2 e ferro (FeSO_4 e FeCl_3), de forma isolada e combinada, a fim de induzir a formação do radical $\bullet\text{OH}$.

Os nossos resultados evidenciam que o efeito do radical $\bullet\text{OH}$, resultante da combinação de H_2O_2 e ferro, inibiu a proliferação celular, de forma mais acentuada do que cada um dos compostos isoladamente. Este resultado foi confirmado por um bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1. Para além da inibição da proliferação celular observou-se aumento significativo de morte, a qual ocorreu maioritariamente por necrose. No entanto, também se observou aumento significativo da morte celular, por apoptose, sobretudo na presença de 250 μM de H_2O_2 com 500 μM de FeCl_3 . Este resultado foi acompanhado por um aumento da razão BAX/BCL-2, moléculas envolvidas na sinalização da morte celular por apoptose. Assim, as proteínas BCL-2 e

BAX desempenham uma função anti e pró-apoptótico, respetivamente. A família das proteínas BCL-2 é formada por elementos indutores e repressores da apoptose que participam na regulação deste processo. Enquanto a proteína BCL-2 inibe a apoptose, pois previne a libertação do citocromo *c* que por sua vez ativa a caspase 3, por via mitocondrial⁹⁴, a proteína BAX tem efeito oposto uma vez que induz a libertação do mesmo citocromo bem como a diminuição do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mit}$). Assim, seria importante avaliar o efeito do $\bullet\text{OH}$ no $\Delta\Psi_{mit}$, esperando-se obter uma diminuição do mesmo em concordância com a indução de apoptose. No entanto, resultados não evidenciados falharam em confirmar este pressuposto. Por outro lado também deveriam ser avaliadas outras vias apoptóticas como a membrana ou a extrínseca, não abordadas neste estudo, e relacionadas com a ação dos recetores da família do fator de necrose tumoral (TNF), como o TNF-R1 e o TNF *related apoptosis inducing ligand* (TRAIL), ou outros membros da família BCL-2^{94,105}. Também é importante considerar a possibilidade de existência de morte celular por autofagia^{105,106,107}.

A morte celular observada neste estudo deverá ser resultante do aumento de stresse oxidativo. Os nossos resultados evidenciam um aumento de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e uma diminuição da produção de peróxidos, na presença de H_2O_2 e FeCl_3 , após 24 horas de tratamento. Desta forma é de admitir que os peróxidos tenham sido convertidos no radical $\bullet\text{OH}$, não quantificado, e que este tenha sido responsável pela lesão oxidativa, com conseqüente indução de morte celular.

A acompanhar o aumento de stresse oxidativo na presença de H_2O_2 e FeCl_3 , encontrámos um aumento do MDA, revelador de peroxidação lipídica.

Adicionalmente, estudámos a eficácia das defesas antioxidantes na resposta ao aumento do stresse oxidativo. Os nossos resultados evidenciaram um aumento significativo da concentração de GSH, nas células tratadas com os compostos de forma isolada e em combinação. Sendo significativamente superior nas células tratadas com os compostos isoladamente, esta observação parece refletir a capacidade das células de se adaptarem ao stresse oxidativo induzido pelos compostos de forma isolada, mas não a maiores níveis de stresse oxidativo resultante na indução do radical $\bullet\text{OH}$ a partir da combinação dos compostos. Poderão contribuir para este facto, a saturação do sistema antioxidante com a oxidação do GSH em glutatião oxidado (GSSG) ou a lesão oxidativa da Gl-Red que recupera o GSH. A este respeito note-se que não se observou aumento da atividade da Gl-Red. A Gl-Red é a enzima que cataliza a transformação do GSSG em GSH, devolvendo-lhe as suas propriedades antioxidantes^{45,108}. Estes resultados, também sugerem a possibilidade de utilização de compostos indutores da diminuição de GSH e da atividade da Gl-Red, ou do efeito combinado desses compostos com fármacos anticancerígenos convencionais. Esta associação poderá ser benéfica, pois poderá permitir utilizar concentrações mais reduzidas dos fármacos, do que o atualmente praticado, diminuindo os efeitos secundários¹⁰⁹.

O aumento de ROS nestas células parece ser contrariado pela atividade da Gl-Red e pelo conteúdo em GSH, permitindo a adaptação das células de metástase ao stresse oxidativo. Freitas e colaboradores (2012)⁶², demonstram a possibilidade de ocorrer diminuição do conteúdo em GSH e da atividade da Gl-Red, na presença de um agente indutor da diminuição de grupos tiol, o dietil maleato (DEM) revertendo a resistência das células ao stresse oxidativo. A diminuição do conteúdo em GSH na presença de DEM relaciona-se com aumento de apoptose induzida pela radiação e peróxidos nas

células PC-3 e noutras células representativas de metástase de cancro da próstata, LNCaP e DU145^{62,100}.

Este estudo remete para a importância de no futuro analisar o efeito do radical •OH em células de epitélio normal, no sentido de avaliar a potencial citotoxicidade. No entanto, é importante considerar a possibilidade do modelo em estudo não refletir com exatidão a realidade *in vivo* pelo que seria relevante analisar a presente abordagem num modelo animal.

Pelo exposto, a combinação de peróxidos com ferro resultou na indução do radical •OH o qual teve um efeito indutor de stresse oxidativo com consequente morte celular, sugerindo esta abordagem como uma nova estratégia no tratamento do cancro da próstata.

Capítulo 5 – Conclusão

5.1 – Conclusões gerais e perspectivas futuras

Neste estudo avaliámos o efeito do radical $\bullet\text{OH}$ na resposta celular do cancro da próstata e de que forma a sua utilização poderá constituir uma estratégia terapêutica desta neoplasia.

Dos estudos realizados na linha celular PC-3, representativa da doença metastizada, resultaram as seguintes conclusões:

- ✦ O radical $\bullet\text{OH}$, resultante da combinação de H_2O_2 e ferro, inibiu a proliferação celular, de forma mais acentuada do que cada um dos compostos isoladamente;
- ✦ A inibição da proliferação celular foi acompanhada de bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1;
- ✦ A combinação de peróxido e ferro induziu aumento significativo de morte, a qual ocorreu maioritariamente por necrose;
- ✦ Adicionalmente à necrose observou-se aumento significativo da morte celular, por apoptose, sobretudo na presença de 250 μM de H_2O_2 com 500 μM de FeCl_3 , sugerindo que este composto é mais eficaz do que o FeSO_4 como indutor de stresse oxidativo;
- ✦ Observou-se um aumento do anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e uma diminuição da produção de peróxidos, na presença de H_2O_2 e FeCl_3 , após 24 horas de tratamento;
- ✦ A acompanhar o aumento de stresse oxidativo na presença de H_2O_2 e FeCl_3 , encontrámos um aumento do MDA, revelador de peroxidação lipídica;

✚ Observou-se um aumento significativo da concentração de glutatião (GSH) nas células tratadas com os compostos isoladamente, mas não em resultado da sua combinação. Assim os resultados indicam a capacidade de resposta do sistema antioxidante até determinado nível de stresse oxidativo, mas a sua incapacidade de resposta mediante um insulto maior de stresse oxidativo.

Desta forma, face à relevância que envolve a conversão dos peróxidos no radical $\bullet\text{OH}$, parece importante, numa perspetiva futura, complementar o presente estudo com a quantificação deste mesmo radical. Seria também importante avaliar outros tipos de resposta celular relacionados com a metastização e invasividade, nomeadamente, a capacidade de migração das células.

Os estudos em linhas celulares não incluíram as células de epitélio prostático não neoplásico, o que deverá ser contemplado no futuro. Por outro lado o estudo deverá ser alargado a um modelo animal.

Em suma, o presente trabalho contribui para uma melhor compreensão do envolvimento do radical $\bullet\text{OH}$ e do stresse oxidativo na resposta celular do cancro da próstata, sugerindo esta estratégia como uma nova abordagem terapêutica para esta neoplasia.

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

1. Khandrika, L., Kumar, B., Koul, S., Maroni, P., and Koul, H. K. (2009) Oxidative stress in prostate cancer, *Cancer Letters* 282, 125-136.
2. Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2012) Cancer Statistics, 2012, *Cancer Journal for Clinicians* 62, 10-29.
3. Ferlay, J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C. and Parkin D.M. (2010) GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 12/2/2013.
4. Cook, L. S., Goldoft, M., Schwartz, S. M., and Weiss, N. S. (1999) Incidence of adenocarcinoma of the prostate in Asian immigrants to the United States and their descendants, *Journal of Urology* 161, 152-155.
5. Hsing, A. W., Tsao, L., and Devesa, S. S. (2000) International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality, *International Journal of Cancer* 85, 60-67.
6. Baade, P. D., Youlden, D. R., and Krnjacki, L. J. (2009) International epidemiology of prostate cancer: Geographical distribution and secular trends, *Molecular Nutrition & Food Research* 53, 171-184.
7. Jemal, A., Center, M. M., DeSantis, C., and Ward, E. M. (2010) Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 19, 1893-1907.
8. Steinberg, G. D., Carter, B. S., Beaty, T. H., Childs, B. and Walsh, P. C. (1990) Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 17, 337-347.
9. Bostwick, D. G., Burke, H. B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S. M., Landolph, J., Morrison, H., Sonawane, B., Shifflett, T., Waters, D. J., and Timms, B. (2004) Human prostate cancer risk factors, *Cancer* 101, 2371-2490.
10. Yossepowitch, O., Pinchuk, I., Gur, U., Neumann, A., Lichtenberg, D. and Baniel, J. (2007) Advanced but Not Localized Prostate Cancer is Associated With Increased Oxidative Stress, *The Journal of Urology* 178, 1238-1244.
11. Kumar, B., Koul, S., Khandrika, L., Meacham, R. B., and Koul, H. K. (2008) Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype, *Cancer Research* 68, 1777-1785.
12. Kolonel, L. N., Nomura, A. M. Y., and Cooney, R. V. (1999) Dietary fat and prostate cancer: Current status, *Journal of the National Cancer Institute* 91, 414-428.

13. Donkena, K. V., Young, C. Y. F., and Tindall, D. J. (2010) Oxidative Stress and DNA Methylation in Prostate Cancer, *Obstetrics and Gynecology International* 2010, 1-14.
14. De Marzo, A. M., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C. G., Nakai, Y., Isaacs, W. B., and Nelson, W. G. (2007) Inflammation in prostate carcinogenesis, *Nature Reviews Cancer* 7, 256-269.
15. Clark, R. A. (1999) Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase, *Journal of Infectious Diseases* 179, S309-S317.
16. Finkel, T., and Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature* 408, 239-247.
17. Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *Journal of Gerontology* 11, 298-230.
18. Jessie, B. C., Sun, C. Q., Irons, H. R., Marshall, F. F., Wallace, D. C., and Petros, J. A. (2001) Accumulation of mitochondrial DNA deletions in the malignant prostate of patients of different ages, *Experimental Gerontology* 37, 169-174.
19. Kotrikadze, N., Alibegashvili, M., Zibzivadze, M., Abashidze, N., Chigogidze, T., Managadze, L., and Artsivadze, K. (2008) Activity and content of antioxidant enzymes in prostate tumors, *Experimental oncology* 30, 244-247.
20. Gupte, A., and Mumper, R. J. (2009) Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment, *Cancer Treatment Reviews* 35, 32-46.
21. Waris, G. and Ahsan, H. (2006) Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions, *Journal of Carcinogenesis* 5, 1-8.
22. Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., and Hocevar, B. A. (2010) Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis, *Toxicologic Pathology* 38, 96-109.
23. Sies, H. (1997) Oxidative stress: Oxidants and antioxidants, *Experimental Physiology* 82, 291-295.
24. Scandalios, J. G. (2002) Oxidative stress responses – what have genome-scale studies taught us?, *Genome Biology* 3, 1019.1-1019.6.
25. Packer, L. (2003) Lepoic acid, a metabolic antioxidant stimulates the insulin signaling pathway in adipocytes and counteracts oxidative stress and age related mitochondrial and cognitive dysfunction, *Chemical Probes in Biology: Science at the Interface of Chemistry, Biology and Medicine* 129, 137-144.
26. Grek, C. L. and Tew, K. D. (2010) Redox metabolism and malignancy. *Curr Opin Pharmacol* 10, 362-368.

27. Toyokuni, S. (1999) Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology, *Pathology International* 49, 91-102.
28. Manda, G., Nechifor, M. T. and Neagu, T. M. (2009) Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies, *Current Chemical Biology* 3, 342-366.
29. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions* 160, 1-40.
30. Alirol, E., and Martinou, J. C. (2006) Mitochondria and cancer: is there a morphological connection?, *Oncogene* 25, 4706-4716.
31. McBride, H. M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006) Mitochondria: More Than Just a Powerhouse, *Current Biology* 16, R551-R560.
32. Szeto, H.H. (2006) Mitochondria-targeted peptide antioxidants: Novel neuroprotective agents. *AAPS Journal* 8, E521-E531.
33. Lenaz, G., and Genova, M. L. (2009) Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: A dynamic super-assembly, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 1750-1772.
34. Freitas, M. (2012) Ação do stresse oxidativo e do tabaco no desenvolvimento e progressão do cancro da próstata – Implicações prognósticas e terapêuticas. Universidade de Coimbra. Dissertação de Doutoramento.
35. Turrens, J. F. (1996) Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain, *Bioscience Reports* 17, 3-8.
36. Szeto H. H. (2006). Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants. *AAPS Journal* 8, E277-E283.
37. Zadak, Z., Hyspler, R., Ticha, A., Hronek, M., Fikrova, P., Rathouska, J., Hrciarikova, D., Stetina, R. (2009) Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiol Res* 58 Suppl 1, S13-17.
38. Dexter, D. T., Holley A. E., Flitter, W. D., Slater, T. F., Wells, F. R., Daniel, S. E., Lees, A. J., Jenner, P., Marsden, C. D. (1994) Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. *Mov Disord* 9, 92-7.
39. Nichols, J. A, Katiyar, S. K. (2010) Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res* 302, 71-83.

40. Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M. J. (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 324, 1-18.
41. Witte, J. S. (2009). Prostate cancer genomics: towards a new understanding, *Nature Reviews Genetics* 10, 77-82.
42. Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., and Kumar, M. N. V. R. (2006) Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective, *Journal of Controlled Release* 113, 189-207.
43. Vertuani, S., Angusti, A., and Manfredini, S. (2004) The antioxidants and pro-antioxidants network: An overview, *Current Pharmaceutical Design* 10, 1677-1694.
44. Haddad, J. J. (2002) Pharmaco-redox regulation of cytokine-related pathways: From receptor signaling to pharmacogenomics, *Free Radical Biology and Medicine* 33, 907-926.
45. Almondes, K. G., Leal, G. V., Cozzolino, S. M., Philipp, S. T., Rondo, P.H. (2010). The role of selenoproteins in cancer. *Rev Assoc Med Bras* 56, 484-488.
46. Magwere, T., and Burchill, S. A. (2011) Heterogeneous Role of the Glutathione Antioxidant System in Modulating the Response of ESFT to Fenretinide in Normoxia and Hypoxia, *Plos One* 6.
47. Rahman, M., Miyamoto, H., and Chang, C. S. (2004) Androgen receptor coregulators in prostate cancer: Mechanisms and clinical implications, *Clinical Cancer Research* 10, 2208-2219.
48. Huggins, C., Hodges, C. V. (1941) Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate, *Cancer Res.* 1, 293-297.
49. Culig, Z., Hobisch, A., Hittmair, A., Peterziel, H., Cato, A. C. B., Bartsch, G., and Klocker, H. (1998) Expression, structure, and function of androgen receptor in advanced prostatic carcinoma, *Prostate* 35, 63-70.
50. Koivisto, P., Kolmer, M., Visakorpi, T., Kallioniemi, O. P. (1998) Androgen Receptor Gene and Hormonal Therapy Failure of Prostate Cancer, *Am. J. Pathol.* 152, 1-9.
51. Moreira, V. (2008) Novos esteróides inibidores da biossíntese de androgénios. Universidade de Coimbra. Dissertação de Doutoramento.
52. Monteiro, P. (2006) Terapêutica e Seguimento do Carcinoma da Próstata, *Acta Urológica* 23, 89-92.

53. Haimovitz-Friedman A. (1998) Radiation-induced signal transduction and stress response, *Radiat Res* 150, 102-108.
54. Erenpreisa, J. A., Cragg, M. S., Fringes, B., Sharakhov, I., and Illidge, T. M. (2000) Release of mitotic descendants by giant cells from irradiated Burkitt's lymphoma cell lines, *Cell Biology International* 24, 635-648.
55. Freitas, M., Alves, V., Sarmiento-Ribeiro, A. B., and Mota-Pinto, A. (2011) Combined effect of sodium selenite and docetaxel on PC3 metastatic prostate cancer cell line, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 408, 713-719.
56. Stein, C. A. (1999) Mechanisms of action of taxanes in prostate cancer, *Semin. Oncol.* 26, S3–S7.
57. Calvert, P., Yao, K. S., Hamilton, T. C., and O'Dwyer, P. J. (1998) Clinical studies of reversal of drug resistance based on glutathione, *Chemico-biological interactions* 111-112, 213-224.
58. Husbeck, B., Peehl, D. M., and Knox, S. J. (2005) Redox modulation of human prostate carcinoma cells by selenite increases radiation-induced cell killing, *Free Radical Biology and Medicine* 38, 50-57.
59. Estrela, J. M., Ortega, A., and Obrador, E. (2006) Glutathione in cancer biology and therapy, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 43, 143-181.
60. Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., and Aggarwal, B. B. (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer How are they linked?, *Free Radical Biology and Medicine* 49, 1603-1616.
61. Hye-Won Lim, H. W., Hong, S., Jin, W., Kim, S. J., Kang, H. J., Park, E. H., Ahn, K. and Lim, C. J. (2005). Up-regulation of defense enzymes is responsible for low reactive oxygen species in malignant prostate cancer cells, *Experimental and Molecular Medicine* 37, 497-506.
62. Freitas, M., Baldeiras, I., Proença, T., Alves, V., Mota-Pinto, A. and Sarmiento-Ribeiro, A.B. and (2012) Oxidative stress adaptation in aggressive prostate cancer may be counteracted by the reduction of glutathione reductase, *FEBS Open Bio* 2, 119-128.
63. Halliwell, B., Clement, M. V., and Long, L. H. (2000) Hydrogen peroxide in the human body, *Febs Letters* 486, 10-13.
64. Farber, J. (1994) Mechanisms of cell injury by activated oxygen species, *Environ Health Perspect* 123, 17-24.
65. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1984) Oxygen-toxicity, oxygen radicals, transition-metals and disease, *Biochemical Journal* 219, 1-14.

66. Lim, S. D., Sun, C., Lambeth, J. D., Marshall, F., Amin, M., Chung, L., Petros, J. A., and Arnold, R. S. (2005) Increased noxl and hydrogen peroxide in prostate cancer, *Prostate* 62, 200-207.
67. Nicco, C., Laurent, A., Chereau, C., Weill, B., and Batteux, F. (2005) Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59, 169-174.
68. Lopez-Lazaro, M. (2007) Dual role of hydrogen peroxide in cancer: Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy, *Cancer Letters* 252, 1-8.
69. Arredondo, M., and Nunez, M. T. (2005) Iron and copper metabolism, *Molecular aspects of medicine* 26, 313-327.
70. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., and Andrews, N. C. (2004) Balancing acts: Molecular control of mammalian iron metabolism, *Cell* 117, 285-297.
71. Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., and Jones, L. W. (1979) Establishment and characterization of human prostatic-carcinoma cell line (PC-3), *Investigative Urology* 17, 16-23.
72. Tai, S., Sun, Y., Squires, J. M., Zhang, H., Oh, W. K., Liang, C.-Z., and Huang, J. (2011) PC3 Is a Cell Line Characteristic of Prostatic Small Cell Carcinoma, *Prostate* 71, 1668-1679.
73. Langdon, S. (2003) Cancer cell culture. Methods and protocols, *Methods in Molecular Medicine* 88; Humana Press Inc.; New Jersey.
74. Phelan, M. C. (2007). Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture, *Current Protocols in Cell Biology* 36, 1.1.1–1.1.18.
75. Ahmed, S. A., Gogal, R. M., and Walsh, J. E. (1994) A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay, *Journal of Immunological Methods* 170, 211-224.
76. Nociari, M. M., Shalev, A., Benias, P., and Russo, C. (1998) A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity, *Journal of Immunological Methods* 213, 157-167.
77. O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., and Pognan, F. (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity, *European Journal of Biochemistry* 267, 5421-5426.
78. Perrot, S. (2003). Resazurin Metabolism Assay Is a New Sensitive Alternative Test in Isolated Pig Cornea, *Toxicological Sciences* 72, 122-129.

79. Shahan, T. A., Siegel, P. D., Sorenson, W. G., Kuschner, W. G., and Lewis, D. M. (1994) A sensitive new bioassay for tumor-necrosis-factor, *Journal of Immunological Methods* 175, 181-187.
80. Anoopkumar-Dukie, S., Carey, J. B., Conere, T., O'Sullivan, E., van Pelt, F. N., and Allshire, A. (2005) Resazurin assay of radiation response in cultured cells, *British Journal of Radiology* 78, 945-947.
81. Vega-Avila, E., and Pugsley, M. K. (2011) An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells, *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 54, 10-14.
82. Sarmento-Ribeiro, A.B. (2000) Alterações fenotípicas da célula tumoral e a sua relação com a resistência à quimioterapia. Universidade de Coimbra. Dissertação de Doutoramento.
83. Gorman, A. M., Samali, A., McGowan, A. J., and Cotter, T. G. (1997) Use of flow cytometry techniques in studying mechanisms of apoptosis in leukemic cells, *Cytometry* 29, 97-105.
84. Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., and Traganos, F. (1997) Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis), *Cytometry* 27, 1-20.
85. Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P. M., McGahon, A. J., Rader, J. A., Vanschie, R., Laface, D. M., and Green, D. R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl, *Journal of Experimental Medicine* 182, 1545-1556.
86. vanEngeland, M., Ramaekers, F. C. S., Schutte, B., and Reutelingsperger, C. P. M. (1996) A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture, *Cytometry* 24, 131-139.
87. Knapp, W., Strobl, H., Majdic, O. (1994) Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis, *Cytometry* 15, 187-188.
88. Pozarowski, P., Darzynkiewicz, Z. (2004). Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry, *Checkpoint Controls and Cancer Methods in Molecular Biology* 281, 301–311.
89. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goetze, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry* 150, 76-85.

90. Golberg D.M., Spooner R.J. (1987) Glutathione reductase in: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, U.H., Ed.), *Verlag Chemie Weinheim Academic Press*, New York, 258–265.
91. Halliwell, B., and Whiteman, M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *British Journal of Pharmacology* 142, 231-255.
92. Gomes, A., Fernandes, E., and Lima, J. (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 65, 45-80.
93. Rothe, G., and Valet, G. (1990) Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2,7 dichlorofluorescein, *Journal of Leukocyte Biology* 47, 440-448.
94. Cory, S. and Adams, J. M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, *Nat Rev Cancer* 9, 647-656.
95. Sonpavde, G., Hutson, T. E., and Berry, W. R. (2006) Hormone refractory prostate cancer: Management and advances, *Cancer Treatment Reviews* 32, 90-100.
96. Debes, J. D., Tindall, D. J. (2004) Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer, *N Engl J Med* 351, 1488-1490.
97. Paule, B. (2005) Reappraisal of the concept of hormone therapy in metastatic prostate cancer and implications for treatment, *Eur Urol* 47, 729-735.
98. Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahsan, H., Mukhtar, H., Ahmad, N. (2008) Combination of vitamin E and selenium causes an induction of apoptosis of human prostate cancer cells by enhancing Bax/Bcl-2 ratio, *Prostate* 68, 1624-1634.
99. Xiang, N., Zhao, R., Zhong, W. (2009) Sodium selenite induces apoptosis by generation of superoxide via the mitochondrial-dependent pathway in human prostate cancer cells, *Cancer Chemother Pharmacol* 63, 351-362.
100. Coffey, R. N., Watson, R. W., Hegarty, N. J., O'Neill, A., Gibbons, N., Brady, H. R., Fitzpatrick, J. M. (2000) Thiol-mediated apoptosis in prostate carcinoma cells, *Cancer* 88, 2092-2104.
101. Nelson, W. G., De Marzo, A. M., Isaacs, W. B. (2003) Prostate cancer, *N Engl J Med* 349, 366-381.
102. Civetta, M. M. T., Civetta, J. D. (2011) Carcinogenesis, *Salud Publica Mex* 53, 405-414.

103. Kumar, B., Koul, S., Khandrika, L., Meacham, R. B., and Koul, H. K. (2008) Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype, *Cancer Research* 68, 1777-1785.
104. Jung, K., Seidel, B., Rudolph, B., Lein, M., Cronauer, M. V., Henke, W., Hampel, G., Schnorr, D., and Loening, S. A. (1997) Antioxidant enzymes in malignant prostate cell lines and in primary cultured prostatic cells, *Free Radical Biology and Medicine* 23, 127-133.
105. Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B., and Bao, J. K. (2012) Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis, *Cell Proliferation* 45, 487-498.
106. Kurz, T., Terman, A., and Brunk, U. T. (2007) Autophagy, ageing and apoptosis: The role of oxidative stress and lysosomal iron, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 462, 220-230.
107. Li, Z.-y., Yang, Y., Ming, M., and Liu, B. (2011) Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 414, 5-8.
108. Fujii, J., Ito, J.-i., Zhang, X., and Kurahashi, T. (2011) Unveiling the roles of the glutathione redox system in vivo by analyzing genetically modified mice, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 49, 70-78.
109. Freitas, M., Sarmiento-Ribeiro, A., Mota-Pinto, A. (2012) An overview of docetaxel applications and effects. In *Horizons in Cancer Research* 50 (HS. Watanabe eds). Nova Science Publishers.

