

# O butirato e o irinotecano: a sinergia na terapêutica do Cancro do Cólon





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

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



*“Agir, eis a inteligência verdadeira.  
Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for.  
O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito.  
Condições de palácio tem qualquer terra larga,  
Mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”*

**Fernando Pessoa**



# Agradecimentos

O sucesso não advém apenas de um esforço individual e, para chegar ao final desta etapa muitos foram responsáveis pelo meu sucesso e, apesar de apenas ter estas breves linhas, gostaria de deixar escrito os nomes daqueles que tenho de prestar o meu sentido e profundo agradecimento.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, diretora da Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, orientadora desta dissertação, por me ter acolhido na sua equipa, pela abertura, apoio, disponibilidade, dedicação e orientação. Ensinou-me o cuidado e a importância do rigor de um pensamento na conceção de um trabalho. A partilha de conhecimento e experiência científica, como também a confiança depositada neste trabalho é algo ao qual eu não posso deixar de agradecer eternamente.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira, Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, orientador interno desta dissertação, pelos seus ensinamentos, pela total disponibilidade e ajuda.

À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro, Professora da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela sua disponibilidade e apoio indispensável para a elaboração deste trabalho científico, e à Mestre Ana Cristina Gonçalves pela total disponibilidade e ajuda, sobretudo no auxílio imprescindível da realização da citometria de fluxo e pela partilha de conhecimento na interpretação dos resultados.

Gostaria também de agradecer aos Serviços Farmacêuticos do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra pela cedência do Irinotecano e à Unidade de Oncologia Translacional do Instituto de Investigações Biomédicas de Madrid pela cedência da linha celular CCD 84I CoN.

À Professora Doutora Margarida Abrantes, que me recebeu pela primeira vez neste serviço, que me ensinou a paciência, o cuidado, o esforço e o empenho. Por ser mais do que uma chefe e pela constante preocupação por este trabalho. Pela audácia de enfrentar alguns problemas com os recursos que temos. A Margarida é realmente um exemplo a seguir e tive muito gosto e orgulho em receber cada ensinamento seu, sendo uma pessoa com quem sei que posso contar.

À Mestre Salomé Pires, por toda a disponibilidade durante o mestrado, por toda a amizade, pela força e confiança que demonstrou em mim. Por ser a pessoa encantadora que me ajudou tanto neste projeto, pela sua simpatia inesgotável, pelos seus ensinamentos, pela

paciência e pela essencial contribuição na realização deste trabalho. Por ser uma pessoa que tanto admiro e respeito, o meu sincero obrigado.

Ao Mestre João Casalta pela disponibilidade, pela simpatia e pela preciosa ajuda na análise estatística dos resultados deste trabalho.

À Mestre Mafalda Laranjo, também um exemplo de dedicação, pela disponibilidade constante e pela partilha de conhecimentos sempre pertinentes e valiosos. Um agradecimento especial por todo o apoio e amizade demonstrada ao longo do mestrado.

Às Mestres Catarina e Ana Brito pela constante disponibilidade e amizade, por todos os conselhos e críticas que me ajudaram no meu desempenho durante o mestrado. Além disso, não posso deixar de referir nos bons momentos de alegria e diversão que nunca me vou esquecer. Tal como não posso de deixar de agradecer ao Mestre Fernando, por todo o apoio e momentos animados que tornaram os dias mais leves. Aos Mestres Rui, Edgar, Siri, Sara e Maria João por todos os bons momentos passados no laboratório e por toda a partilha de conhecimento.

À Denise, Ana Isabel, ao Sales, à Kathleen, à Filipa, à Ana Cláudia, e ao Gonçalo, à Renata, à Stéphanie e a tantos outros que passaram pelo serviço de Biofísica, o meu sincero agradecimento por todos os momentos de companheirismo e descontração. Ao Telmo, por toda a ajuda e por ter aceitado o desafio de começar o estudo com o butirato comigo. Ao Teixeira e à Tânia pela força, a constante preocupação e aos bons momentos, um grande obrigado.

À Sra. Cláudia Caridade pelo seu contributo, pela disponibilidade e pela sua simpatia constante.

Aos meus colegas de mestrado, que são muitos, um enorme obrigado. Pela partilha, pelos conselhos, pela diversão e pela amizade um muito obrigado.

Aos meus grandes e eternos amigos, que me viram a crescer e, que me ajudaram a tornar a pessoa que me tornei hoje, um grande obrigado. Ao Emanuel, à Filipa, ao Daniel, às Joanas e ao David um grande obrigado por serem vocês, pelo vosso apoio e preocupação constantes, por todos os nossos bons e maus momentos, e pela compreensão de muitos momentos em que não pude estar presente.

Não posso de deixar de referir algumas pessoas que tanto me ajudaram neste percurso académico, principalmente na licenciatura, que me ajudaram a ultrapassar os piores momentos, que me deram grandes memórias as quais não me vou esquecer certamente. Ao Carlos, à Joana Costa, à Rita, à Jani, ao Paulo, ao Denis, ao Coura, à Sara Handem, à Marisa, à Cláudia Saraiva, ao Cristóvão, ao Pinhal, ao Mário, ao Santos, à Marta Leite, ao Oliveira e

ao pessoal das futeboladas e a muitos outros em que este pequeno espaço não é suficiente para os referir, um sincero obrigado.

À minha Sara, por todo o apoio, por todo o amor, por toda a preocupação, pela paciência, por me compreenderes e por estares sempre presente. Não tenho como te agradecer pelas palavras de incentivo e de força quando mais precisei e por seres a pessoa cativante que és.

Ao meu grande irmão pela preocupação constante, por partilhares as mesmas paixões que eu, por não me deixares esquecer os sonhos, pelas pequenas melodias compostas, pelos pequenos e grandes desafios e, por me deixares sempre preocupado por seres mais novo, uma grande obrigado.

Aos meus pais que tanto devo, pela preocupação, pelo amor, pela força e por me ajudarem sempre que preciso, um enorme obrigado. A vocês, devo quem sou hoje, aos valores que me ensinaram e que me fazem ultrapassar as barreiras que encontro. A vocês, que tanto abdicaram para eu estar aqui, tenho de pedir desculpa por não ter cumprido tanto o meu papel este ano e pelas constantes saudades. Não posso de deixar de referir aqui, nestas breves linhas, o esforço que fizeram para estar aqui, o caminho que fizeram, a viagem de passar o Tejo para me darem um futuro melhor. A ti Pai, e a ti Mãe, um eterno obrigado por estarem sempre presentes.



# ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO.....	- 1 -
I.1.	Cancro colorretal .....	- 3 -
I.1.1.	Terapêutica do cancro colorretal.....	- 5 -
I.1.1.1.	Irinotecano .....	- 5 -
I.2.	Butirato .....	- 9 -
I.2.1.	Síntese, metabolismo, transporte e absorção.....	- 10 -
I.3.	Butirato e a célula tumoral .....	- 12 -
I.3.1.	Butirato como inibidor das HDACs .....	- 13 -
I.3.2.	Butirato como inibidor da transcrição de genes-alvo.....	- 16 -
I.3.3.	Butirato como inibidor da angiogénese.....	- 17 -
I.4.	Butirato na terapia.....	- 20 -
I.5.	Objetivos do presente trabalho .....	- 23 -
2.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	- 25 -
2.1.	Estudos <i>in vitro</i> .....	- 27 -
2.1.1.	Culturas celulares .....	- 27 -
2.1.2.	Estudos de citotoxicidade.....	- 29 -
2.1.2.1.	Butirato .....	- 30 -
2.1.2.2.	Irinotecano .....	- 30 -
2.1.2.3.	Butirato e Irinotecano.....	- 30 -
2.1.2.4.	Determinação da Proliferação Celular .....	- 31 -
2.1.2.4.1.	Avaliação Da Atividade Metabólica Pelo Ensaio MTT .....	- 31 -
2.1.2.5.	Citometria de Fluxo .....	- 33 -
2.1.2.5.1.	Avaliação da Viabilidade Celular .....	- 34 -
2.1.2.5.2.	Avaliação do Ciclo Celular .....	- 36 -
2.1.2.5.3.	Avaliação da expressão de Bax/Bcl-2 .....	- 37 -
2.1.3.	Avaliação da expressão das proteínas P53 e $\beta$ -Catenina .....	- 38 -
2.1.3.1.	Preparação dos extratos de Proteínas.....	- 39 -
2.1.3.2.	Western Blot.....	- 40 -
2.1.3.3.	Análise da expressão de P53 .....	- 40 -
2.1.3.4.	Imunocitoquímica .....	- 41 -
2.1.3.4.1.	Preparação das lâminas para estudo.....	- 42 -
2.1.3.4.2.	Aquisição e quantificação.....	- 43 -
2.1.4.	Efeito do butirato na quimiorresistência.....	- 44 -
2.1.4.1.	Estudos de captação com $^{99m}\text{Tc}$ -Mibi .....	- 45 -
2.2.	Estudos <i>in vivo</i> .....	- 46 -

2.2.1.	Modelos heterotrópicos .....	- 46 -
2.2.1.1.	Tratamento .....	- 47 -
2.2.1.1.1.	Butirato .....	- 47 -
2.2.1.1.2.	Irinotecano.....	- 48 -
2.2.1.1.3.	Terapêutica combinada .....	- 48 -
2.2.2.	Modelos ortotópicos .....	- 49 -
2.2.2.1.	Período pós-cirurgia .....	- 49 -
2.2.2.2.	Inoculação das células tumorais.....	- 50 -
2.2.2.3.	Tratamento .....	- 50 -
2.3.	Análise estatística.....	- 51 -
3.	RESULTADOS.....	- 53 -
3.1.	Estudos <i>in vitro</i> .....	- 55 -
3.1.1.	Monoterapia com butirato .....	- 55 -
3.1.1.1.	Avaliação da proliferação celular .....	- 55 -
3.1.1.2.	Avaliação da viabilidade Celular .....	- 61 -
3.1.1.3.	Avaliação da razão bax/bcl-2 .....	- 64 -
3.1.1.4.	Expressão de $\beta$ -catenina.....	- 65 -
3.1.1.5.	Expressão de P53 .....	- 66 -
3.1.2.	Monoterapia com Irinotecano .....	- 68 -
3.1.2.1.	Avaliação da proliferação celular .....	- 68 -
3.1.3.	Terapia combinada .....	- 70 -
3.1.3.1.	Avaliação da Proliferação Celular .....	- 70 -
3.1.3.2.	Avaliação da viabilidade celular .....	- 75 -
3.1.3.3.	Avaliação do Ciclo Celular.....	- 77 -
3.1.3.4.	Expressão de P53 .....	- 79 -
3.1.4.	Avaliação da Captação do $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI.....	- 80 -
3.2.	Estudos <i>in vivo</i> .....	- 82 -
3.2.1.	Modelos heterotópicos .....	- 83 -
3.2.2.	Modelos ortotópicos .....	- 86 -
4.	DISCUSSÃO .....	- 91 -
5.	CONCLUSÃO .....	- 115 -
6.	BIBLIOGRAFIA.....	- 114 -

## Resumo

O cancro é uma das causas principais de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda causa de morte nos países em desenvolvimento. O cancro colorretal é o terceiro cancro com maior incidência em homens e o segundo em mulheres em todo o mundo. Em Portugal, o cancro colorretal é responsável pela morte de 11 portugueses por dia e cerca de 3 mil por ano, com uma incidência anual 6 mil novos casos. A elevada toxicidade dos fármacos antineoplásicos convencionalmente usados para a terapia é muitas vezes razão limitante da dose ou até mesmo para a interrupção da quimioterapia havendo, assim, uma necessidade permanente de novas terapias para o combate do mesmo. O irinotecano é usado como segunda linha de tratamento e os seus potenciais benefícios (controlo de sintomas, manutenção e melhoria da qualidade de vida e o aumento da sobrevivência) têm de ser pesados com os potenciais riscos do tratamento relacionados com a mortalidade e a morbilidade, nomeadamente neutropenia, náuseas, vômitos, diarreia e astenia. Pelo menos 36% dos doentes tratados com irinotecano sofrem de efeitos adversos com toxicidades graves, potencialmente fatais.

Uma dieta rica em fibras está relacionada com um baixo risco de desenvolvimento do cancro colorretal. A fermentação de fibras dietéticas pela microflora intestinal resulta na produção de butirato, o qual tem sido reportado como um agente quimiopreventivo. O butirato tem sido descrito como um inibidor das desacetilases de histonas, induzindo a paragem do ciclo celular, a apoptose e a diminuição da expressão de HIF-1 $\alpha$ , sendo também capaz de modular a via de sinalização Wnt e inibir o processo angiogénico. A relevância deste trabalho é apoiada em estudos que reforçam o papel dos inibidores das desacetilases de histonas, como o butirato, na combinação com a quimioterapia existente, na qual o irinotecano se inclui, tendo como objetivo a procura de uma sinergia que traduza a melhoria da eficácia e diminuição da toxicidade do tratamento.

Primeiramente, os resultados demonstraram que o butirato apresenta um efeito anti-proliferativo nas três linhas celulares a estudo, levando à diminuição da viabilidade celular, e da expressão de P53 e de  $\beta$ -catenina. Demonstrou também ser capaz de interferir com a atividade da glicoproteína-P e de induzir a apoptose, interferindo na razão BAX/BCL-2. A terapia combinada apresentou um potencial efeito citotóxico nas três linhas tumorais, que resultou num efeito sinérgico em algumas condições e permitiu a diminuição da

concentração de irinotecano necessária para reduzir a proliferação celular em 50% (IC<sub>50</sub>). Este potencial foi verificado em termos de viabilidade e de morte celular, do ciclo celular e da expressão de P53.

Na segunda parte deste trabalho, os estudos em animais permitiram verificar o sucesso da combinação dos dois compostos em modelos heterotópicos, sem a penalização do bem-estar dos animais, reforçando o potencial terapêutico entre o irinotecano e o butirato. Nos estudos em modelos ortotópicos não foi possível afirmar o potencial terapêutico do butirato, no entanto, estes resultados constituíram resultados preliminares, que no futuro poderão permitir avaliar o efeito do butirato no desenvolvimento tumoral, no seu microambiente de origem.

Assim, com este trabalho foi possível concluir que o butirato e o irinotecano atuam sinergicamente nas três linhas celulares tumorais apesar do seu diferente perfil genético e localização. O butirato é capaz de influenciar o mecanismo de quimiorresistência das células LSI034. Desta forma, o butirato em combinação com agentes quimioterapêuticos pode constituir uma solução para o tratamento do cancro colorretal. Tal entendimento pode orientar as decisões sobre quais os doentes com cancro colorretal podem beneficiar da terapia com butirato.

## Abstract

Cancer is a leading cause of death in economically developed countries and the second cause of death in developing countries. Colorectal cancer is the third cancer with higher incidence in men and the second in women worldwide. In Portugal, colorectal cancer is responsible for the death of 11 people per day and about 3 thousand per year, with an incidence of 6 thousand new cases each year. The high toxicity of antineoplastic drugs conventionally used for therapy is often dose limiting, or even the reason for discontinuation of chemotherapy, so there is an emerging need for new therapies to face it. Irinotecan is used as second-line treatment and its potential benefits (symptoms control, maintenance and improvement of patients life quality and increased survival) must be weighed with the potential risks of treatment related with mortality and morbidity, particularly neutropenia, nausea, vomit, diarrhea, asthenia. At least 36% of patients treated with irinotecan suffer from adverse effects with serious life-threatening toxicities.

A diet rich in fiber is associated with a low risk of developing colorectal cancer. The dietary fiber fermentation by intestinal microflora results in the production of butyrate, which has been reported as a chemopreventive agent. Butyrate has been described as an inhibitor of histone deacetylases, inductor of cell cycle arrest, apoptosis, inhibitor of HIF-1 $\alpha$  expression and, it is also capable of modulating the Wnt signaling pathway and inhibiting the angiogenic process. The relevance of this work is supported by studies that support the role of histone deacetylase inhibitors such as butyrate, in combination with current chemotherapy, in which irinotecan is included, with the objective to find a synergy that improve the efficacy and decrease treatment toxicity.

First, the results demonstrated that butyrate has an anti-proliferative effect in all three cell lines under study, leading to a decrease on cell viability, expression of P53 and  $\beta$ -catenin, being able to modulate the P-glycoprotein activity and induce apoptosis by modulation of BAX/BCL-2 ratio. Combined therapy has a cytotoxic potential, resulting in a synergistic effect in certain conditions, and allows a reduction in irinotecan concentration needed to reduce cell proliferation in 50% (IC<sub>50</sub>). This potential was verified in terms of cell viability and death, cell cycle and P53 expression.

In the second part of this work, animal studies helped to confirm the success of the combination of the two compounds in xenotransplant models without penalizing the welfare

of the animals, supporting the therapeutic potential of irinotecan and butyrate. The studies with orthotopic models were not possible to settle the therapeutic potential of butyrate. However, these results constituted preliminary results, and so, future studies will allow to evaluating the effect of butyrate on tumor development in its microenvironment of origin.

Butyrate and irinotecan act synergistically in the three tumor cell lines despite the different genetic background and location. Butyrate is able to influence the mechanism of LSI034 chemoresistance. Butyrate in combination with chemotherapeutic agents can be a solution for the treatment of colorectal cancer. Such understanding can guide decisions about which patients with colorectal cancer may benefit from therapy with butyrate.

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

- 5-FU - 5-Fluorouracilo
- ADN - Ácido desoxirribonucleico
- APC - *Adenomatous polyposis coli*
- AnV - Anexina V
- ARN – Ácido ribonucleico
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- BCA - *Bicinchoninic acid*
- BSA - *Bovine serum albumin*
- CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de Cálcio
- CAPS - *N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid*
- CCR – Cancro colorretal
- CDKN1A - *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*
- CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono
- CPT-11 - *Camptothecin-11*
- CYP3A4 - Cytochrome P450 3A4
- c-MYC - *Myelocytomatosis cell oncogene*
- DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*
- DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DR5 - *Death receptor 5*
- DTT - Ditioneitol
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
- ERK - *Extracellular signal-regulated kinases*
- FAP - *Familial adenomatous polyposis*
- FBS - *Fetal bovine serum*
- FCS - *Forward scatter*
- FITC - Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína
- gpP - Glicoproteína-P

GSK3 $\beta$  - *Glycogen synthase kinase 3 beta*  
HCl – Ácido Clorídrico  
HCO $_3^-$  - Ião bicarbonato  
HDAC - Deacetilases das histonas  
HIF-1 $\alpha$  - *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*  
IC – Índice de combinação  
IC $_{50}$  - Concentração que inibe a proliferação celular em 50 %  
Ig - Imunoglobulina  
IP - Iodeto de propídeo  
KCl- Cloreto de Potássio  
KH $_2$ PO $_4$  - fosfato de potássio monobásico  
K-Ras - *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*  
LV - Leucoverina  
MCT1 - *Monocarboxylate transporter 1*  
MDR- *Multidrug resistant*  
MDR1 - *Multidrug resistance protein 1*  
 $\mu$ M - Micromolar  
mM - Milimolar  
MRP2 - *Multidrug resistance-associated protein 2*  
MIF - Média de intensidade de fluorescência  
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazolium  
Na $^+$  - Ião Sódio  
NaCl – Cloreto de Sódio  
NADH – *Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form*  
NADPH – *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form*  
NaH $_2$ PO $_4$  - Fosfato monossódico  
NRP - Neuropilin  
PBS – *Phosphate buffer saline*  
PVDF - Difluoreto de polivinilideno  
Rb - *Retinoblastoma protein*  
RIPA - *radio-immunoprecipitation assay*

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RNase - Ribonuclease

SCFA - *Short-chain fatty acid*

SDS - *Sodium dodecyl sulfate*

siRNA - *small interfering RNA*

SL - Síndrome de Lynch

SMCT1 - *Sodium-coupled monocarboxylate transporter*

SSC - *Side scatter*

TBS-T - *Tris-buffered saline com Tween-20*

TCF4 - *Transcription factor 4*

TCF/LEF - *T-cell factor/Lymphoid enhancer-binding factor*

TNF- $\alpha$  - *Tumor necrosis factor alpha*

TRAIL - *Tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand*

TP53 - *Cellular tumor antigen p53*

UGT1A1 - *Uridine diphosphate glucuronosyltransferase I family, polypeptide A1*

VEGF - *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR - *Vascular endothelial growth factor receptor*

WB – *Western blot*



# I. INTRODUÇÃO



## 1.1. CANCRO COLORRETAL

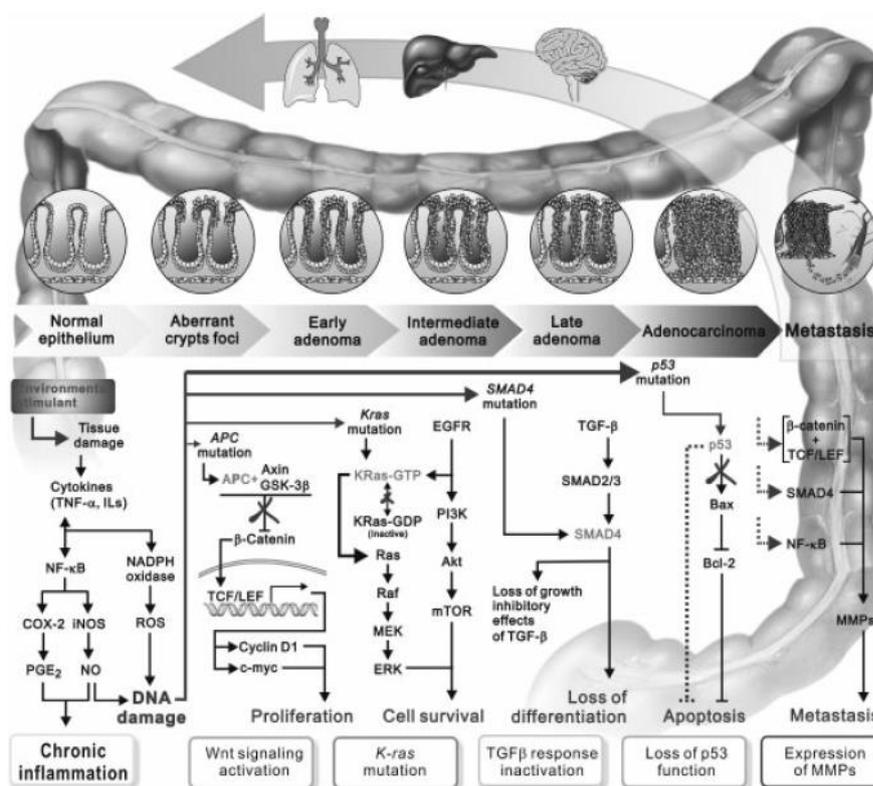
O cancro é uma das causas principais de morte em países economicamente desenvolvidos e a segunda causa de morte em países em desenvolvimento. A sua incidência aumenta em países desenvolvidos como resultado do crescimento e do envelhecimento da população assim como, da adoção de práticas potenciadoras do aparecimento de cancro, nas quais se incluem o tabagismo, o sedentarismo e a adoção de dietas ocidentais (Siegel *et al.*, 2013).

O cancro colorretal (CCR) é o terceiro cancro com maior incidência em homens e o segundo em mulheres em todo o mundo (Labianca *et al.*, 2013). As maiores taxas de incidência são encontradas na Austrália e Nova Zelândia, Europa e América do Norte, enquanto as taxas mais baixas são encontradas na África e na Ásia Meridional. As taxas de mortalidade são substancialmente maiores nos homens do que nas mulheres. (Jemal *et al.*, 2011).

Em Portugal, o CCR mata 11 portugueses por dia e cerca de 3 mil por ano, com uma incidência anual 6 mil novos casos (Ferlay *et al.*, 2013). O CCR afeta as células de revestimento epitelial da mucosa do cólon (intestino grosso), invadindo a parede intestinal, e na dependência do grau de invasão desta, pode comprometer outros órgãos, quer diretamente, quer através do processo de metastização. O CCR pode surgir segundo duas formas: a forma esporádica e a forma hereditária ou familiar. Entre os CCR de forma hereditária existe a síndrome de Lynch (SL), uma doença hereditária, com transmissão autossómica dominante, que se estima ser responsável por 3 a 5% da totalidade dos casos de cancro do cólon e do reto (CCR); e a polipose adenomatosa familiar (FAP, do inglês *familial adenomatous polyposis*) caracterizada pela formação de inúmeros pólipos no intestino que poderão desenvolver, com muita probabilidade, CCR. A forma esporádica não mostra qualquer predisposição familiar ou hereditária e constitui cerca de 70 % da incidência na população em geral. Esta forma de CCR pode resultar da ativação mutacional de oncogenes, da inativação de genes supressores tumorais, de mutações somáticas em pelo menos quatro ou cinco genes de uma célula e/ou da acumulação de múltiplas mutações genéticas que determinam o comportamento biológico do tumor. Os genes implicados no CCR podem ser divididos em três categorias: os genes supressores tumorais, os proto-oncogenes e os genes reparadores do ácido desoxirribonucleico (ADN). As alterações descritas são sequenciais em genes chave reguladores do crescimento, tais como *adenomatous polyposis coli* (APC), *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (K-ras), e *TP53*, culminando com o desenvolvimento

de um tumor maligno. As vias associadas a estes genes contribuem para o desenvolvimento de 85% de tumores colorretais que surgem a partir de pólipos adenomatosos pré-existentes. Quando os adenomas acumulam as combinações necessárias de mutações genéticas, de acordo com o modelo sugerido por etapas, o resultado final é o desenvolvimento do cancro (Fearon and Vogelstein, 1990).

Numa célula normal, a proteína APC forma um complexo com a axina, GSK-3 $\beta$ , e com a  $\beta$ -catenina. Isto promove a degradação protossomal da  $\beta$ -catenina e previne a transcrição dos genes alvo  $\beta$ -catenina/Tcf4. Quando a proteína APC está mutada,



**Figura 1.** Transição de epitélio normal a carcinoma colorretal. A progressão de epitélio normal a carcinoma colorretal é caracterizada por várias alterações genéticas. (Pan et al., 2011)

característica de inúmeras células tumorais, o complexo multi-proteico não se consegue formar e a  $\beta$ -catenina não é degradada. Nesta circunstância, a  $\beta$ -catenina é rapidamente translocada para o núcleo onde se liga com Tcf4 e ativa a transcrição de vários genes alvo (Sancho et al., 2004). A ativação de mutações no gene K-RAS no cancro colorrectal leva à ativação de várias vias de transdução que começam a partir deste oncogene. Como podemos ver na Figura 1, numa fase já tardia no cancro colorretal, outro supressor tumoral é encontrado mutado, a P53 (Fearon and Vogelstein, 1990).

### **I.1.1. TERAPÊUTICA DO CANCRO COLORRETAL**

O diagnóstico da doença numa fase pouca avançada permitiu alcançar alguns marcos importantes na última década, refletindo-se no aumento do período de tempo com ausência de progressão da doença. O CCR é normalmente tratado por cirurgia de ressecção quando detetado em estadios precoces, e com associação de quimioterapia neo-adjuvante e/ou adjuvante se o diagnóstico ocorre em estadios mais tardios (Abrantes, 2013).

As opções de quimioterapia incluem fluoropirimidinas (ex. 5-fluorouracilo, 5-FU), oxaliplatina e irinotecano. A primeira linha de tratamento consiste na administração intravenosa ou oral de fluoropirimidinas, usualmente em várias combinações. As combinações mais comuns são entre 5-FU, leucovorina (LV) e oxaliplatina, uma combinação denominada por FOLFOX ou 5-FU, LV, e irinotecano uma combinação denominada FOLFIRI. Estas combinações proporcionam uma melhor resposta, um aumento do período de tempo com ausência da progressão de doença e uma maior sobrevivência em comparação com a combinação de 5-FU/LV. Sendo o FOLFOX a escolha mais comum como primeira linha de tratamento, quando esta falha, a melhor opção, como segunda linha de tratamento, é o FOLFIRI (American Cancer Society, 2013; Oostendorp *et al.*, 2010). Apesar destas recomendações para segunda linha de quimioterapia, existem incertezas sobre o balanço entre benefícios e riscos. Os potenciais benefícios do irinotecano, como o controlo de sintomas, a manutenção e a melhoria da qualidade de vida e o aumento da sobrevivência, têm de ser pesados com os potenciais riscos do tratamento relacionados com a mortalidade e com a morbilidade, nomeadamente a neutropenia, as náuseas, os vómitos, a diarreia e a astenia (Oostendorp *et al.*, 2010).

#### **I.1.1.1. IRINOTECANO**

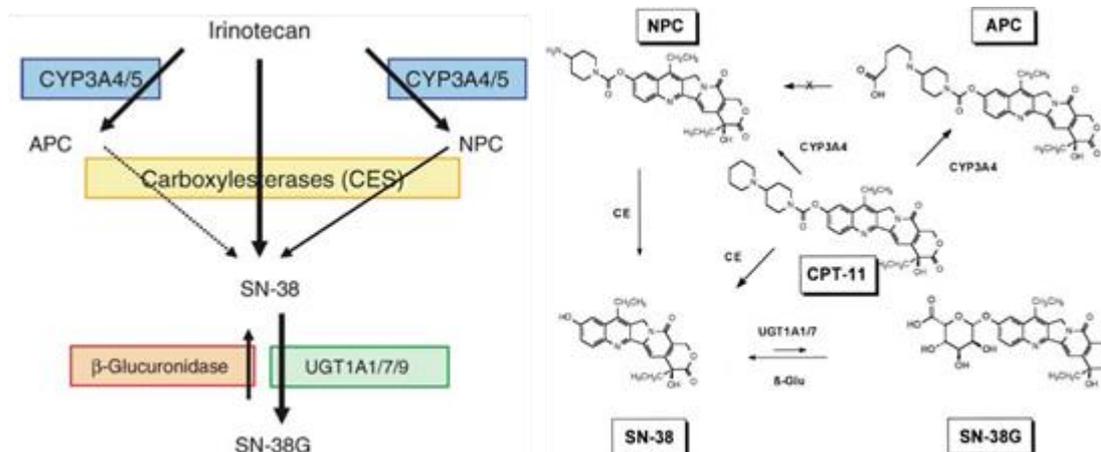
O irinotecano (CPT-11) é um composto que pertence à classe dos inibidores de topoisomerasas I e atua como um pró-fármaco de SN-38, um composto que chega a ser 100 a 1000 vezes mais tóxico do que o seu fármaco parente. O irinotecano tem demonstrado um largo espectro de atividade antitumoral em modelos pré-clínicos, com respostas em vários tipos de cancro incluindo o colorretal, o pulmão, o colo do útero e o do ovário (Rothenberg, 2001; Seo *et al.*, 2008).

Sendo o irinotecano um inibidor das topoisomerases torna-se importante saber o papel destas enzimas no ciclo celular e na replicação do ADN. Estas mantêm a conformação tridimensional adequada do ADN através da remoção das “super-espirais” durante a replicação e a transcrição do ADN. A topoisomerase I é uma enzima nuclear responsável pelas variações na configuração topológica do ADN durante a replicação e a transcrição. A inativação desta enzima pelo irinotecano, através da formação do complexo covalente ADN-topoisomerase I, causa a quebra na cadeia simples de ADN, o que impossibilita a replicação deste, provocando a inibição da síntese de ácido ribonucleico (ARN) e impedindo, consequentemente, a divisão celular. O irinotecano e o seu metabolito ativo SN-38 exercem os seus efeitos durante a fase S da síntese de ADN. O ADN é lesado e promove o processo de apoptose, contudo, a presença de grandes quantidades de topoisomerase I, quer nas células em divisão, quer nas células em repouso, sugere que o mecanismo de ação do irinotecano possa ser parcialmente independente do ritmo de crescimento celular e que, consequentemente, o fármaco poderá ser, desta forma, ativo quer nos tumores com elevado ritmo de divisão quer nos outros. Este dano induzido pelo fármaco não é corrigido de forma eficaz, o que resulta em apoptose (Rothenberg, 2001; Sooryakumar *et al.*, 2011).

Após a infusão intravenosa do irinotecano, a sua concentração plasmática diminui, com uma semi-vida biológica de cerca de 6 horas; o seu metabolito SN-38 tem uma semi-vida biológica de cerca de 10 horas. A semi-vida da forma ativa (lactona) do irinotecano, bem como a do SN-38, é similar à do irinotecano total e do SN-38. A farmacocinética e o metabolismo do irinotecano são extremamente complexos e têm sido alvo de investigação científica nos últimos anos. Ambos os fármacos são conhecidos numa forma ativa lactona e na forma inativa carboxilada, entre as quais o equilíbrio depende do pH do meio e da presença de ligações a proteínas (Xu, 2002). Embora a farmacocinética do irinotecano varie amplamente entre doentes, esta apresenta uma relação linear com a concentração da solução de cloridrato de irinotecano para uma faixa que vai dos 1850 aos 12950 mg/kg. As concentrações máximas do metabolito ativo SN-38 no plasma são atingidas, geralmente, dentro de 1 hora após o final de uma infusão de 90 minutos (Infarmed, 2011).

O irinotecano é sujeito a uma extensiva conversão metabólica por vários sistemas enzimáticos, incluindo as esterases para formar SN-38, a UGT1A1 (do inglês, *UDP-glucuronosyltransferase 1-1*) que regula a glucuronidação de SN-38, tal como o CYP3A4 (do inglês, *cytochrome P450 3A4*), que forma vários produtos farmacologicamente inativos por oxidação (Oostendorp *et al.*, 2010). A conversão metabólica do irinotecano a SN-38 é

mediada pelas enzimas carboxilesterases e ocorre principalmente no fígado como podemos ver na Figura 2 e na Figura 3. O SN-38 passa, então, por uma conjugação para formar um glicuronídeo (SN-38-glicuronídeo). O SN-38 mostrou ser, pelo menos 100 vezes mais potente do que o irinotecano, e 50 a 100 vezes mais potente do que o SN-38-glicuronídeo, em análises de citotoxicidade em roedores e em seres humanos (Takashi *et al.*, 2005).

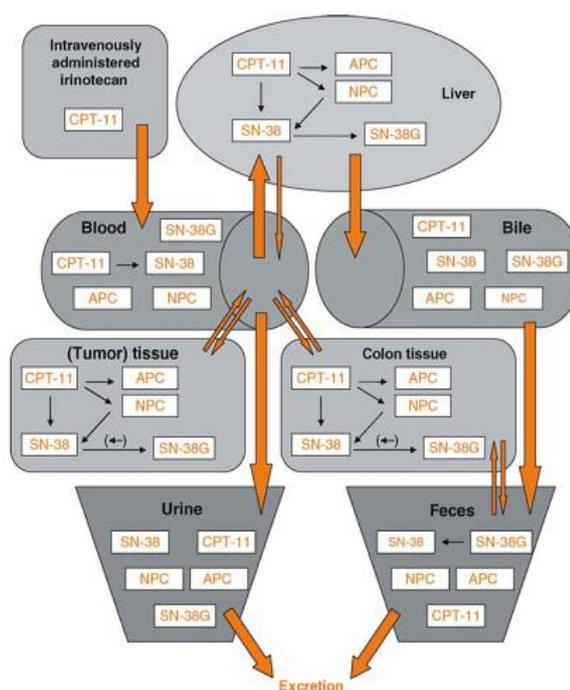


**Figura 2** Vias metabólicas do irinotecano e os seus intervenientes. A figura ilustra a conversão metabólica do irinotecano a SN-38 mediada primeiramente pela CYP3A4/5 formando os compostos APC e NPC e seguidamente pelas enzimas carboxilesterases com formação de SN-38. À direita a figura ilustra a representação química dos metabolitos do irinotecano Adaptado de Irinotecan Encyclopedia of Cancer 2009, pp 1571-1575.

Quanto à sua eliminação, o irinotecano depende da presença de proteínas transportadoras de fármacos, de notar a glicoproteína-P e o transportador canalicular multiespecífico de aniões, presente na membrana canalicular da vesícula (Rothenberg, 2001). Apesar da informação existente, a eliminação do irinotecano ainda não foi completamente esclarecida em seres humanos. A excreção urinária do irinotecano (11% a 20%), do SN-38 (< 1%) e do SN-38-glicuronídeo (3%) é baixa. Assim, a excreção renal não constitui uma via principal de eliminação do irinotecano e dos seus principais metabolitos circulantes conhecidos. Estudos realizados em dois doentes, após a administração de cloridrato de irinotecano, permitiram verificar que a excreção urinária e biliar acumulada de irinotecano e dos seus metabolitos (SN-38 e SN-38-glicuronídeo) por um período de 48 horas varia aproximadamente em 25% (100 mg/m<sup>2</sup>) a 50% (300 mg/m<sup>2</sup>) (Infarmed, 2011). Os vários processos que regulam a eliminação do irinotecano, como a metabolização ou a excreção, demonstram o impacto substancial da variabilidade individual de como este se comporta. Estratégias para personalizar a administração de irinotecano baseadas nas diferenças de expressão de proteínas e de enzimas específicas, ou com a co-administração de agentes

específicos capazes de modular os efeitos secundários poderão, de certa forma, levar a uma seletividade do uso deste agente na quimioterapia (Baer-Dubowska *et al.*, 2011).

O irinotecano apresenta grande variabilidade interindividual no comportamento farmacogenético. Investigações recentes indicam que o metabolismo do irinotecano é substancialmente influenciado por um polimorfismo na sequência TATAbox do gene *UGT1A1*. Este gene codifica a enzima *UGT1A1*, que é responsável pela glucuronidação de vários componentes, incluindo o SN-38. Um polimorfismo genético no promotor de *UGT1A1* resulta em baixa expressão enzimática, causando um grande decréscimo no seu metabolismo, com redução de cerca de 70%. Como tal, estes doentes não podem metabolizar adequadamente o irinotecano, e podem apresentar um alto risco de toxicidade quando tratados (Seddon and Burchell, 1995).

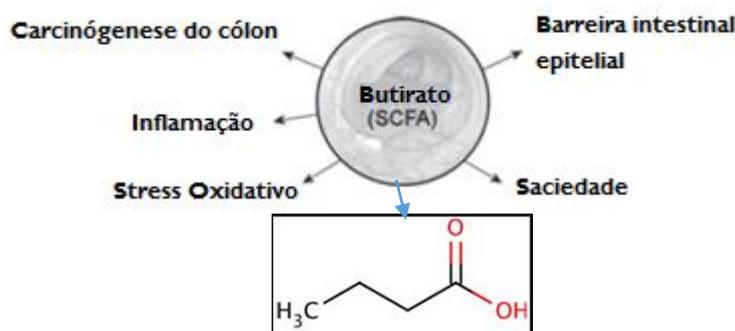


**Figura 3.** Representação esquemática da disposição da administração intravenosa do irinotecano. Irinotecan, Encyclopedia of Cancer 2009, pp 1571-1575.

A dosagem de irinotecano para doentes com atividade *UGT1A1* reduzida deve ser iniciada em quantidades pequenas e a continuidade do tratamento deve levar em consideração a tolerância do doente ao fármaco. Doses precisas para cada genótipo não são estipuladas, uma vez que há outros genes envolvidos na farmacocinética do irinotecano, como o *MDR1*, *MRP2*, *CYP3A4* e *CYP3A5* (Grivicich *et al.*, 2001).

## 1.2. BUTIRATO

O butirato é um dos ácidos gordos de cadeia curta (SCFA, do inglês *Short Chain Fatty Acids*) mais importantes produzidos pela microflora intestinal, uma vez que para além de ser fonte de energia para as células do cólon, mantém a saúde do mesmo, através do seu potencial anti-inflamatório e anticancerígeno, evitando o crescimento de células tumorais (Figura 4) e promovendo a diferenciação e a apoptose (Scharlau *et al.*, 2009; Sengupta *et al.*, 2006; Velázquez *et al.*, 1996).



**Figura 4** Fórmula química do butirato e os parâmetros de atuação do butirato. Adaptado de Hamer, *et al.*, 2007.

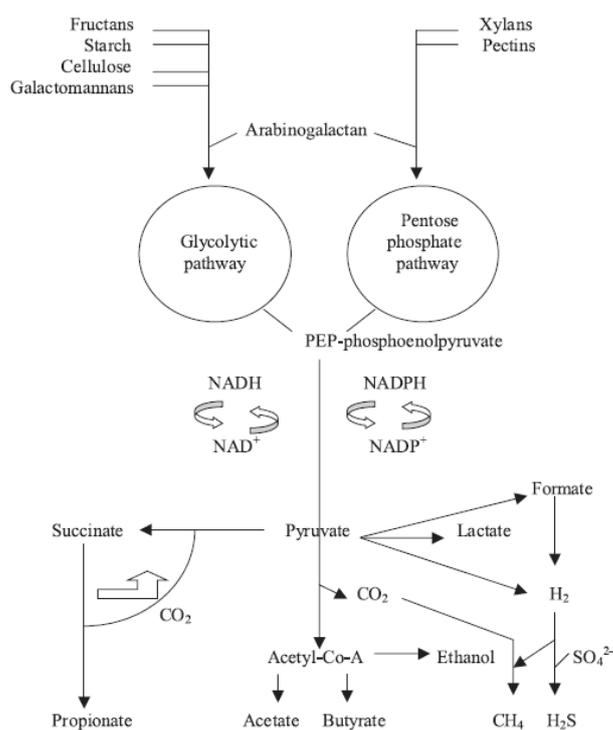
O butirato é um produto da fermentação de fibra dietética pela flora intestinal que desempenha um papel fundamental na homeostasia do epitélio do cólon por ter múltiplos papéis reguladores a este nível. Dentro das funções reguladoras incluem-se a promoção do crescimento e da proliferação de células epiteliais normais de cólon, a estimulação da absorção de fluidos e de eletrólitos, a inibição da inflamação, a diminuição do stresse oxidativo e a capacidade de melhorar a função da barreira de defesa do cólon (Rose *et al.*, 2007; Scharlau *et al.*, 2009).

Sabe-se que altas concentrações de butirato no cólon são um importante mediador do efeito protetor da fibra dietética. Assim, o butirato parece ter um papel protetor na prevenção e na progressão do CCR. Nos tecidos normais, o efeito do butirato a nível da proliferação e da morte celulares parece ser diferente do efeito do mesmo em tecidos tumorais, sendo este fenómeno referido como “paradoxo do butirato” (Sengupta *et al.*, 2006; Velázquez *et al.*, 1996).

### I.2.1. SÍNTESE, METABOLISMO, TRANSPORTE E ABSORÇÃO

As fibras solúveis são altamente fermentáveis e, conseqüentemente, geram maiores quantidades de SCFA no cólon. Fibras com maior grau de polimerização são mais resistentes à fermentação sacarolítica, dando origem a uma fermentação prolongada, expandindo-se para o cólon distal. Exemplos de fermentação de fibras solúveis que estão associados a uma maior produção de SCFA são a oligofrutose, derivados da cevada, da aveia e do amido (Hijova and Chmelarova, 2007; Topping and Clifton, 2001).

A maioria dos microrganismos prefere fermentar carboidratos do que proteínas, pelo que, a fermentação sacarolítica ocorre predominantemente no cólon proximal, enquanto a fermentação proteolítica ocorre principalmente no cólon distal, onde os carboidratos fermentáveis estão em menor concentração (Hijova and Chmelarova, 2007).

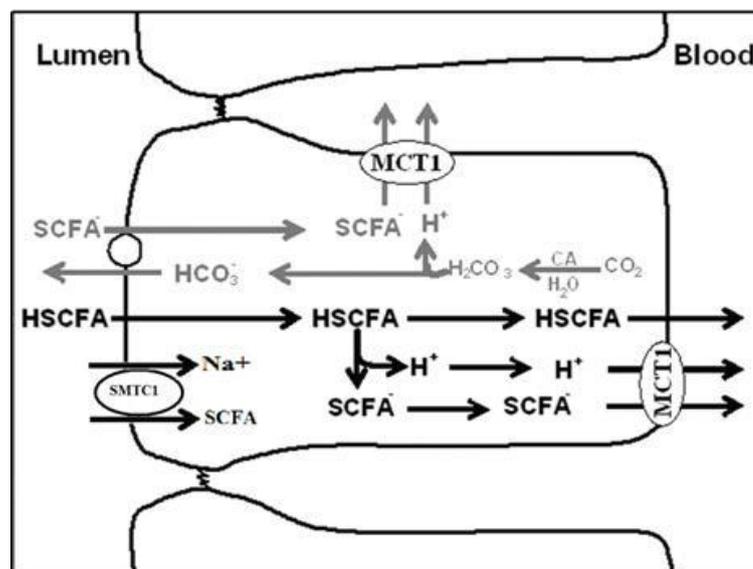


**Figura 5** Vias básicas de produção da variedade de metabolitos de SFCA pela fermentação de bactérias do cólon. Retirado de, Hijova, 2007

A produção deste tipo de SCFA permite um fornecimento de energia, principalmente a partir de fontes de carbono, tal como fibra alimentar que não é digerida no intestino delgado. Estima-se que os SCFAs podem contribuir para cerca de 5 a 15% da necessidade calórica total dos seres humanos (Hamer *et al.*, 2008).

As concentrações molares totais ou relativas de SCFAs (acetato, proprionato e butirato) produzidas no intestino humano dependem do local de fermentação, da dieta e da composição da microflora intestinal. Concentrações absolutas de butirato nas fezes humanas foram encontradas num intervalo de 11 a 25 mM, e os rácios molares de acetato, proprionato e butirato variam entre 48:29:23 e 70:15:15, respetivamente, com valores médios de aproximadamente 60:20:20. Contudo, a produção total de SCFAs no cólon é difícil de determinar, uma vez que mais de 95% dos SCFAs são rapidamente absorvidos e metabolizados pelo hospedeiro. Consequentemente, as concentrações fecais de SCFAs não são necessariamente representativas das concentrações que estão presentes no cólon proximal e podem também ser afetadas pelo tempo de trânsito intestinal. Provavelmente, por estas razões, em vários estudos não foi possível demonstrar as concentrações derivadas dos diferentes substratos passíveis de serem fermentados, nas concentrações de SCFAs fecais (Hijova and Chmelarova, 2007; Scharlau *et al.*, 2009).

Mais de 90% dos SCFAs existem na forma aniónica, dissociada, no lúmen do cólon. Vários mecanismos de captação de SCFAs pela membrana apical das células de revestimento têm sido propostos, incluindo a difusão da forma não dissociada (lípidos solúveis), a troca de SCFA/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e o transporte ativo da forma dissociada pelos transportadores de SCFAs, de acordo com o representado na Figura 6. Dois transportadores de SCFAs foram reportados (Kirat and Kato, 2006; Martin *et al.*, 2006).



**Figura 6.** Vários mecanismos de captação de SCFAs pela membrana apical das células do revestimento do cólon. A figura demonstra a absorção de SCFA pelos colonócitos ocorrendo por difusão da forma não dissociada, troca de SCFA/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e o transporte ativo pelos transportadores de SCFAs. Adaptado de Kirat & Kato, 2006.

O butirato é transportado para o interior das células epiteliais do cólon por dois sistemas de transporte específicos mediados por transportadores de monocarboxilatos: o transportador de monocarboxilatos eletroneutro do tipo I acoplado ao  $H^+$  (MCT1, gene *SLC16A1*) e o transportador de monocarboxilatos eletrogénico do tipo I acoplado ao  $Na^+$  (SMCT1, gene *SLC5A8*). O papel do butirato no desenvolvimento do CCR é apoiado pela subexpressão dos transportadores de butirato (MCT1 e SMCT1) em amostras de cancro de cólon humano (Gill *et al.*, 2005; Kirat and Kato, 2006). Estes transportadores, quando subexpressos, originam numa baixa captação e metabolismo do butirato nas células do cólon. Como mencionado, um dos efeitos benéficos do butirato na saúde intestinal humana é a prevenção e/ou inibição da carcinogénese do cólon e de acordo com esse facto, tanto o MCT1 como o SMCT1 foram recentemente propostos como genes supressores tumorais, muito provavelmente devido à sua capacidade de mediar a captação do butirato pelas células epiteliais do cólon (Ganapathy *et al.*, 2008).

Os mecanismos de transporte envolvidos na transferência do butirato através da membrana basolateral ainda não estão claros. Para funcionar, o MCT1 transloca um protão e um monocarboxilato através da membrana plasmática por um mecanismo ordenado, no qual a ligação de  $H^+$  é seguida pela ligação do monocarboxilato ao transportador protonado. A direção do fluxo de monocarboxilatos depende do gradiente químico de  $H^+$  e de monocarboxilatos através da membrana (Kirat and Kato, 2006).

O *SLC5A8* codifica um transportador de sódio pertencente à família de genes de transportadores de solutos *SLC5*. A especificidade de substratos de SMCT1 é muito semelhante ao previamente referido MCT1, neste caso sendo o transporte via SMCT1 acoplado ao transporte de  $Na^+$ . Baseado na sua função de transporte, o SMCT1 foi nomeado como *sodium-coupled monocarboxylate transporter* (SMCT). No cólon, este transportador medeia a entrada de SCFAs acoplado a  $Na^+$  do lúmen para as células do colón (Paroder *et al.*, 2006).

### **I.3. BUTIRATO E A CÉLULA TUMORAL**

Vários estudos demonstram como o butirato pode afetar as células cancerígenas. Entre outros, demonstrou-se que o butirato é um inibidor das desacetilases de histonas (HDAC, do inglês *histone deacetylases*) induzindo a paragem do ciclo celular, a apoptose e a diminuição da expressão de HIF-1 $\alpha$ . É também capaz de modular a via de sinalização Wnt,

modulando a transcrição de genes-alvo. O crescimento tumoral e a metastização são altamente dependentes da neoangiogénese e foi verificado que o butirato tem capacidade de inibir o processo angiogénico.

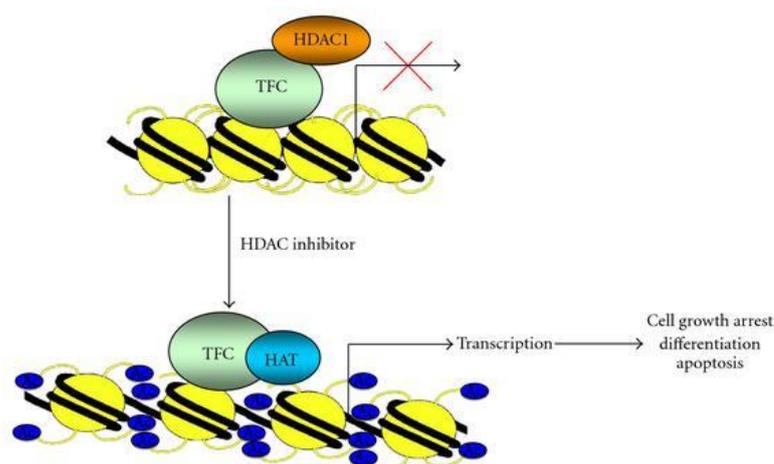
### **I.3.1. BUTIRATO COMO INIBIDOR DAS HDACs**

Entre vários estudos, demonstrou-se o que o butirato é um inibidor das HDACs. A iniciação e a progressão do cancro são controladas por alterações genéticas e epigenéticas. Os mecanismos de regulação epigenética estão relacionados com enzimas envolvidas na acetilação e na metilação das histonas, e na metilação e na desmetilação das regiões CpG do ADN. As HDACs são importantes para a expressão génica, uma vez que os níveis destas estão mais aumentados nas células tumorais e diferem de acordo com o tipo de cancro (Stiborová *et al.*, 2012; Witt *et al.*, 2009). Por exemplo, a HDAC1 é altamente expressa no cancro da próstata, no cancro gástrico, no cancro do pulmão, no cancro do esófago e no cancro da mama. Altos níveis de HDAC2 foram encontrados no CCR, no cancro do colo do útero e no cancro gástrico. Além disso, a HDAC3 é expressa em tumores da mama e do cólon, enquanto HDAC6 é altamente expressa em células de neuroblastoma (Godman *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008).

A supressão das HDACs faz com que a que a cromatina não seja condensada e este processo conduz ao aumento da acessibilidade do ADN para a síntese ou expressão génica do mesmo. Alguns trabalhos demonstram que o decréscimo da atividade das HDACs está associado à supressão do desenvolvimento das células tumorais (Ma, *et al.*, 2009; Minucci and Pelicci, 2006). A mudança para um maior estado de acetilação numa variedade de tumores a partir da inibição das HDACs pode resultar na modificação da expressão de vários genes, tais como genes envolvidos em processos de sinalização como ERK ou vias de sinalização Wnt, podendo influenciar o sistema proteossoma, a atividade de algumas cinases (cinase C) e a desmetilação do ADN (Bordonaro, Lazarova and Sartorelli, 2007).

Apesar dos resultados promissores dos inibidores de HDACs obtidos *in vitro*, a sua eficácia na terapia isolada em certos tipos de tumor foi muito reduzida. Contudo, a combinação dos inibidores de HDACs com as terapias convencionais aumentaram a eficácia anti-cancerígena destas, revelando a sua potencialidade na clínica em combinação com radiação ionizante ou quimioterapia (Stiborová *et al.*, 2012).

Estruturalmente, vários inibidores de HDAC induzem a morte celular por diferentes processos, isto é, dependendo do tipo de células têm diferentes alvos celulares. Estes mecanismos incluem modificações na expressão génica e alterações das histonas, mas também, em proteínas que não pertençam às histonas, pelas modificações epigenéticas e pós-translacionais, como podemos verificar na Figura 7 (Federico and Bagella, 2011).



**Figura 7.** Mecanismos de ação dos inibidores de HDACs; Retirada de Federico & Bagella, 2011.

Estudos realizados anteriormente permitiram perceber que o butirato, como inibidor das HDACs, induz a paragem do ciclo celular, a apoptose e a diminuição da expressão de HIF-1 $\alpha$ .

O butirato induz o aumento da expressão de genes do ciclo celular como o CDKN1A que codifica a proteína P21 (Wang *et al.*, 1999). Numa variedade de células tumorais, a inibição das HDACs causa a sobre-expressão da proteína P21, que bloqueia a formação de dímeros das “ciclina e ciclina dependentes de cinases”. Esta ocorrência leva à paragem do ciclo celular e à inibição da diferenciação celular (Minucci and Pelicci, 2006). A biossíntese da P21 é modulada pela proteína supressora tumoral P53. Sobre condições de stress, a proteína P53 interage com o local Sp1 do promotor da P21, competindo com HDAC1, que diminui a transcrição de P21. Quando as células são tratadas com inibidores de HDAC, a proteína HDAC1 é libertada do local Sp1 e, este processo leva ao aumento da expressão de P21. Além disso, a inibição de HDAC resulta no aumento da expressão da proteína P53 acetilada levando ao aumento do seu tempo de semi-vida (a hiperacetilação estabiliza a proteína P53) o que facilita a interação com o promotor da P21. Por outro lado,

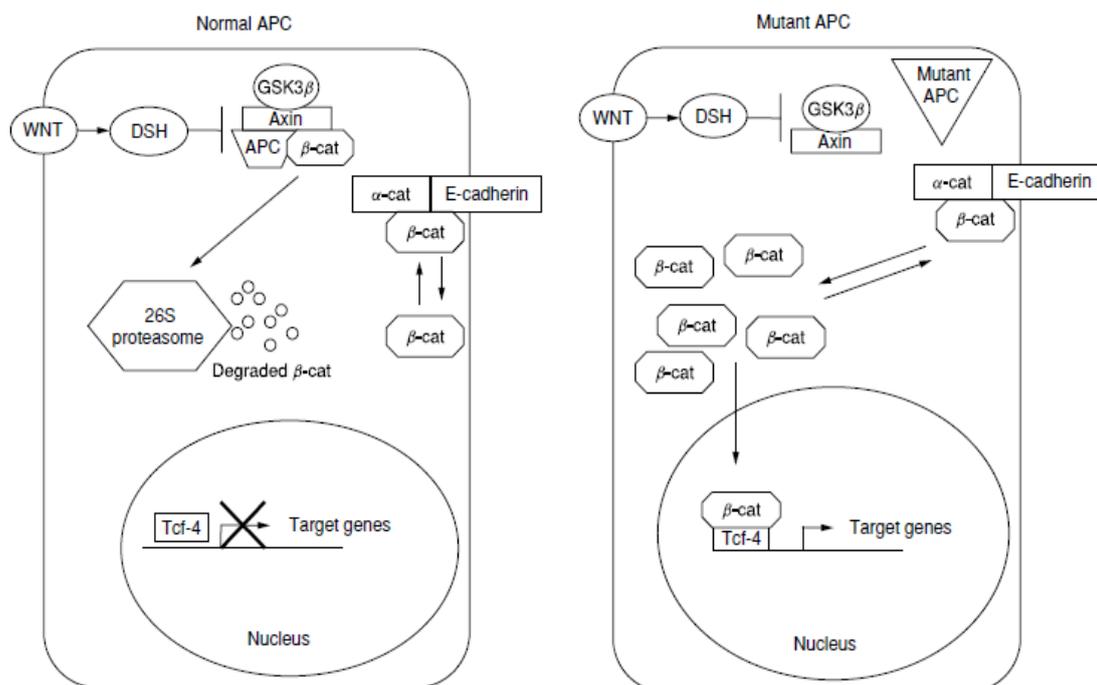
tem sido demonstrado que o butirato é capaz de subregular a ligação de Sp1 e de sobrerregular a ligação de Sp3. Sendo o Sp1 e o Sp3 fatores de transcrição responsáveis pela promoção da P21, o butirato leva, então, ao aumento da expressão de P21 e, consequentemente, à paragem do ciclo celular (Davie, 2003).

A apoptose induzida por inibidores das HDACs, nomeadamente pelo butirato, foi demonstrada estar associada tanto pela via intrínseca como pela via extrínseca. Estudos verificaram que estes inibidores eram capazes de regular o nível da expressão de algumas proteínas, tais como a BID, a BAD e a BIM que funcionam como ativadores da via apoptótica intrínseca. Outros verificaram a expressão de algumas proteínas pró-apoptóticas ativadoras da via extrínseca com a TRAIL, a DR5, a FAS e o TNF- $\alpha$  (Stiborová *et al.*, 2012). Estudos com butirato demonstraram que este, apesar de induzir a apoptose pela paragem do ciclo celular, induz também o aumento da expressão de BAK que, no final, leva à morte celular por apoptose (Yu *et al.*, 2010). Outros estudos verificaram a capacidade do butirato influenciar o TRAIL (do inglês *tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand*) ao sensibilizar linhas celulares cancerígenas conhecidas por serem resistentes pelo TRAIL (Hernandez *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004).

O HIF-1 $\alpha$  é uma proteína pertencente à família das HIF (*hypoxia-inducible factors*) que são fatores de transcrição em resposta à variação da concentração de oxigénio, mais em específico, ao decréscimo e privação de oxigénio. Esta proteína é responsável pelo aumento da angiogénese em condições de hipóxia, sendo a proteína principal que induz a síntese de VEGF. A sua interação com diferentes isoformas de HDACs aumenta a sua atividade de transcrição, promovendo a progressão do tumor. Assim o butirato interage indiretamente com HIF-1 $\alpha$ . Isto é, como inibidor das HDACs provoca a diminuição da interação de HIF-1  $\alpha$  com HDAC, levando a uma menor presença de HIF-1 $\alpha$  no núcleo, impedindo que este seja um fator de transcrição para a síntese de VEGF (Giles *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2010).

### I.3.2. BUTIRATO COMO INIBIDOR DA TRANSCRIÇÃO DE GENES-ALVO

O butirato tem efeito sobre a via de sinalização Wnt. Como é possível observar na Figura 8, quando a proteína APC está mutada, a  $\beta$ -catenina não é degradada. Nestas condições, a  $\beta$ -catenina é translocada para o núcleo onde se liga com Tcf4 e ativa a transcrição de vários genes alvo (Sancho, *et al.*, 2004).



**Figura 8.** Via de Sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina em células com o complexo APC normal (à esquerda) e em células com o complexo APC mutado (à direita). Retirado de Martinez *et al.*, 2003.

Em alguns estudos realizados em linhas celulares tumorais tratadas com butirato verificou-se um aumento da morte celular por apoptose, quando a proliferação destas dependiam da hiperatividade da via de sinalização Wnt canónica. Este facto poderá dar origem a novas abordagens para o tratamento de tumores que dependam da atividade da via sinalização Wnt. Estudos realizados por Goldman e colaboradores reportaram que inibidores das HDACs, estruturalmente diferentes, também são capazes de modular a via de sinalização Wnt em células do CCR (Billin, *et al.*, 2000; Godman *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Yamaguchi *et al.*, 2005).

Um dos estudos realizados demonstrou que um dos possíveis mecanismos envolvidos neste efeito poderá ser a presença de HDAC3. A HDAC3 é sobreexpressa pelas células tumorais e desempenha um papel importante no desenvolvimento do cancro do cólon.

Nesse estudo constatou-se que uma maior presença de HDAC3 potenciava a via Wnt e estabilizava a  $\beta$ -catenina no núcleo. Na ausência de HDAC3, a quantidade de  $\beta$ -catenina no núcleo era bastante menor. Ao tratarem as células com butirato, um inibidor das HDAC, verificaram que os níveis de  $\beta$ -catenina no núcleo eram menores e encontravam-se em maior quantidade no citoplasma. Uma vez ausente no núcleo, não há ligação da  $\beta$ -catenina com Tcf4 e não há a transcrição de vários genes alvo, como o VEGF. Alguns dos genes alvo da  $\beta$ -catenina são descritos na seguinte tabela (Tabela 1) (Clifford *et al.*, 2008; Orlandini *et al.*, 2003).

**Tabela 1.** Genes alvos da  $\beta$ -catenina relacionados com o cancro.

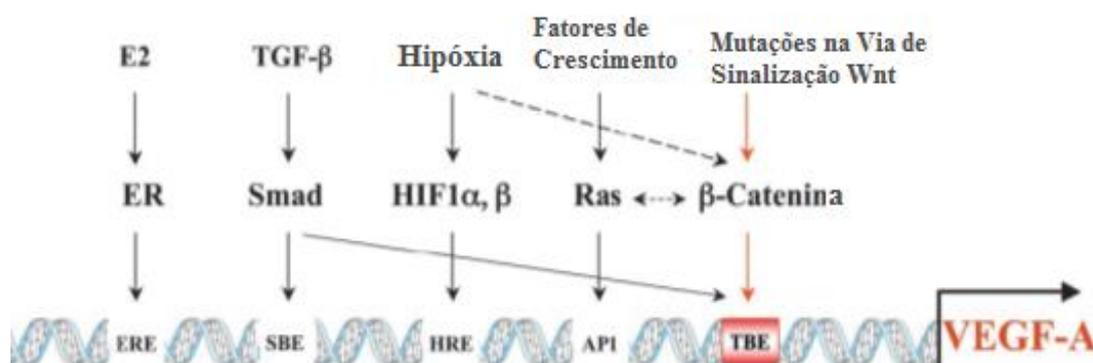
<b>Alvos genéticos da <math>\beta</math>-catenina relacionados com o cancro</b>	
<b>Função</b>	<b>Gene Alvo</b>
Proliferação Celular	C-myc; Ciclina D1
Inibição da Apoptose	MDR1/PGP; COX-2; PPAR $\delta$
Progressão do Tumor	MMPs; uPAR, Upa; CD44;
Fatores de Crescimento	c-met; VEGF; WISP-1; BMP-4

### **1.3.3. BUTIRATO COMO INIBIDOR DA ANGIOGÊNESE**

O crescimento tumoral e a metastização são altamente dependentes da neoangiogénese, a fase inicial do desenvolvimento de novos vasos sanguíneos. Este processo pode ser originado a partir de vasos sanguíneos pré-existentes, células endoteliais circulantes ou de precursores de células endoteliais provenientes da medula óssea (Luczyńska and Anioł, 2013).

Diferentes estudos verificaram que o butirato tem capacidade de inibir o processo de angiogénese em linhas celulares tumorais, sendo capaz de subregular a expressão de VEGF-A (Pellizzaro and Coradini, 2002; Yu *et al.*, 2010). O VEGF-A é um dos principais reguladores da patologia e da fisiologia da angiogénese. A expressão de VEGF-A é sobrerregulada em numerosos tumores sólidos incluindo os carcinomas colorretais primários e metastáticos. A expressão de VEGF-A é regulada a nível da transcrição, num complexo de numerosos mecanismos oncogénicos e de supressores tumorais e de condições de hipóxia (Giles *et al.*, 2006). No CCR, evidências pré-clínicas e estudos clínicos têm demonstrado o envolvimento do processo de angiogénese para o crescimento tumoral e para a sua metastização. Além

disso, estes estudos demonstraram que o VEGF-A é o fator principal da angiogénese. Tal como já referido, o gene *APC* é um mediador crítico da resposta transcripcional da via Wnt, regulando negativamente os níveis de  $\beta$ -catenina. Alguns trabalhos sugerem que a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina regula o desenvolvimento de vasos sanguíneos em condições normais e patológicas. Um destes trabalhos reportou o gene *VEGFA* como um gene alvo da  $\beta$ -catenina na linha celular HeLa e em linhas celulares de CCR, de modo que nas células humanas de CCR, a  $\beta$ -catenina induz a formação de mRNA de *VEGFA* e a sua expressão proteica tal como representado na Figura 9 (Billin *et al.*, 2000).



**Figura 9.** VEGF-A é um alvo da  $\beta$ -catenina. O diagrama demonstra as múltiplas vias de sinalização, incluindo a  $\beta$ -catenina, que regulam VEGF-A. Adaptado de Easwaran *et al.*, 2003.

Dois genes são considerados sinteticamente letais se, e só se, a mutação de cada um permitir a viabilidade celular mas, em simultâneo, levar à morte celular. Naik *et al.* identificaram o VEGFR-1 como parceiro sinteticamente letal da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, na medida em que verificaram a existência de uma relação direta entre a função do recetor e a via de sinalização nas células de CCR, sugerindo este conceito como uma nova abordagem na terapia do CCR (Naik *et al.*, 2009).

Por outro lado, sabe-se também que o butirato regula a expressão de NRP-1 e de NRP-2 (do inglês *Neuropilin 1 e 2*), recetores não-tirosina cinases que se ligam com membros específicos da família VEGF. O NRPI liga-se com o VEGF165, o VEGF-B, o VEGF-E e o fator 2 de crescimento de placenta (Figura 10). O NRPI é expresso no epitélio do cólon normal e é normalmente sobreexpresso no CCR, sendo correlacionado com o grau de invasibilidade, em geral avançado, potencialmente metastático, e com a diminuição da sobrevivência do doente (Yu *et al.*, 2010).

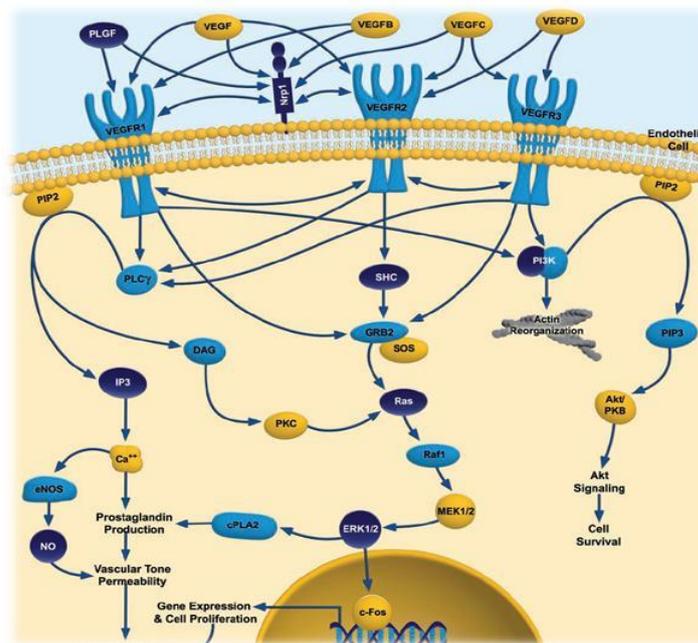
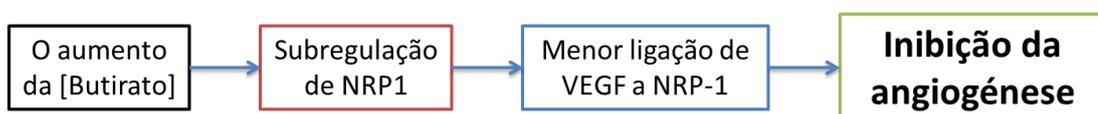


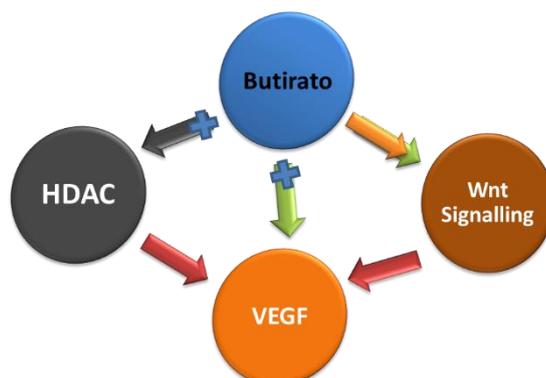
Figura 10. Representação da função de NRP1 na célula. Adaptado de Yu et al., 2010.

Estudos clínicos indicam que a expressão de NRP-I tem uma grande incidência em metástases, um elevado índice de proliferação e um reduzido número de células tumorais em apoptose comparado com um tumor com subexpressão de NRP-I, sugerindo que o NRP-I protege o tumor da apoptose. Curiosamente, a subexpressão de NRP-I induzida por siRNA tem demonstrado o aumento da sensibilidade de células tumorais à quimioterapia, pela indução da apoptose. Um estudo feito em células HT29, Caco2 e HCT116 demonstrou que o tratamento com 5 mM de butirato induziu uma subregulação da expressão de NRP-I, levando à redução da ligação de VEGF e, conseqüentemente, à inibição da angiogénese (Yu et al., 2010).



Em suma, o butirato poderá ter um papel fundamental nestes 3 mecanismos de crescimento das células tumorais de acordo com o representado na figura 11. Ou seja, o butirato, sendo um inibidor das HDACs, promove um relaxamento da cromatina e a expressão de certas proteínas, como a P21 que, por sua vez, induzem a paragem do ciclo

celular. Esta molécula tem efeito na  $\beta$ -catenina, impedindo que a  $\beta$ -catenina interaja com o Tcf4 e, conseqüentemente, a transcrição de vários genes alvo, como VEGF por esta via. Para além disso, inibe o processo angiogénico, isto é, induz a subexpressão de NRP-1 e, conseqüentemente, a diminuição da ligação de VEGF a estes recetores. Por outro lado, o efeito do butirato sobre a via de sinalização Wnt também é responsável pela inibição do processo angiogénico por esta via (Han and Na, 2010; Pajak, *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010).



**Figura 11.** Esquema representativo das vias de atuação do butirato. O butirato é um inibidor das HDACs, inibe o processo angiogénico e tem efeito na entrada da  $\beta$ -catenina no núcleo.

Tendo em conta a modulação induzida pelo butirato em diferentes mecanismos de crescimento celular, a sua combinação com outros agentes terapêuticos que atuam de forma compensatória em mecanismos de dano de ADN e processos antiangiogénicos em células tumorais, poderá constituir uma nova abordagem de terapia para o CCR.

#### 1.4. BUTIRATO NA TERAPIA

Há mais de 30 anos que o butirato tem sido investigado como um potencial agente terapêutico para o tratamento do cancro baseado na sua capacidade de causar a diferenciação e a paragem do ciclo celular, induzir a apoptose e contribuir para o processo antiangiogénico. Mas, para a obtenção de níveis fisiologicamente relevantes para a terapêutica é necessário que a administração do mesmo seja contínua e por via intravenosa. Algumas alternativas têm sido consideradas, sendo que uma delas consistiu na administração da molécula tributirina, um triglicerídeo que contém na sua estrutura 3 moléculas de

butirato esterificadas a um glicerol. A tributirina pode ser hidrolisada, tanto por soluções aquosas ácidas como neutras, ou mesmo por esterases do plasma. Num estudo, com a administração de tributirina foi possível obter concentrações de butirato no sangue acima de 0,45 mM até 4 horas, tendo esta que ser administrada 3 vezes ao dia, dose que revelou ser bem tolerada (Egorin *et al.*, 1999). Outro estudo, em cancro da próstata, demonstrou um efeito substancial *in vivo*, induzido pela administração de butirato na forma de tributirina por via oral (Kuefer *et al.*, 2004). Demonstrou-se uma considerável inibição do crescimento tumoral e uma atividade pro-apoptótica. Estes efeitos pareceram ser independentes do estado da P53, mas possivelmente dependentes da via de sinalização que inclui a P21, Rb e c-myc (Kuefer *et al.*, 2004).

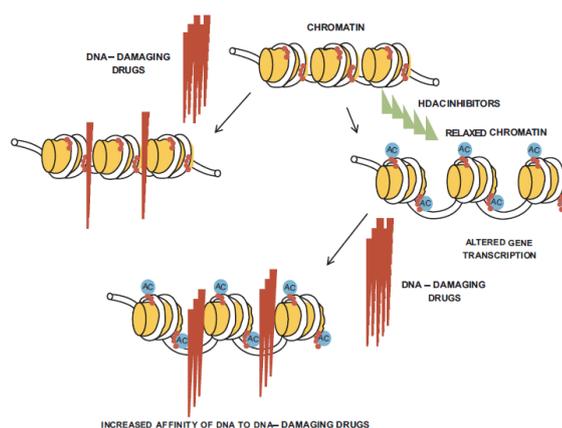
A tributirina foi administrada oralmente, com toxicidade mínima, tendo vários doentes continuado em terapia durante meses. Demonstrou-se em vários estudos que a administração de tributirina por via oral era segura, evidenciando o facto da terapia intravenosa ser mais cara e menos atrativa. Apesar dos esforços, a tributirina ainda apresentava alguns problemas, pois o tempo de semi-vida do butirato no sangue era curto, o que, conseqüentemente, provocaria níveis irregulares de butirato durante a exposição pretendida e limitava o uso deste fármaco na clínica (Marc and Sausville, 1998).

Assim, outras alternativas surgiram, como o uso de análogos da molécula de butirato. Um destes estudos, consistiu na análise do poder terapêutico da molécula *3n-Butyrate*, um derivado com um maior tempo de semi-vida no sangue e mais eficaz que o butirato. Estudos preliminares sobre a toxicologia e a farmacocinética do composto indicaram que este era desprovido de efeitos toxicológicos e persistia por várias horas no sangue dos murganhos em estudo, sendo 30 a 40 vezes mais estável que o próprio butirato. Neste estudo foi avaliada a combinação deste composto com o agente de 1ª linha de quimioterapia no CCR, o 5-FU. Os autores deparam-se com um resultado promissor, onde a combinação dos 2 fármacos inibiu 16 tumores humanos de CCR *in vivo*, enquanto no tratamento isolado, o 5-FU só inibiu o crescimento de três e a molécula *3n-Butyrate* isoladamente não tinha qualquer efeito sobre eles. Desta forma, foi demonstrado que havia sinergia com a combinação destas duas moléculas. (Bras-Gonçalves *et al.*, 2001).

Os resultados obtidos *in vivo* e em doentes em vários estudos podem fornecer uma estratégia racional, em novos ensaios clínicos bem controlados sobre a aplicação destes inibidores de HDACs tanto como reguladores genéticos na quimioprevenção em doentes com um alto risco de uma recaída depois de uma terapia específica, ou como reguladores

genéticos na quimioprevenção em combinação com outros regimes de tratamento de alguns tipos de cancro em estadio avançado (Minucci and Pelicci, 2006). A utilização do butirato ou dos seus análogos, por via oral, poderá constituir uma boa estratégia para alternativas de tratamento ou de sensibilização das células tumorais com combinação de fármacos usados convencionalmente na quimioterapia.

As combinações entre fármacos são desde sempre utilizadas no tratamento de doenças numa procura de efeitos sinérgicos ou potenciadores, ao mesmo tempo que se pretende diminuir os efeitos secundários. Cada vez mais tem existido uma tentativa de quantificar a relação entre a dose e o efeito de um fármaco quando administrado isoladamente e em combinação. O raciocínio que está por detrás da terapia combinada tem como base a possibilidade de se atingir, ao mesmo tempo, vários alvos da doença. Se os fármacos tiverem modos de ação diferentes, serão dois mecanismos diferentes a combater a mesma doença. Deste modo, através da junção de dois ou mais fármacos poderá haver



**Figura 12.** Um mecanismo proposto da ação de um inibidor de HDAC levando ao aumento do dano de ADN mediado por fármacos que danificam o ADN. Retirado de Stiborová, et al., 2012.

aumento da eficácia da terapia, comparativamente à eficácia obtida com cada fármaco isoladamente. Por outro lado, poderá ser possível diminuir a concentração dos fármacos, mantendo ou melhorando a eficácia, de forma a reduzir a sua toxicidade. Outra vantagem da terapia combinada é a minimização da resistência aos fármacos (Chou, 2007).

Um estudo recente demonstrou, pela primeira vez, que a modulação da dieta com o fim da otimização de produção de butirato reduz a toxicidade induzida pelo irinotecano. Este resultado pode ser explorado para reduzir a morbilidade e melhorar a tolerância da administração do irinotecano (Lin *et al.*, 2014).

Assim neste trabalho pretende-se avaliar se existe um potencial sinérgico entre o butirato e o irinotecano e, se esta combinação poderá ser uma abordagem terapêutica. Uma

vez que o butirato é capaz de inibir as HDACs, conseqüentemente a cromatina fica mais relaxada e, leva a que o ADN fique mais exposto à ação do irinotecano (Figura 12). O estudo das proteínas envolvidas nos mecanismos referidos acima poderá permitir conhecer o mecanismo sinérgico entre estes dois compostos.

### **1.5. OBJETIVOS DO PRESENTE TRABALHO**

Tendo o CCR uma elevada taxa de mortalidade e atendendo a que a elevada toxicidade dos fármacos antineoplásicos convencionalmente usados é muitas vezes limitante da dose ou até mesmo a razão para a interrupção da quimioterapia, é emergente a necessidade de novas terapias para o combate do CCR. A relevância deste trabalho é apoiada em estudos que reforçam o papel do butirato na quimioprevenção ou em combinação com a quimioterapia existente, na qual o irinotecano se inclui, tendo como objetivo a procura de uma sinergia que traduza a melhoria da eficácia e a diminuição da toxicidade do tratamento.

Desta forma, pretende-se com a realização deste trabalho: avaliar o efeito que o butirato exerce sobre três linhas celulares humanas de cancro do cólon (C2BBel, LSI034 e WiDr), uma linha celular humana de fibroblatos (HFF1) e uma linha celular humana do cólon normal (CCD-841 CoN); avaliar o efeito do irinotecano e da sua combinação com o butirato nas três linhas celulares de cancro de cólon acima referidas (C2BBel, LSI034 e WiDr). Pretende-se também avaliar somente o efeito do butirato na linha LSI034 em modelos animais ortotópicos e, em modelos de animais heterotrópicos avaliar o efeito do butirato, do irinotecano e da combinação na linha WiDr *in vivo* em modelos animais heterotópicos.



## 2. MATERIAIS E MÉTODOS



## **2.1. ESTUDOS *IN VITRO***

O objetivo de realizar estudos *in vitro* para a avaliação do efeito terapêutico da combinação entre o butirato e o irinotecano deve-se ao facto de constituírem uma primeira abordagem para a análise do seu efeito e fornecerem informações preliminares para seguir com o processo experimental. Foram realizados em células e em ambiente controlado, sendo o principal foco investigar os efeitos de uma determinada variável experimental, num pequeno grupo de constituintes de um organismo.

Deste modo, pretendeu-se determinar os mecanismos de ação biológica, sem que haja a interferência de outras variáveis a influenciar os resultados, sendo este o motivo pelo qual a componente *in vitro* têm um carácter fundamental no desenvolvimento deste tipo de estudos.

De modo a avaliar o efeito que advém da combinação do butirato com o irinotecano, utilizaram-se três linhas celulares humanas de cancro do cólon, duas do cólon esquerdo, a C2BBel e a WiDr, e uma do cego, denominada LS1034.

Para avaliar uma possível toxicidade do butirato em linhas celulares normais, usaram-se duas linhas celulares humanas, a HFF1 (linha celular normal de fibroblastos) e a CCD-841 CoN (linha celular normal do cólon).

### **2.1.1. CULTURAS CELULARES**

As culturas celulares possuem como objetivo o cultivo e a propagação de células dispersas, sendo necessário o estabelecimento de condições rigorosas de assepsia e de esterilidade. Assim, para os estudos *in vitro* foram utilizadas as linhas celulares de cancro do cólon C2BBel, LS1034 e WiDr, estas adquiridas e certificadas pela American Type Culture Collection (ATCC).

As células C2BBel formam uma monocamada polarizada em forma de escova na zona apical, comparável morfológicamente ao cólon humano, e são um clone das células CaCo-2 (Peterson and Mooseker, 1992). Esta linha celular não possui expressão de P53 (Abrantes, 2013). A linha celular LS1034 foi isolada do cego de um doente com cancro do cólon, que na classificação de Dukes, se encontrava no estadio C (estadio III). Estas células possuem mutações em diferentes genes nomeadamente o que codifica a proteína P53, originando a troca de glicina por serina na posição 245, e o gene que codifica a proteína APC devido a uma deleção no códon 1309 (GAAAAGATT ficou GATT). É de salientar o facto de

esta linha celular ser quimiorresistente, com sobreexpressão da glicoproteína-P (gp-P) (Casalta-Lopes, 2011). A linha celular WiDr tem a particularidade de também expressar uma forma mutada da P53 (mutação na posição 273, onde houve a troca de arginina por histidina). Para além disto, à semelhança da linha LS1034, também as outras duas linhas celulares possuem mutação no gene APC (Ilyas *et al.*, 1997).

As linhas celulares utilizadas foram propagadas em cultura aderente e de acordo com as instruções do seu fornecedor, a *American Type Culture Collection* (ATCC), mantidas a 37°C em atmosfera humificada com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> em incubadora *Binder*.

A linha celular LS1034 foi propagada em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute Medium*, RPMI-1640 (Sigma, R4130), e as linhas celulares C2BBel e WiDr foram propagadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM (Sigma, D5648). Ambos foram suplementados com 5% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*, Sigma, F7524), 1% de antibiótico (Sigma, A5955), 1 mM de piruvato de sódio (Gibco, I1360) para o RPMI e 0,25 mM para o DMEM.

Como já foi referido, as linhas celulares formam uma monocamada, crescendo aderentes ao suporte sólido. Estas células necessitam, para a realização de estudos *in vitro*, de ser transferidas para outros suportes sólidos, tendo-se para tal recorrido a métodos enzimáticos, de modo a preparar suspensões celulares. Assim, inicialmente procedeu-se à lavagem das culturas celulares com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Saline*, constituído por 137 mM de NaCl (Sigma, S7653), 2,7 mM de KCl (Sigma, P9333), 10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma, S5011) e 1,8 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma, P0662) [pH 7,4]), e incubaram-se a 37°C com 2 mL de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma, T4049) ou TrypLE Express™ (Gibco, 12605-028) durante o tempo necessário para que as células se soltassem do frasco, tendo sido este tempo otimizado para cada linha celular. De seguida, adicionaram-se pelo menos 4 mL de meio de cultura a fim de inativar a solução enzimática, homogeneizou-se a suspensão celular e procedeu-se à determinação da concentração de células.

Para tal diluiu-se um volume conhecido de suspensão celular em igual volume de azul tripano e procedeu-se à contagem num microscópio invertido (Motic, AE31) com ampliação de 10 vezes utilizando para tal um hemocitómetro (Figura 13). O método do azul tripano permite fazer uma contagem de células numa suspensão celular. Esta técnica é simples e não dispendiosa, fornecendo informação fiável do número total de células da suspensão celular (Sarma *et al.*, 2000; Vierheilig *et al.*, 2005).



**Figura 13.** Hemocitómetro e técnica de contagem celular utilizando o método de exclusão do azul tripano.

Por último, adicionou-se meio de cultura à suspensão celular de forma a obter a concentração celular pretendida, de acordo com o estudo a realizar.

### **2.1.2. ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE**

Para todos os estudos de citotoxicidade foram preparadas soluções de butirato (Sigma, 303410) e de irinotecano (composto cedido pelo Serviços Farmacêuticos do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra) de concentração apropriada, de modo a que a sua adição apenas alterasse no máximo em 1% o volume do meio de cultura dos compartimentos celulares.

Nos ensaios com butirato foi utilizado um controlo em que não houve administração de qualquer composto e para os ensaios com irinotecano ou com a combinação de butirato com irinotecano, foram realizados dois controlos: culturas celulares em que não houve administração de qualquer composto e culturas celulares tratadas com o solvente do irinotecano, ou seja, dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, D4540). Todas as soluções utilizadas foram previamente filtradas utilizando filtros de acetato celulose de 0,22  $\mu\text{m}$  (Syringe Filter; Frilabo, I520012).

### 2.1.2.1. BUTIRATO

Numa primeira fase, apesar do objetivo deste trabalho ter sido a avaliação do efeito do butirato em combinação com o irinotecano, foi necessário conhecer o efeito de cada um dos compostos individualmente. Deste modo, para avaliar a ação citotóxica do butirato, as culturas celulares foram incubadas com diferentes concentrações de butirato que variaram entre 1 mM e 50 mM.

### 2.1.2.2. IRINOTECANO

De modo a avaliar o efeito do irinotecano individualmente nas três linhas celulares, procedeu-se à incubação das mesmas com concentrações de irinotecano que variaram entre 1  $\mu$ M e 200  $\mu$ M.

### 2.1.2.3. BUTIRATO E IRINOTECANO

Para verificar o tipo de resposta induzida pela combinação do butirato com o irinotecano, foi utilizado o método de Chou e Talalay para avaliação da existência de sinergia, adição ou antagonismo (Chou, 2010). Este método avalia o tipo de resposta obtida a nível da proliferação celular com a utilização dos valores de  $IC_{50}$  (concentração que inibe a proliferação celular em 50 %), valores estes, que vão ser descritos posteriormente, obtidos para cada uma das terapias isoladamente e para a sua combinação, através da seguinte equação 1:

$$IC = \frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2} \quad (\text{eq. 1})$$

**Equação 1.** Índice de Combinação

em que IC representa o índice de combinação,  $(D)_1$  representa o valor do  $IC_{50}$  obtido para o efeito isolado do fármaco 1,  $(D)_2$  representa o  $IC_{50}$  obtido após o tratamento com o fármaco 2, e  $(Dx)_1$  e  $(Dx)_2$  representam os respetivos valores obtidos em combinação. Para valores

de IC inferiores a I é obtida sinergia, para valores iguais a I verifica-se efeito de adição, e para valores superiores a I verifica-se antagonismo.

Para esta avaliação foi utilizado  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{2}$  do valor do IC<sub>50</sub> obtido para a incubação das culturas celulares com o butirato, após 48, 72 e 96 horas de exposição, em combinação com concentrações crescentes de irinotecano (de 1 nM a 100  $\mu$ M). A adição do irinotecano efetuou-se a diferentes tempos: em simultâneo e 24 horas após a incubação com o butirato.

Para todas as condições referidas, foi verificada a resposta a nível da proliferação celular pela avaliação com o ensaio do MTT. Posteriormente, foram selecionadas as combinações mais promissoras para a realização de outras técnicas.

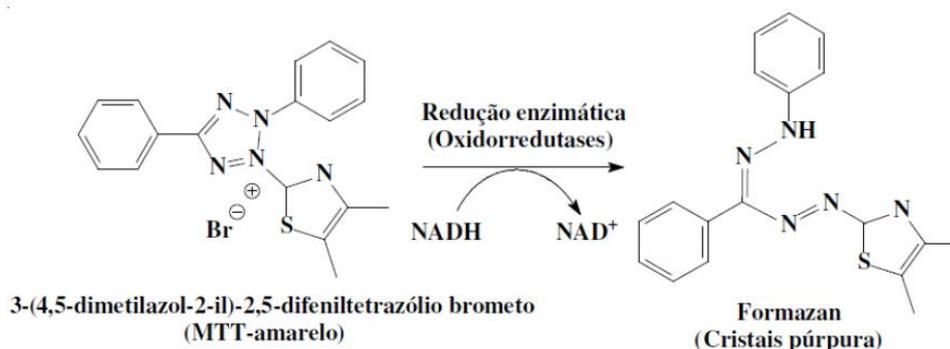
#### **2.1.2.4. DETERMINAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR**

Com o objetivo de estudar os efeitos citotóxicos do butirato, as três linhas celulares foram tratadas com concentrações crescentes dos dois compostos, butirato e irinotecano, e por diferentes períodos de tempo. Após incubação foi avaliada a atividade metabólica, por colorimetria, através do ensaio do MTT, representando esta uma medida da proliferação celular.

##### **2.1.2.4.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA PELO ENSAIO MTT**

O método do MTT, do inglês *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*, é baseado na capacidade da enzima desidrogenase, presente nas células metabolicamente ativas, clivar os anéis tetrazólio do MTT e formar cristais formazano de cor violeta, insolúveis em soluções aquosas. Este processo de redução está associado à função das desidrogenases, contudo também pode ser devido à ação de moléculas como NADH e NADPH (equivalentes redutores) (Figura 14) (Buch *et al.*, 2012). Consequentemente, o número de células metabolicamente ativas é proporcional à quantidade de cristais de formazano produzidos (Mosmann, 1983). Após se proceder à solubilização dos cristais de formazano, através da adição de solventes orgânicos, é possível quantificar por espectrofotometria a quantidade de cristais formados, sendo esta uma medida da atividade metabólica.

Para estes estudos, foi necessária uma suspensão celular com 50 mil células/mL em meio de cultura para as linhas WiDr e C2BBel e uma suspensão com 70 mil células/mL para a linha celular LSI034. Esta suspensão foi distribuída por placas de 48 poços, de forma a obter um volume final de 500  $\mu\text{L}$  por poço. Após 24h as células foram incubadas com diferentes concentrações de butirato (1 mM a 50 mM) e de irinotecano (1  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ) para a terapia isolada. Para cada uma das concentrações dos fármacos, a proliferação celular foi avaliada às 24, 48, 72 e 96 horas, de forma a construir curvas dose-resposta.



**Figura 14.** Representação esquemática da reação da redução de MTT (Adaptado de Ribeiro, 2013).

No caso da terapia combinada a concentração de butirato foi fixada ( $1/4$  e  $1/2$  do  $\text{IC}_{50}$  obtido na monoterapia), enquanto a de irinotecano foi variada (de 1 nM a 100  $\mu\text{M}$ ) e a proliferação celular foi avaliada às 48, 72 e 96 horas.

Para avaliar a proliferação celular, descartou-se o meio de cultura e procedeu-se a uma lavagem com PBS. Adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de MTT (0,5 mg/mL; Sigma, M2128) em PBS, pH 7,4. Após incubação no escuro, a 37°C, dissolveram-se os cristais de formazano pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de uma solução 0,04 M de ácido clorídrico em isopropanol e agitaram-se as placas até a dissolução total dos mesmos. Após a solubilização dos cristais, o conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços (Sarstedt, Alemanha), medindo-se posteriormente a absorvância num espectrofotómetro, usando o comprimento de onda de 570 nm e um comprimento de onda de referência de 620 nm (Langdon, 2004).

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da proliferação das células tratadas em relação às células controlo, normalizadas para 100%, utilizando a equação 2.

$$\% \text{ actividade metabólica} = \frac{(\text{Células Controlo})(\text{Abs}570\text{nm} - \text{Abs}620\text{nm})}{(\text{Células Tratadas})(\text{Abs}570\text{nm} - \text{Abs}620\text{nm})} \times 100 \quad (\text{eq.2})$$

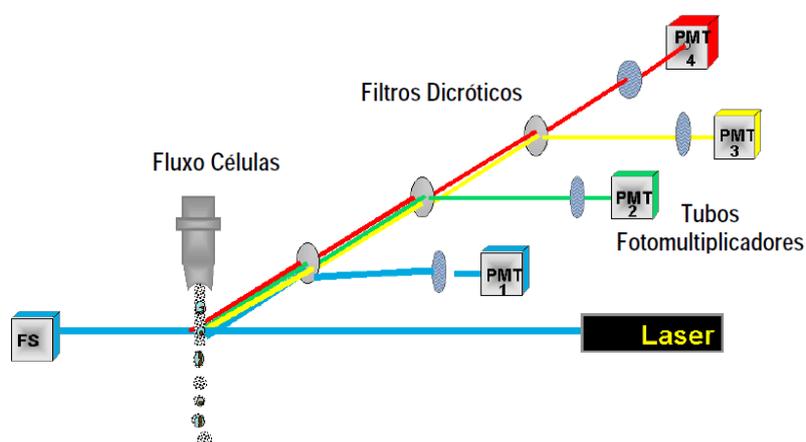
**Equação 2.** Equação de determinação da percentagem de inibição da atividade metabólica das células tratadas em relação às células controlo.

Os resultados obtidos foram analisados e processados no programa Origin Pro 8.0. Esta abordagem permitiu estabelecer curvas de dose-resposta e determinar os respetivos valores de IC<sub>50</sub>.

### 2.1.2.5. CITOMETRIA DE FLUXO

Como um dos objetivos deste trabalho consistiu em estudar os efeitos do butirato sobre os processos biológicos nas três linhas celulares cancerígenas, nomeadamente os processos de morte celular, o ciclo celular, e a avaliação da razão BAX/BCL-2, foi necessário recorrer a outro tipo de técnicas, como a citometria de fluxo.

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas num meio líquido em fluxo e que permite a análise de vários parâmetros simultaneamente. Através de um citómetro de fluxo é possível analisar as características físicas e/ou químicas de uma simples célula. Este aparelho é um sistema constituído por 5 elementos: uma fonte de luz, (lâmpada de mercúrio ou laser), uma câmara de fluxo, unidades de filtros óticos para seleção de um intervalo de comprimento de onda específico, a partir duma gama espectral mais vasta, fotodíodos ou fotomultiplicadores para a deteção sensível e possibilidade de processamento dos sinais com interesse e uma unidade



**Figura 15.** Esquema da constituição interna de um citómetro de fluxo. Adaptado de Tavares and Tavares, 2009.

que processa os dados recolhidos (Figura 15) (Tavares and Tavares, 2009).

O princípio da técnica consiste num feixe de luz de um único comprimento de onda que é direcionado para um meio líquido em fluxo. Vários detetores são apontados ao local onde o fluxo passa através do feixe de luz; um na linha do feixe de luz (*forward scatter* ou FSC) e vários perpendiculares a este (*side scatter* ou SSC). Cada partícula suspensa que atravessa o feixe dispersa a luz de uma forma, e os corantes químicos fluorescentes encontrados na partícula ou ligados à mesma podem ser excitados emitindo luz de menor frequência do que o da fonte de luz. Esta combinação de luz dispersa e fluorescente é melhorada pelos detetores, e a partir da análise de flutuações de brilho de cada detetor (uma para cada pico de emissão fluorescente) é possível explorar vários tipos de informação sobre a estrutura física e química de cada partícula. O FSC correlaciona-se com o volume celular e o SSC depende da complexidade interna da partícula (por exemplo, forma do núcleo, quantidade e tipo dos organelos citoplasmáticos e rugosidade da membrana).

A deteção por citometria de fluxo foi efetuada utilizando um citómetro FACSCalibur. Para todas as marcações foram necessárias aproximadamente  $1 \times 10^6$  células. O número de eventos obtidos através do programa CellQuest™, correspondente ao número de células, foi de  $2,5 \times 10^4$  para o estudo do ciclo celular e  $1 \times 10^4$  para o estudo da expressão das proteínas BAX, BCL-2 e o estudo da viabilidade e tipos de morte celular. Para a análise e quantificação da informação utilizou-se um *software* específico que corre em computador dedicado (Paint-a-Gate 3.02, Machintosh Software).

Para estudar o efeito do butirato a nível da viabilidade celular e a alteração da expressão das proteínas BAX e BCL-2, as células foram incubadas com concentrações de butirato de 2, 5 e 20 mM para as três linhas celulares. Para o estudo do efeito da combinação de butirato com irinotecano sobre o ciclo e viabilidade celulares, as concentrações de butirato e de irinotecano usadas tiveram por base os resultados obtidos a nível da atividade metabólica em cada linha celular.

#### **2.1.2.5.1. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR**

Os dois tipos de morte celular, necrose e apoptose, distinguem-se com base nas diferenças morfológicas, bioquímicas e alterações moleculares que ocorrem nas células aquando de cada processo (Lopes *et al.*, 2002). A apoptose é um processo essencial para a manutenção e o desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células

supérfluas ou defeituosas. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características deste tipo de morte celular. Tais alterações incluem a retração da célula, a perda de aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas, a condensação da cromatina, a fragmentação internucleossômica do ADN e a formação de corpos apoptóticos. A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem um dano que provoca o aumento do volume celular, a agregação da cromatina, a desorganização do citoplasma, a perda da integridade da membrana plasmática e, conseqüentemente, a ruptura celular. Durante a necrose, o conteúdo celular é libertado, o que induz o dano nas células vizinhas e uma reação inflamatória local.

A viabilidade celular foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando a dupla marcação com anexina V (AnV) acoplada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e iodeto de propídeo (IP). A AnV é uma proteína anticoagulante que se liga com elevada afinidade a fosfolípidos aniônicos, tais como a fosfatidilserina. Em células viáveis, existe uma distribuição assimétrica dos fosfolípidos na bicamada lipídica, sendo que no folheto externo existe fosfatidilcolina e esfingomiéline, enquanto no folheto interno se encontra fosfatidilserina. Durante a apoptose, ocorre a translocação da fosfatidilserina para o folheto externo, podendo esta ser identificada através da incubação das células com AnV-FITC. Esta translocação da fosfatidilserina deve-se ao facto de ser identificada por recetores específicos que sinalizam as células com resíduos externos deste fosfolípido para serem removidas do tecido. Este mecanismo ocorre enquanto ainda existe integridade da membrana celular, sendo um evento característico de apoptose (Bedner *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 2001). Por outro lado, o iodeto de propídeo é um corante com a capacidade de se intercalar no ADN celular. Contudo, este corante não consegue atravessar a bicamada lipídica, sendo apenas capaz de intercalar no ADN quando a integridade da membrana celular se encontra comprometida, o que se verifica quando as células se encontram em apoptose tardia ou necrose (Darzynkiewicz *et al.*, 1992).

A aplicação deste método de dupla marcação com AnV-FITC e IP permite agrupar e classificar a população celular em quatro grupos distintos, com perfis de marcação característicos: grupo I, composto por células viáveis (negativa para ambas as marcações); grupo II, onde se encontram células em apoptose inicial (apresentam marcação positiva para AnV-FITC, mas negativa para a marcação com IP); grupo III, composto por células em apoptose tardia/necrose (apresentam-se positivas para ambas as marcações); e, por último, o

grupo IV, que contabiliza as células em necrose (apresentam marcação negativa para AnV-FITC e positiva para IP).

De modo a executar esta avaliação através do perfil de marcação das células, estas foram centrifugadas (1300 G, durante 5 minutos) e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensão em PBS e lavado por centrifugação nas condições referidas anteriormente. Seguidamente o sedimento foi ressuspensão em 100 µL de tampão de ligação frio (constituído por 0,01 M de HEPES [Sigma, H7523], 0,14 M de NaCl [Sigma, S7653] e 0,25 mM de CaCl<sub>2</sub> [Sigma, C4901]), 2,5 µL de AnV-FITC (Immunostep, ANXVF) e 1 µL de IP (kit Immunostep) e incubado durante 15 minutos na ausência de luz e à temperatura ambiente. Por último adicionaram-se 400 µL de tampão de ligação frio. Posteriormente a deteção foi realizada com os comprimentos de onda de excitação de 525 e 640 nm para AnV-FITC e para o IP, respetivamente. Os resultados foram expressos em percentagem de células identificadas em cada uma das subpopulações e baseiam-se na positividade e/ou negatividade de marcação para AnV-FITC/IP.

#### **2.1.2.5.2. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR**

O ciclo celular consiste na sequência de eventos pelos quais uma célula duplica o seu material genético e se divide em duas células-filhas idênticas entre si. Este ciclo divide-se em quatro fases principais. A fase S, na qual o material genético é replicado apenas uma vez e, posteriormente, na fase M (mitose), os cromossomas duplicados são distribuídos equitativamente pelas células-filhas. Entre estas duas fases, existem outras duas, denominadas G1 e G2 (gap-1 e gap-2), sendo que a fase G1 precede a fase S e a fase G2 precede a mitose (Schafer, 1998; Vermeulen *et al.*, 2003).

De forma a avaliar o ciclo celular foi utilizado um método que utiliza uma solução de iodeto de propídeo (IP) e RNase. Como referido anteriormente o IP é um composto com a capacidade de se intercalar no ADN e no ARN pelo que, só é possível conseguir uma especificidade para a marcação do ADN através da remoção do ARN pelo uso de RNase. As análises de ciclo celular por citometria de fluxo são representadas em histogramas de intensidade de fluorescência. As células de mamíferos caracterizam-se por possuir três tipos de populações de acordo com a fase no ciclo celular, células nas fases G2 e M que possuem o dobro do conteúdo de ADN das células que estão nas fases G0 e G1 e, por último, ainda

existem as células na fase S, correspondente à replicação do ADN (Crissman and Steinkamp, 1973).

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

### **2.1.2.5.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BAX/BCL-2**

Muitas são as moléculas envolvidas no controlo das vias de ativação da apoptose, tais como, as proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas, além das caspases. A família BCL-2 é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participam ativamente na regulação da apoptose (Borner, 2003). Os membros da família BCL-2, como a BXL-2 e a BCL-XL inibem a apoptose, pois previnem a libertação de citocromo-c e são chamados de reguladores anti-apoptóticos. Por outro lado, a BAX, a BID e a BAK são proteínas pró-apoptóticas (Hengartner, 2000). A expressão de BCL-2 é capaz de inibir a produção de ROS e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria. A homeostasia é mantida pelo balanço entre a quantidade de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas (Petros *et al.*, 2004).

Estímulos, como danos no ADN, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas e à diminuição da expressão das proteínas anti-apoptóticas, sendo que este desequilíbrio induz a apoptose. Entre as proteínas mais estudadas desta família, evidenciam-se as proteínas BAX e BCL-2 que são capazes de formar homodímeros (BAX-BAX e BCL-2-BCL-2) e heterodímeros (BAX-BCL2). O equilíbrio entre esses homodímeros e heterodímeros pode definir o estímulo pró-apoptótico ou anti-apoptótico na célula (Youle and Strasser, 2008). Após um estímulo de morte, a BCL-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo silenciamento de BAX ou por competir por sítios que seriam ocupados pela BAX na membrana externa mitocondrial. Por sua vez, a BAX

pode promover a apoptose através da interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas anti-apoptóticas (Murphy *et al.*, 2000).

De forma a avaliar a expressão proteica de BCL-2 e de BAX, após a tripsinização, as suspensões celulares foram centrifugadas durante 5 minutos a 1300 G e, posteriormente, ressuspensas em 1 mL de PBS, procedendo-se de seguida a nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, ressuspendeu-se o *pellet* em 100 µL de solução de fixação (Immunostep, Intracell Kit), sendo de seguida as células incubadas durante 15 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Após a incubação, adicionaram-se 2 mL de PBS, centrifugou-se novamente a suspensão celular a 1300 G durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Posteriormente, adicionaram-se 100 µL de solução de permeabilização (Immunostep, Intracell Kit) e 3 µL de anti-BAX-PE (Santa Cruz, sc-20067 PE) e 3 µL de anti-BCL2-FITC (Santa Cruz, sc-509 FITC). Agitou-se suavemente a suspensão celular, a qual foi incubada durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Após a incubação, adicionaram-se novamente 2 mL de PBS, centrifugou-se a suspensão celular a 1300 G durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Por fim, ressuspenderam-se as células em 400 µL de PBS e estas foram guardadas a 4°C até aquisição no citómetro de fluxo. A deteção foi feita utilizando os comprimentos de onda de excitação de 585 nm para a BAX e de 530 nm para a BCL-2. Os resultados obtidos são expressos como média de intensidade de fluorescência (MIF), tendo-se calculado posteriormente a razão BAX/BCL-2, com normalização ao controlo.

### **2.1.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS P53 E $\beta$ -CATENINA**

Sendo um dos focos do trabalho a influência do butirato nalgumas proteínas envolvidas no ciclo celular e na via Wnt, pretendeu-se estudar a influência do mesmo nas três linhas celulares tumorais e, verificar se o efeito da combinação com o irinotecano estará de certa forma envolvido na expressão das proteínas em estudo. Assim, para estudar o efeito do butirato sobre a expressão de P53 e de  $\beta$ -catenina, as células foram incubadas com concentrações de butirato de 2, 5 e 10 mM para as três linhas celulares. Para o estudo do efeito da combinação de butirato com irinotecano na expressão das mesmas proteínas as concentrações de butirato e de irinotecano usadas foram as correspondentes às melhores

combinações obtidas em cada linha no estudo por MTT. Os valores das melhores combinações encontram-se na Tabela 2:

**Tabela 2** Valores das melhores combinações obtidas em cada linha no estudo MTT

Linhas Celulares	[Butirato]	[Irinotecano]
C2BBe1	7,1 mM	1 $\mu$ M
LSI034	3,3 mM	4 nM
WiDr	2,2 mM	3,54 $\mu$ M

### 2.1.3.1. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE PROTEÍNAS

Para estudar o proteoma do carcinoma colorretal nas diferentes linhas celulares, começou-se por preparar extratos celulares de proteínas. Desta forma, o meio dos frascos celulares confluentes foi descartado e, em seguida, lavou-se com PBS, repetindo-se o procedimento três vezes. Após as lavagens com esta solução tampão, adicionaram-se 100  $\mu$ L de um tampão de lise (constituído por solução de RIPA [*radio-immunoprecipitation assay*], suplementada com *Complete Mini* [cocktail de inibidores de proteases, Roche, I1836153001], e DTT [*Ditiotreitol*, Sigma D9779] para prevenir a formação de pontes dissulfeto intra e intermolecularmente)) e com o auxílio de raspadores, soltaram-se as células da superfície do frasco e colocou-se a suspensão celular num *eppendorf*. O tampão de lise foi usado para garantir a obtenção de uma pura quantidade de proteína.

As amostras foram homogeneizadas e sujeitas a um processo de sonicação 10 vezes, durante 1 a 3 segundos cada uma, a uma amplitude de 35% de um sonicador *Vibra Cell* (*Sonic and Materials inc. USA*, modelo: VC50 de 240V, 50W e 20KHz). De seguida, de modo a separar a proteína dos restantes constituintes celulares, centrifugaram-se as amostras a 14000 G, à temperatura de 4°C durante 10 minutos e transferiu-se o sobrenadante para um novo *eppendorf*. Todos os extratos foram congelados a -80°C até posterior quantificação.

Para a quantificação da proteína as amostras foram primeiramente descongeladas e homogenizadas. Em seguida, procedeu-se à quantificação das mesmas pelo método de BCA, com recurso ao *BCA™ protein assay kit* (Pierce). Todas as amostras foram novamente guardadas a -80°C após utilização. Para a desnaturação, as amostras foram colocadas a 100°C

durante 5 minutos, após solubilização em solução desnaturante (100 mM de Tris, 100 mM de glicina, SDS a 4%, 8 mM de ureia e 0,01 % de azul bromofenol).

### **2.1.3.2. WESTERN BLOT**

De modo a verificar se o tratamento com butirato ou com a terapia combinada utilizando irinotecano induzia alterações ao nível da expressão de certas proteínas recorreu-se à técnica de *western blot* (WB). Esta técnica é um método utilizado para a deteção de proteínas de uma determinada amostra de um tecido homogeneizado ou extrato celular. Neste método, recorre-se a um gel de eletroforese para separar proteínas desnaturadas através das diferenças de peso molecular. As proteínas são posteriormente transferidas para uma membrana, neste trabalho foram utilizadas as de difluoreto de polivinilideno (PVDF), para serem detetadas através do uso de anticorpos específicos contra a proteína alvo em estudo (anticorpo primário). Após a marcação da proteína em estudo com o anticorpo primário, a sua identificação é conseguida com recurso a um anticorpo secundário, que se ligue especificamente ao anticorpo primário.

O WB oferece diferentes vantagens entre elas, o facto de as membranas adsorventes serem flexíveis e de fácil manuseamento; as proteínas imobilizadas na membrana encontram-se acessíveis para diferentes ligandos; esta técnica utiliza pequenas quantidades de reagentes de transferência; torna possível a obtenção de várias réplicas de um gel; e para além de tudo, permite o armazenamento dos padrões da eletrotransferência durante muito tempo e a utilização da proteína transferida para várias análises sucessivas (Alba *et al.*, 2009; Kurien and Scofield, 2006).

### **2.1.3.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE P53**

A proteína P53 é uma proteína supressora tumoral codificada pelo gene *TP53*. A sua principal função é a manutenção da integridade do código genético, sendo responsável pela estabilidade genética e, para além disso, desempenha diferentes papéis em diferentes fases da célula, ou seja a nível do ciclo celular, da apoptose, da senescência e da diferenciação. Mutações que provoquem inativação desta proteína são ubíquas e podem ser detetadas tanto em cancros familiares como esporádicos (Fridman and Lowe, 2003).

Para realizar a eletroforese, polimerizaram-se géis de acrilamida a 10%, que foram posteriormente colocados no sistema com o tampão de electroforese constituído por 25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina, 0,1% (v/v) de SDS (Bio-Rad), tendo sido aplicadas as amostras e o correspondente padrão de pesos moleculares (NZYColour Protein Marker II, nzytech). A eletroforese foi realizada durante 20 minutos inicialmente com uma diferença de potencial de 80V e posteriormente com 160V, durante uma hora e vinte e cinco minutos, sendo que no fim da corrida os géis foram colocados em contato com membranas de PVDF (Bio-Rad, EUA) ativadas com metanol. De seguida, procedeu-se à eletrotransferência com um potencial de 100V, durante uma hora com uma membrana PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  (Immobilon, IPVH00010) em tampão com 100 mM de CAPS (*N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid*, Sigma, C2632), a pH 11. Após a eletrotransferência, as membranas foram bloqueadas com solução de TBST-BSA a 4% (*Tris-Buffered Saline* com Tween-20), à temperatura ambiente. Após uma hora, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários, durante a noite, com agitação constante e a 4°C. Após esta incubação, realizaram-se lavagens com TBS-T a 1%, tendo-se incubado posteriormente com o anticorpo secundário adequado, durante uma hora, com agitação constante e à temperatura ambiente, período após o qual se repetem as lavagens com TBS-T a 1%. As membranas foram, depois, incubadas com substrato enzimático (ECF *Western Blotting*, Amersham Biosciences) durante aproximadamente 5 minutos e reveladas por leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000).

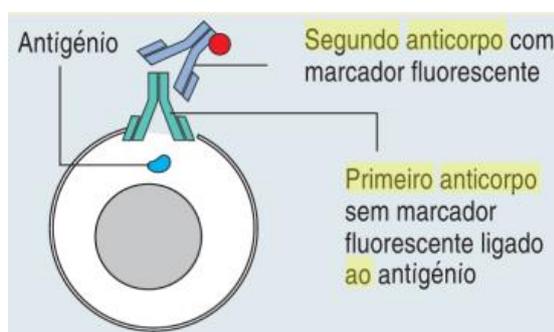
Após esta análise as membranas foram incubadas com o anticorpo contra a actina, utilizada como controlo da quantidade de proteína, efetuando o mesmo procedimento descrito.

#### **2.1.3.4. IMUNOCITOQUÍMICA**

A técnica de imunocitoquímica foi utilizada para localizar proteínas numa célula ou numa população de células e tem como fundamento a utilização de anticorpos específicos (geralmente IgGs, mas também IgMs) contra a proteína que se pretende identificar e localizar numa dada célula. Com esta técnica pretendeu-se determinar a localização e quantificação da proteína  $\beta$ -catenina nas três linhas celulares tumorais com e sem tratamento com butirato. Recorda-se que a presença da  $\beta$ -catenina, em linhas tumorais mutadas no complexo APC, leva à proliferação celular e ao processo angiogénico. A proteína em questão funciona, assim,

como antígeno. É uma proteína de 92 kDa e tem interação com outras proteínas, que incluem as caderinas, a APC e a TCF/LEF. As funções da  $\beta$ -catenina correlacionam-se não apenas com a adesão celular, mas também com a indução de processos de transcrição. Estas duas funções biológicas distintas da  $\beta$ -catenina determinam a sua localização celular. Assim, estando esta proteína envolvida na adesão célula-célula, a  $\beta$ -catenina está localizada na membrana citoplasmática e mantém a estrutura tecidual; quando situada livre no citoplasma, participa em vias de sinalização, ao interagir com a família TCF/LEF, tendo uma função transcripcional no núcleo o que, por sua vez, resulta na expressão de genes-alvo como o VEGF, o C-myc e o Ptg2 (Clifford *et al.*, 2008).

A imunocitoquímica requer que as células em estudo fiquem permeáveis, para o que se utiliza um detergente, para que anticorpos possam entrar na célula e ligar-se ao antígeno. Neste caso foi usada a imunocitoquímica indireta, na medida em que esta envolve um segundo anticorpo marcado com uma sonda visível. Isto é, o segundo anticorpo interage com o primeiro anticorpo específico para o antígeno não-marcado. O método indireto requer duas incubações separadas (uma para o primeiro anticorpo e outra para o segundo) e é mais específico para a identificação de antígenos como representado na figura 16 (Kierszenbaum and Tres, 2012).



**Figura 16.** Imunocitoquímica indireta. O primeiro anticorpo é específico para o antígeno, mas este é um anticorpo não-marcado. Assim um segundo anticorpo que possui um marcador visível é requerido para a marcação e este vai interagir com o primeiro. Adaptado de Kierszenbaum and Tres, 2012.

#### 2.1.3.4.1. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS PARA ESTUDO

Para esta experiência iniciou-se o protocolo por colocar lamelas em placas de 12 poços, nas quais foram semeadas 100 e 200 mil células por poço, para a condição controlo e tratamento, respetivamente. Após 24 horas incubaram-se as células com 4,4 mM, com

14,2 mM e com 6,6 mM de butirato, concentrações estas correspondentes ao valor de  $IC_{50}$  determinado anteriormente para as linhas celulares WiDr às 72 horas, C2BBel às 48 horas e LSI034 às 48 horas, respetivamente.

Para detetar proteínas intracelulares é necessário fixar e permeabilizar as células, visto que como os anticorpos são moléculas bastante grandes, não têm acesso direto ao citoplasma. A fixação permite também que o sinal do anticorpo secundário tenha um tempo de vida mais longo. A fixação das células foi realizada adicionando 400  $\mu$ L por lamela de paraformaldeído a 4% (Merck, 4005) durante 10 min. De seguida realizaram-se então três lavagens de 5 minutos cada, com uma solução de PBS-BSA (0,02% de BSA (Sigma Aldrich, A7906) em PBS). O BSA interage com outras proteínas, tal como os anticorpos usados, aumentando a competição dos anticorpos com os seus alvos consequentemente, aumenta a seletividade do antígeno e diminui as ligações não específicas. Posteriormente para a permeabilização, as células foram incubadas com um detergente não-iónico, o Triton X-100 a 1% (Merck, K34979403,) durante 10 minutos. Depois da permeabilização, as lâminas foram lavadas com PBS-BSA durante 5 minutos e incubadas durante a noite com 20  $\mu$ L de anticorpo primário na diluição de 1:100 (Santa Cruz,  $\beta$ -catenina (E5): sc-7963), em atmosfera húmida e protegido da luz. No dia seguinte, as células foram lavadas para retirar o excesso de anticorpo primário e incubadas com o anticorpo secundário (anti-mouse sc-3738, Santa Cruz), na diluição de 1:200 durante 1 hora, em atmosfera húmida. De seguida, as células foram incubadas com bis-benzimime (Hoechst 33342, Sigma) numa diluição de 1:1000 em PBS-BSA durante 10 minutos, à temperatura ambiente. O seu excesso foi retirado realizando três lavagens com PBS. No final, as lamelas foram montadas sobre lâminas usando 20  $\mu$ L de meio de montagem *ProLong® Gold antifade reagent with DAPI* (P36931, Life Technologies<sup>TM</sup>), deixando-se durante a noite, em atmosfera húmida e protegido da luz. As células foram posteriormente visualizadas num microscópio de fluorescência Leica DM 4000.

#### **2.1.3.4.2. AQUISIÇÃO E QUANTIFICAÇÃO**

Para a aquisição e quantificação, quinze imagens de fluorescência foram adquiridas usando a objetiva 40x do microscópio de fluorescência Leica DM 4000 B, com ampliação de 400X equipado com lâmpada de halógeno de 100 W e sistema de epifluorescência integrado, com filtros de excitação a 515/60nm (para deteção de fluorescência na zona do

vermelho) e 360/40 nm (para detecção de fluorescência na zona do azul) e a câmara Leica DFC 480 acoplada a computador com o *software Leica Application Suite*.

Todas as quantificações das imagens foram realizadas usando o *software ImageJ* (National Institutes of Health, NIH). Depois da aquisição, as imagens foram convertidas em 8-bit tiff para que fossem usadas para os processos de quantificação.

#### **2.1.4. EFEITO DO BUTIRATO NA QUIMIORRESISTÊNCIA**

A multirresistência a fármacos é uma condição definida pela resistência cruzada a vários medicamentos sem estes serem estruturalmente relacionados, e é observada em vários tumores hematológicos e sólidos. A resistência a fármacos citotóxicos individuais pode ocorrer, geralmente, por alterações nos alvos dos mesmos, mas também de forma mais ampla para vários fármacos diferentes com diferentes estruturas químicas e diferentes mecanismos de ação. Esta última forma de resistência é designada de resistência multi-fármacos, ou MDR (do inglês *multidrug resistance*). A multirresistência representa um dos principais problemas para o sucesso da quimioterapia, uma vez que os fármacos podem não ter efeito sobre as células tumorais (Gottesman, *et al.*, 2002).

Muitos mecanismos diferentes de MDR foram já descritos, incluindo alterações nos pontos de controlo do ciclo celular, insuficiência nos mecanismos apoptóticos, reparação de alvos celulares que foram danificados pelos fármacos ou, a diminuição da acumulação do próprio fármaco dentro da célula. Destes mecanismos, a redução da acumulação do fármaco é aqui estudada em mais detalhe, na medida em que parece ser um mecanismo muito comum da MDR quer *in vitro* quer *in vivo* (Ambudkar *et al.*, 2003).

Esta resistência que resulta na diminuição da acumulação do fármaco no interior da célula é resultante da expressão de uma ou mais bombas de efluxo ATP-dependentes. A primeira a ser identificada foi a glicoproteína-P (gpP), o produto do gene humano *MDR1*. A gpP promove ativamente a saída do fármaco, que no caso presente é o agente quimioterapêutico antineoplásico, do interior da célula. Nas células epiteliais do trato gastrointestinal, no fígado, no rim, nos testículos e no ovário, a gpP atua como uma barreira para a absorção de xenobióticos e promove a sua excreção na bÍlis e na urina. Um dos fármacos que é substrato da gpP é o irinotecano e a gpP é a responsável pela resistência de algumas células tumorais ao mesmo (Rothenberg, 2001).

#### 2.1.4.1. ESTUDOS DE CAPTAÇÃO COM $^{99m}\text{Tc-MIBI}$

O  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$  é um radiofármaco utilizado em Medicina Nuclear com diferentes aplicações, nomeadamente em estudos de perfusão do miocárdio e para pesquisa de tumores. Este radiofármaco é catiónico e lipofílico, características comuns de vários substratos de bombas de efluxo da MDR. Assim, o  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$  constitui um possível método para medir a atividade funcional deste tipo de proteínas (Piwnica-Worms *et al.*, 1993).

A gpP está descrita como abundante na linha celular de adenocarcinoma colorretal resistente LS1034. Este resultado foi obtido pelo estudo da cinética do  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$  e confirmado através de duas técnicas diferentes, a citometria de fluxo e o *western blot* por Casalta-Lopes e colaboradores (Casalta-Lopes *et al.*, 2011). Com os estudos realizados anteriormente verificou-se que os resultados obtidos para a linha celular LS1034 (quimiorresistente) com a combinação de butirato e de irinotecano a nível da atividade metabólica e da viabilidade celular se mostraram bastante promissores. Desta forma, tendo em conta os aspetos supracitados, postulou-se a hipótese de que o butirato possa sensibilizar a célula de modo a diminuir a sua resistência ao irinotecano, por um mecanismo relacionado com a gpP. Assim, foram realizados estudos de captação de modo a comparar a cinética de transporte do  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$  para a linha celular LS1034, resistente à quimioterapia, na presença e na ausência de butirato.

Para a realização dos estudos de captação, foram necessárias suspensões celulares de 2,5 mL com  $5 \times 10^6$  células para cada ensaio.

De seguida, incubaram-se as células na ausência ou na presença de butirato durante 1, 2 ou 4 horas antes do início dos estudos de captação com  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ . Depois, adicionou-se o radiofármaco na concentração de 25  $\mu\text{Ci/mL}$ . Aos 5, 30, 60, 90 e 120 minutos após a adição, foram retiradas alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  da suspensão celular para *ependorfs* que continham 500  $\mu\text{L}$  de PBS gelado. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 5600 G durante 1 minuto, para a obtenção de um *pellet*, em que o sobrenadante foi recolhido para um tubo devidamente identificado. Realizou-se uma lavagem do *pellet* com 500  $\mu\text{L}$  de PBS gelado, e repetiu-se o procedimento de separação do sobrenadante. Os sobrenadantes finais das centrifugações foram recolhidos para os tubos identificados tal como os *pellets* que foram conservados nos respetivos tubos de *ependorf*.

Após as incubações das células com o  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$  e a colheita separada dos *pellets* e dos sobrenadantes, foi possível calcular a captação do radiofármaco por parte das células

para cada tempo e condição referidos. Para isso, no final do procedimento, a radioatividade de todas as frações (*pellets* e sobrenadantes) foi medida num contador de poço, sendo então calculada a percentagem de captação do radiofármaco pelas células, utilizando a equação 3:

$$\% \text{ Captação} = \frac{CPM_{\text{pellet}}}{CPM_{\text{pellet+sobrenadante}}} \times 100 \quad (\text{eq. 3})$$

**Equação 3.** Cálculo da percentagem de captação do radiofármaco pelas células.

## 2.2. ESTUDOS *IN VIVO*

Os estudos *in vivo* são fundamentais na avaliação dos mecanismos moleculares do cancro, uma vez que são efetuados utilizando condições controladas. Apesar de ser um sistema complexo, permite-nos avaliar o comportamento conferido pela rede de sistemas, órgãos e as suas interações (Pantaleão and Luchs, 2010).

Com estes estudos pretendeu-se avaliar o potencial da combinação de butirato com irinotecano perante o microambiente tumoral. Para o seu desenvolvimento foram utilizados ratinhos atímicos Balb/c nu/nu e ratos atímicos *Rowett Nude* (RNU). O uso de duas estirpes de animais imunodeficientes, isto é, sem timo e, por isso, incapazes de produzir células T, permitiu o desenvolvimento de xenotransplantes, sem que haja rejeição pelo animal. Dois modelos animais diferentes foram utilizados: modelo heterotópico e ortotópico. O modelo ortotópico baseou-se num modelo animal de cecostomia previamente desenvolvido e implementado (Gomes, 2013).

Os estudos realizados em animais foram objeto de aprovação pela comissão de ética da Faculdade de Medicina de Universidade de Coimbra.

### 2.2.1. MODELOS HETEROTRÓPICOS

Um modelo animal heterotópico é um modelo animal de inoculação de células tumorais num local diferente do seu local de origem. Neste estudo a inoculação foi realizada

no dorso do animal, pois é uma zona onde a monitorização é fácil e atingível, o que facilita a monitorização diária do volume dos tumores. Outra razão deve-se ao facto de ser um local com boa área de expansão, que apresenta boa vascularização e permite o desenvolvimento rápido do tumor.

Para a realização deste trabalho foram inoculadas cerca de  $6 \times 10^6$  células da linha celular WiDr nos ratinhos de modo à obtenção de xenotransplantes. Nos dias que se seguiram à injeção das células, o crescimento tumoral foi monitorizado por medição dos eixos maior e menor dos tumores, de modo a verificar a evolução do seu volume  $V$  através da equação:

$$V = \frac{Em^2 \times EM}{2} \quad (\text{eq. 4})$$

Equação 4. Cálculo do volume tumoral

em que EM representa o eixo maior do tumor e Em o eixo menor (Dagrosa *et al.*, 2003).

O tratamento foi iniciado assim que os tumores atingiram um volume de 300 a 500  $\text{mm}^3$ .

#### **2.2.1.1. TRATAMENTO**

Sendo o foco do trabalho a avaliação do potencial da combinação de butirato com irinotecano, foram necessários quatro grupos de animais: (grupo 1) controlo, não sujeitos a tratamento; (grupo 2) terapia com butirato; (grupo 3) terapia com irinotecano; (grupo 4) terapia combinada.

Os animais sujeitos a tratamento foram mantidos e monitorizados durante 14 dias, tendo sido posteriormente sacrificados por deslocamento cervical. Posteriormente, os tumores foram excisados para a realização de estudos *ex vivo*.

##### **2.2.1.1.1. BUTIRATO**

O tratamento com butirato teve por base o protocolo utilizado por Eiseman e colaboradores. O butirato foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) na concentração de

0,8 g/kg durante cinco dias consecutivos na primeira semana, e de dois em dois dias nas semanas seguintes. Segundo os autores referidos, esta é uma dose tolerada pelos animais e que permite a obtenção de concentrações de butirato no plasma na ordem dos 10 mM (Egorin *et al.*, 1999).

A monitorização do volume tumoral e da massa dos ratinhos foi efetuada de dois em dois dias, durante catorze dias.

#### **2.2.1.1.2. IRINOTECANO**

O tratamento com irinotecano foi adaptado do protocolo utilizado por Guichard e colaboradores, em que, após o volume tumoral atingir o valor pré-estabelecido para o início do tratamento (dia 0), o irinotecano foi administrado por via i.p. na dose de 100 mg/kg durante duas semanas, aos dias 1, 5 e 9. Esta dose baseou-se em experiências realizadas pelos autores referidos e que concluíram que esta é uma dose tolerada pelos animais e que permite a obtenção de concentrações de irinotecano no plasma desejáveis para o trabalho (Guichard *et al.*, 1998).

A monitorização do volume tumoral e da massa dos ratinhos foi efetuada de dois em dois dias, durante catorze dias.

#### **2.2.1.1.3. TERAPÊUTICA COMBINADA**

O tratamento a que os animais do grupo terapia combinada foram sujeitos foi baseado na junção dos dois protocolos, sendo que este teve igualmente a duração de 14 dias. Desta forma, o butirato foi injetado durante cinco dias consecutivos durante a primeira semana e de dois em dois dias durante a segunda semana, enquanto o irinotecano foi injetado aos dias 1, 5 e 9. Isto implicou que o butirato e o irinotecano fossem injetados simultaneamente ao primeiro e quinto dias de terapia.

### **2.2.2. MODELOS ORTOTÓPICOS**

O modelo ortotópico de tumores humanos em ratos imunodeprimidos apresenta algumas vantagens relativamente ao modelo heterotópico (subcutâneo), uma vez que caracteriza o microambiente, podendo evidenciar o processo de metastização. Mas também possui algumas desvantagens uma vez que não permite uma monitorização rigorosa da evolução do crescimento tumoral.

Uma vez que com a combinação de butirato com o irinotecano se obtiveram melhores resultados *in vitro* na linha LSI034 (a linha quimiorresistente), e que este tipo de cancro representa 30% de todos os CCR, faz sentido usar um modelo animal ortotópico de cecostomia para avaliar o efeito da combinação de butirato com irinotecano e, conseqüentemente, avaliar o seu potencial terapêutico.

A cecostomia é uma intervenção cirúrgica de uso menos comum, usada em caso de oclusão intestinal para esvaziar todo o intestino a montante da obstrução intestinal. O facto de ser possível expor esta zona do intestino facilita não só a implantação das células tumorais, mas também o controlo da formação e do crescimento do tumor primário.

A exposição do cego foi realizada após uma incisão com cerca de 0,5cm de comprimento, vertical, na linha paramediana direita. Após cirurgia, quando o rato se coloca sobre as quatro patas, o estoma ficará na prega cutânea da base da pata distal direita. Após a abertura da cavidade abdominal, fez-se ressecção de um pequeno segmento de pele, aponevrose e músculo, de maneira a obter um orifício com cerca de 0,5 cm de diâmetro.

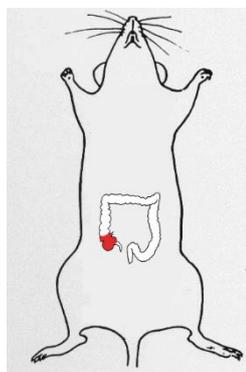
Após identificação, o cego foi exteriorizado da cavidade abdominal, procedeu-se à abertura do mesmo no seu ápex, no bordo antimesentérico e colocou-se o cego quase na sua totalidade e o intestino delgado para dentro da cavidade abdominal. Assim, o cego ficou já preparado para se passarem os pontos para fixação do estoma. A fixação permitiu deixar o topo bem aberto em cima e com a mucosa evertida (Gomes, 2013).

#### **2.2.2.1. PERÍODO PÓS-CIRURGIA**

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram colocados em gaiolas. Os animais foram monitorizados e pesados duas vezes por semana, o que permitiu ajudar a avaliar o seu funcionamento intestinal ao longo do tempo.

### 2.2.2.2. INOCULAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS

Após o restabelecimento do trânsito intestinal, procedeu-se à preparação das células tumorais e, em seguida, à sua inoculação na submucosa do cólon (Figura 17).



**Figura 17.** Local de Administração das células tumorais.

Foram administradas 3 injeções intervaladas, com cerca de 6 a 8 milhões de células da linha tumoral LS1034. Para a sua inoculação, as células depois de preparadas para uma suspensão celular como referido anteriormente, foram centrifugadas e descartado o meio. As células foram aspiradas com o auxílio de uma seringa de 1 mL, com uma agulha hipodérmica de calibre 21G, no menor volume possível de soro fisiológico, de modo a assegurar o melhor sucesso da inoculação e menor risco de extravasamento. As células foram injetadas usando uma agulha hipodérmica de calibre 30G. A inoculação foi feita, sempre que possível num só foco, na submucosa do cólon da fístula cecal.

### 2.2.2.3. TRATAMENTO

Os animais sujeitos a tratamento foram mantidos e monitorizados durante 14 dias. Durante a primeira semana os ratos foram injetados diariamente enquanto na segunda semana a injeção foi administrada de dois em dois dias, sendo que a dose por injeção foi de 800 mg/kg, dose adaptada do trabalho de Veterans e colaboradores (Veterans *et al.*, 2003). Após os 14 dias, os animais foram ocidados sob efeito de anestesia profunda, e os tumores assim como amostras de outros órgãos de interesse foram excisados para a realização de estudos *ex vivo*.

### 2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM® SPSS® Statistics, versão 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, EUA). A análise descritiva das variáveis quantitativas em estudo foi realizada pelo cálculo de estimadores de tendência central, de dispersão e de localização.

Na análise inferencial, a normalidade de distribuição das variáveis quantitativas foi avaliada segundo o teste de Shapiro-Wilk.

A comparação de viabilidade celular e ciclo celular entre as condições de incubação com os diferentes fármacos (para cada linha celular) e entre as linhas celulares (para cada condição) foi realizada segundo o teste *Analysis of Variance* (ANOVA) de um fator (no caso de distribuição normal e homogeneidade de variâncias) ou segundo o teste Kruskal-Wallis (caso contrário). As comparações múltiplas foram realizadas segundo a correção de Bonferroni. A comparação das captações com o composto  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI entre os diferentes tempos de incubação com butirato foi realizada segundo o mesmo método.

No estudo por *western blot* da expressão de P53 e da expressão de  $\beta$ -catenina por imunofluorescência, a comparação entre as condições e o controlo foi realizada utilizando o teste *t* de Student para uma média, comparando os valores amostrais obtidos com o valor de padronização (controlo igual a 1). A comparação entre as restantes condições experimentais foi realizada utilizando o teste ANOVA de um fator ou o teste Kruskal-Wallis (de acordo com os critérios mencionados previamente). As comparações múltiplas foram efetuadas segundo a correção de Bonferroni. A comparação entre as linhas celulares para a mesma condição experimental foi realizada segundo o teste *t* de Student para amostras independentes (no caso de haver normalidade da distribuição dos valores) ou o teste de Mann-Whitney (caso contrário).

Na comparação da razão BAX/BCL-2 com o controlo, foi utilizado o teste *t* de Student para uma média, comparando com o valor de padronização (controlo igual a 1). Na comparação entre as restantes condições experimentais, foi utilizado o teste *t* de Student para amostras independentes no caso de haver normalidade da distribuição dos valores ou o teste de Mann-Whitney em caso contrário. As comparações foram corrigidas pelo método de Bonferroni.

Na comparação da proliferação entre linhas celulares tumorais e normais, e entre condições para cada linha celular foi utilizado o teste ANOVA de um fator (no caso de distribuição normal e homogeneidade de variâncias) ou segundo o teste Kruskal-Wallis (caso

contrário). Na comparação entre os dois tempos de avaliação utilizados, recorreu-se ao teste teste t de Student para amostras independentes no caso de haver normalidade da distribuição dos valores ou o teste de Mann-Whitney em caso contrário. Todas as comparações múltiplas foram corrigidas segundo o método de Bonferroni.

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

$$Proliferação (\%) = \frac{100}{1 + 10^{p \cdot (\log x_0 - x)}}$$

onde  $x_0$  corresponde ao valor que inibe a proliferação a 50% ( $IC_{50}$ ). A comparação dos valores obtidos entre diferentes condições terapêuticas dentro da mesma linha celular e entre linhas celulares para a mesma condição terapêutica foi realizada segundo o teste ANOVA de um fator, com comparações múltiplas de acordo com a correção de Bonferroni. Para os estudos de terapia combinada, foi determinado o índice de combinação (IC) segundo o método de Chou-Talalay (Chou, 2010).

Para os estudos *in vivo*, foi utilizada a estimativa de Kaplan-Meier para avaliar o tempo necessário para ser atingido o volume tumoral relativo de 2,5. Foram traçadas curvas de sobrevivência e a comparação entre os grupos foi realizada segundo o teste log-rank, com correção de Bonferroni para comparações múltiplas.

Foi considerado um erro tipo I de 0,05 para todas as comparações.

### 3. RESULTADOS



O objetivo principal deste trabalho foi a avaliação do efeito da combinação do butirato com o irinotecano como uma nova opção terapêutica. Assim, numa primeira fase, *in vitro*, pretendeu-se avaliar o efeito citotóxico do butirato nas células tumorais e nos processos biológicos e, posteriormente o efeito da combinação do irinotecano e do butirato a nível da atividade metabólica, da viabilidade celular e do ciclo celular, recorrendo-se para tal a diferentes técnicas de biologia celular e molecular. Já numa fase posterior do trabalho pretendeu-se avaliar o efeito da combinação no crescimento tumoral *in vivo*, com recurso a modelos heterotópicos e do efeito da terapia com butirato em modelos ortotópicos.

Assim, foram utilizadas as metodologias descritas no capítulo anterior de forma a verificar se a junção destes dois compostos poderá representar uma nova opção terapêutica para o cancro do cólon.

### **3.1. ESTUDOS IN VITRO**

#### **3.1.1. MONOTERAPIA COM BUTIRATO**

Como foi referido, o primeiro objetivo consistiu na avaliação do efeito citotóxico do butirato, com avaliação da sua influência na proliferação celular, na viabilidade celular e na expressão de proteínas como a BAX, a BCL-2, a  $\beta$ -catenina e a P53.

##### **3.1.1.1. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR<sup>1</sup>**

Como referido anteriormente, após incubação com butirato foi avaliada a atividade metabólica, por colorimetria, através do ensaio do MTT, representando esta uma medida da proliferação celular, uma vez que o número de células metabolicamente ativas é proporcional à quantidade de cristais de formazano produzidos. O ensaio do MTT permitiu obter valores de proliferação celular, em percentagem relativa às culturas celulares incubadas em condição controlo às quais foi atribuído um valor de proliferação de 100%.

Assim, para avaliar o efeito citotóxico do butirato nas linhas celulares tumorais C2BBel, LS1034 e WiDr e nas linhas celulares normais CCD-841 CoN e HFF1, as culturas

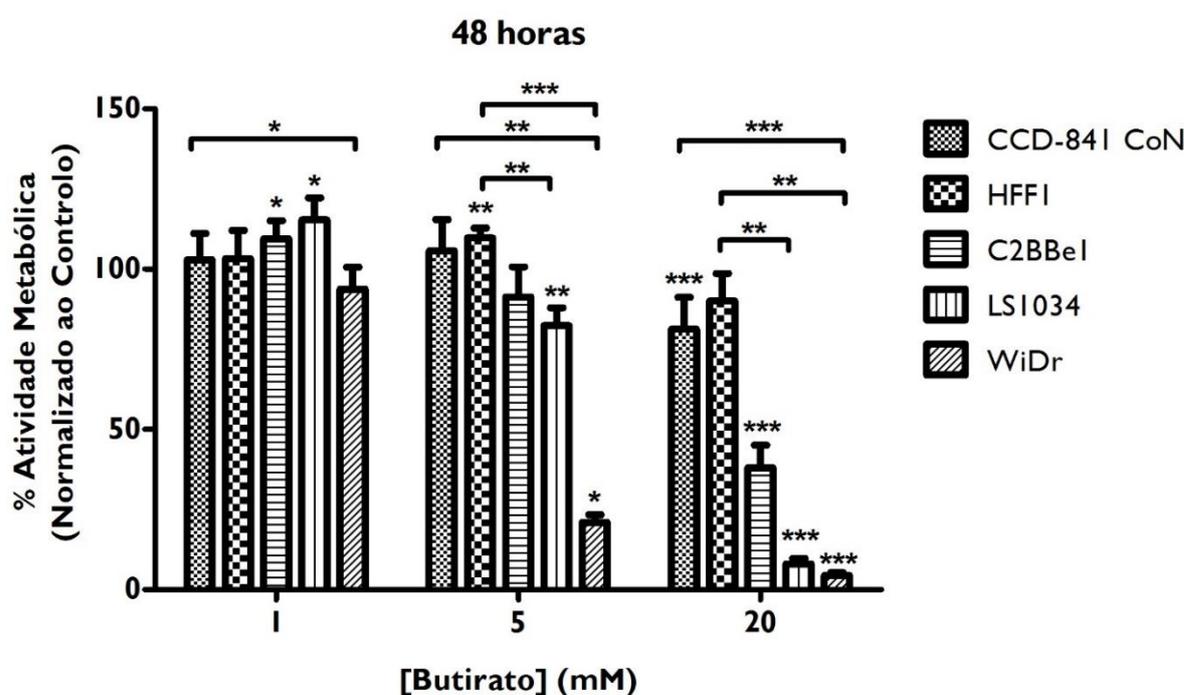
---

<sup>1</sup> Os resultados apresentados ao longo deste subtópico foram obtidos em coautoria com o Mestre Telmo José Dias Gonçalves.

celulares foram incubadas com concentrações crescentes deste composto que variaram entre 1 mM e 50 mM. Com o objetivo de comparar o efeito do butirato nas células normais e nas células tumorais, avaliou-se a atividade metabólica após 48 e 72 horas de incubação com concentrações crescentes de butirato nas duas linhas celulares normais (colonócitos e fibroblastos).

Assim, na Figura 18, é possível observar que, para a linha normal CCD-841 CoN, a incubação com baixas concentrações de butirato não induz efeitos citotóxicos, na medida em que não se verificam alterações significativas relativamente ao controlo. No entanto, com concentrações mais elevadas de butirato (20 mM) verifica-se uma diminuição significativa da atividade metabólica ( $p < 0,001$ ), não sendo ainda assim inferior a 81%. Podemos também verificar um comportamento semelhante para a linha celular normal HFF1, em que se verificou a inexistência de efeito citotóxico na presença de baixas concentrações de butirato, com um aumento estatisticamente significativo relativamente ao controlo para a concentração de 5 mM ( $p = 0,004$ ). Com o aumento da concentração de butirato, não se verificaram alterações significativas a nível da atividade metabólica, não sendo possível determinar o  $IC_{50}$  às 48 horas.

Quando comparamos o efeito do butirato nas linhas celulares normais em relação às linhas tumorais, podemos observar que nas células normais a atividade metabólica após



**Figura 18.** Avaliação da atividade metabólica nas linhas celulares em estudo após 48 horas com a incubação com 1, 5 e 20 mM de butirato. Os resultados exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos três experiências independentes em duplicado. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$  e \*\*\* para  $p < 0,001$ .

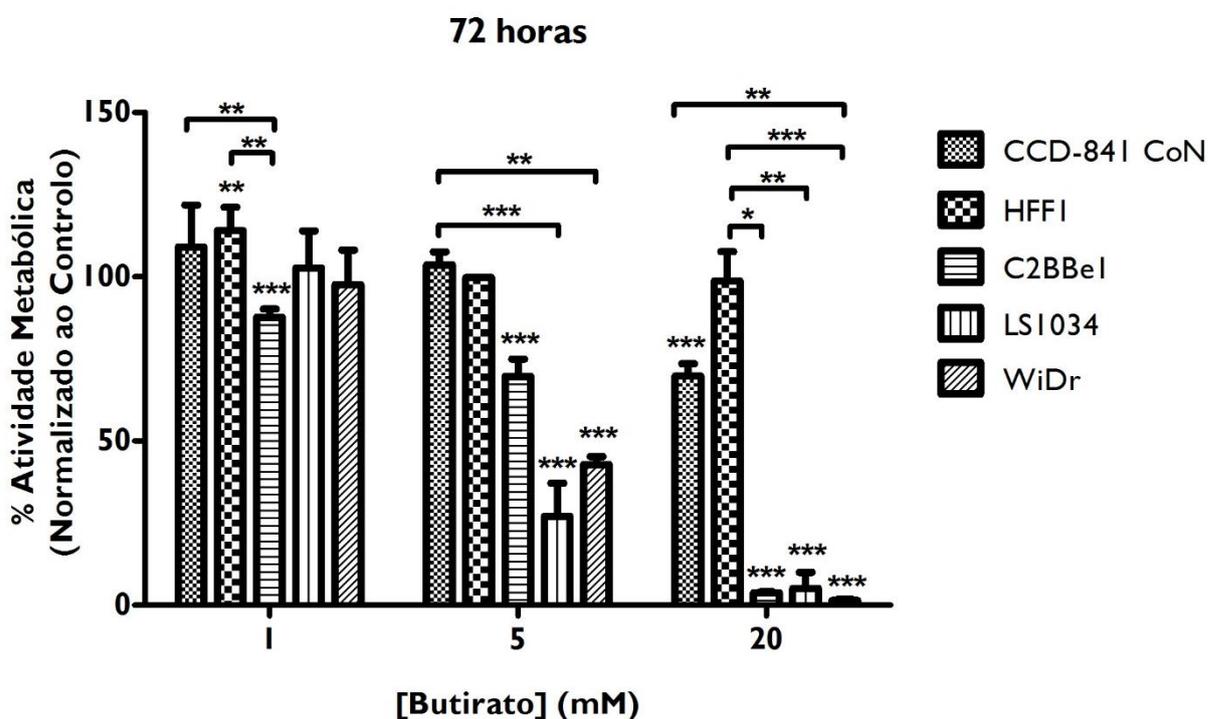
incubação com butirato durante 48 horas é sempre superior a 81%, enquanto que nas linhas celulares tumorais esta é notoriamente diminuída. Podemos observar que quando as células são tratadas com 1 mM de butirato, a atividade metabólica diminui significativamente na linha celular WiDr comparado com a linha normal CCD-841 CoN ( $p=0,029$ ). O mesmo pode-se verificar com 5 mM de butirato, em que é notório o decréscimo da atividade metabólica das linhas tumorais LSI034 e WiDr em comparação com as linhas celulares normais. Isto é, com a incubação com 5 mM de butirato, verifica-se uma diminuição estatisticamente significativa da proliferação celular da linha celular tumoral WiDr em relação às linhas normais CCD-841 CoN ( $p=0,003$ ) e HFF1 ( $p<0,001$ ). Por outro lado, a incubação com 5 mM de butirato na linha tumoral LSI034 induz um decréscimo da atividade metabólica estatisticamente significativo em relação à linha normal HFF1 ( $p=0,009$ ). Quando as células são incubadas com 20 mM de butirato, podemos verificar que há um decréscimo da atividade metabólica da linha C2BBel em relação às linhas normais, no entanto esta diferença não se verificou ter significado estatístico. Por outro lado, com 20 mM de butirato, foi possível observar um decréscimo significativo da atividade metabólica da linha LSI034 comparando com a linha normal HFF1 ( $p=0,002$ ). É possível também verificar que existe um decréscimo significativo da atividade metabólica da linha tumoral WiDr em relação às linhas normais CCD-841 CoN ( $p=0,002$ ) e HFF1 ( $p<0,001$ ).

Com o aumento do tempo de exposição ao butirato das linhas celulares observa-se uma diminuição da atividade metabólica para as concentrações mais altas de butirato.

Ao observar a Figura 19, verifica-se que as células tumorais apresentam maior sensibilidade ao butirato após exposição durante 72 horas do que as células normais. Repara-se que na linha CCD-841 CoN, a incubação com 1 e com 5 mM não altera a sua atividade metabólica. No entanto, verifica-se uma diminuição da atividade metabólica com a incubação com 20 mM de butirato em relação ao controlo ( $p<0,001$ ), porém, esta diminuição não foi suficiente para permitir o cálculo do seu  $IC_{50}$ . Repara-se também que na linha celular normal HFF1, o aumento da concentração de butirato e o aumento do tempo de exposição não alteram a atividade metabólica, facto evidenciado pela ausência de diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo. Estes resultados evidenciam a menor toxicidade do butirato nas linhas normais.

Ao observar o comportamento das linhas tumorais após as 72 horas com a incubação de butirato, podemos verificar que o butirato, nas concentrações mais elevadas (5 e 20 mM)

induz uma diminuição significativa da atividade metabólica em todas as linhas celulares tumorais em relação ao controlo ( $p < 0,001$ ).

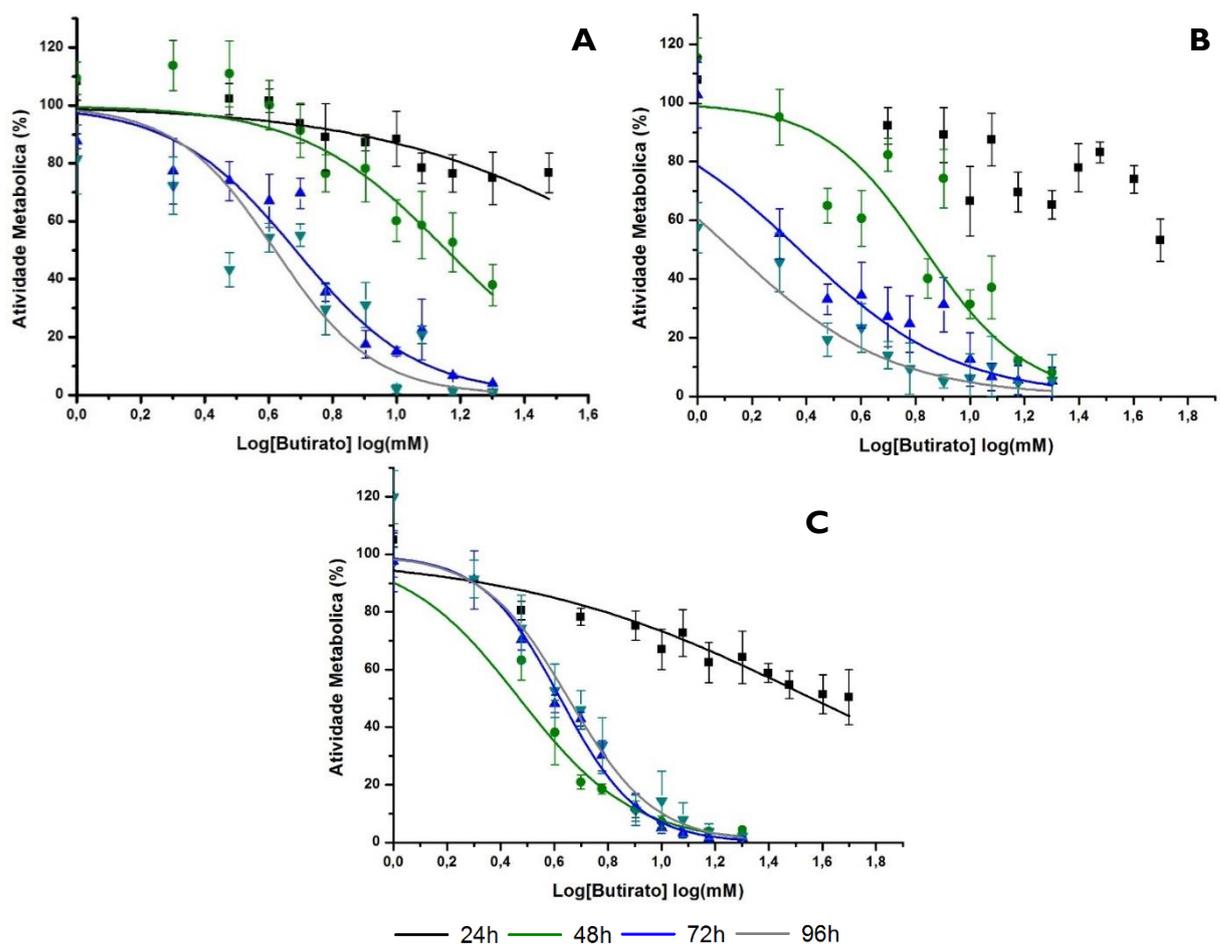


**Figura 19.** Avaliação da atividade metabólica nas linhas celulares em estudo após 72 horas com a incubação com 1, 5 e 20 mM de butirato. Os resultados exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos três experiências independentes em duplicado. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$  e \*\*\* para  $p < 0,001$ .

Comparando a resposta ao butirato das linhas tumorais relativamente às linhas normais, podemos observar que com 1 mM de butirato se verifica um decréscimo da atividade metabólica da linha tumoral C2BBel relativamente às linhas normais CCD-841 CoN e HFFI ( $p = 0,017$  e  $p = 0,001$ , respetivamente). Quando as células foram incubadas com 5 mM de butirato verificou-se um decréscimo significativo da atividade metabólica das linhas tumorais WiDr e LSI034 em relação à linha celular normal CCD-841 CoN ( $p = 0,008$  e  $p < 0,001$ , respetivamente). Por último, podemos verificar que aumentando a concentração de butirato para 20 mM, quando exposto durante 72 horas, este induz um decréscimo significativo da atividade metabólica das linhas celulares C2BBel, LSI034 e WiDr em comparação com a linha normal HFFI ( $p = 0,019$ ,  $p = 0,008$  e  $p < 0,001$ , respetivamente). Podemos também observar que, com a incubação das células WiDr com 20 mM, a sua atividade metabólica decresce significativamente comparada com a linha normal CCD-841 CoN ( $p = 0,002$ ).

Os valores de proliferação celular permitiram também traçar as curvas dose-resposta obtidas com o tratamento com butirato nas linhas celulares C2BBel (Figura 20 A), LS1034 (Figura 20 B) e WiDr (Figura 20 C) após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. A partir destas quais foi possível calcular a concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ), ou seja, a concentração de butirato necessária para inibir 50% da proliferação celular. Estes valores estão apresentados na Tabela 3.

A partir da Figura 20, verifica-se que o butirato induz a inibição da atividade metabólica nas linhas tumorais em estudo, após os diferentes períodos de incubação, 24, 48, 72 e 96 horas. No entanto, quando as células foram tratadas com butirato durante 24 horas, a inibição da atividade metabólica foi muito reduzida, de modo que não foi possível determinar os respetivos valores de  $IC_{50}$ . É possível também verificar que a inibição da atividade metabólica é dependente da concentração de butirato e do tempo de incubação, sendo que aquela diminui à medida que aumenta o tempo de incubação com o butirato, para



**Figura 20.** Curvas dose-resposta das três linhas celulares tumorais em estudo em resposta à incubação com butirato. Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio de MTT 24, 48, 72 e 96 horas após incubação com concentrações crescentes de butirato nas linhas celulares C2BBel (A), LS1034 (B) e WiDr (C). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado ( $n \geq 6$ ).

as linhas celulares tumorais C2BBe1 e LSI034. No entanto esta dependência não se verifica para a linha celular WiDr. Podemos então verificar que o butirato induz um efeito anti-proliferativo nas linhas tumorais em estudo dependentemente da sua localização e origem no organismo.

Observando os valores de  $IC_{50}$  presentes na Tabela 3 relativos à linha C2BBe1, constata-se que, quanto maior o tempo de incubação, menores os valores de  $IC_{50}$ . Foi possível obter às 48, 72 e 96 horas os respetivos valores de  $IC_{50}$ , 14,36 mM, 4,84 mM e 4,17 mM, no entanto, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas.

É possível também verificar pela análise da Tabela 3 que na linha LSI034, para os tempos de incubação de 48, 72 e 96 horas com butirato, foi possível obter os respetivos valores de  $IC_{50}$ , sendo estes de 6,81 mM, 2,36 mM e 1,34 mM. Verifica-se então a diminuição dos valores de  $IC_{50}$  com o aumento do tempo de incubação, no entanto só se verificaram diferenças significativas entre as 48 e as 96 horas ( $p=0,011$ ).

Por último, foi possível obter os valores de  $IC_{50}$  para a linha WiDr para os tempos de 48, 72 e 96 horas, sendo estes 2,84 mM, 4,19 mM e 4,49 mM, respetivamente, não se verificando diferenças estatisticamente significativas.

**Tabela 3.** Valores de  $IC_{50}$  obtidos para a incubação das linhas celulares C2BBe1 (A), LSI034 (B) e WiDr (C) com butirato durante 24, 48, 72 e 96 horas. Estão também representados os valores de  $r^2$  associados.

Linha celular	Tempo de incubação (h)	$IC_{50}$ (mM)	$r^2$	Intervalo de confiança (mM)
C2BBe1	24	*	*	
	48	14,36	0,88	[10,76; 19,16]
	72	4,84	0,97	[3,86; 6,05]
	96	4,17	0,80	[2,95; 5,89]
LSI034	24	*	*	
	48	6,81	0,91	[5,03; 9,21]
	72	2,36	0,88	[1,68; 3,32]
	96	1,34	0,93	[1,01; 1,77]
WiDr	24	*	*	
	48	2,84	0,96	[2,14; 3,78]
	72	4,19	0,98	[3,86; 4,55]
	96	4,49	0,98	[3,79; 5,20]

É de notar então que, para os tempos de incubação mais curtos, a linha celular WiDr é a mais sensível ao composto em estudo, apresentando os valores de  $IC_{50}$  mais baixos para as 48 horas de incubação, e a linha C2BBel a mais resistente, apresentando os valores de  $IC_{50}$  mais elevados. Porém, para tempos mais longos, ou seja, para as 72 e 96 horas de incubação, foi possível verificar que os valores mais baixos de  $IC_{50}$  são obtidos com a linha celular LSI034, a linha celular tumoral caracterizada como sendo quimiorresistente.

### **3.1.1.2. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR<sup>2</sup>**

A viabilidade celular, como foi descrito anteriormente, foi avaliada a partir da dupla marcação com AnV e IP por citometria de fluxo. Esta marcação permite diferenciar as populações celulares existentes: células viáveis (V), células em apoptose inicial (AI), células em apoptose tardia/necrose (AT/N) e células em necrose (N). Este ensaio permitiu avaliar o tipo de morte celular induzido nas células quando estas são sujeitas ao efeito do butirato.

Uma vez que foi observada a diminuição da atividade metabólica na presença de butirato, este ensaio permitiu avaliar a viabilidade celular e os tipos de morte. Os gráficos da Como podemos verificar, com o recurso à Figura 21 os estudos da viabilidade celular realizados, revelaram que o butirato induz uma diminuição da população de células viáveis e o aumento do número de células em apoptose tardia/necrose ou necrose, dependendo da concentração de butirato e da linha celular. Como é possível observar, na linha celular C2BBel a população de células viáveis no controlo corresponde a 88,3 %, mas após 48 horas de tratamento com 20 mM de butirato diminuiu para 50 %, em que apenas se verificou significância estatística para esta condição em relação ao controlo ( $p=0,002$ ). Quanto à morte celular por apoptose, verifica-se que a população de células em apoptose inicial aumenta ligeiramente à medida que a concentração de butirato aumenta, em que apenas se verificou significância estatística para as condições de 2 mM e de 5 mM em relação ao controlo ( $p=0,022$  e  $p=0,018$ , respetivamente). representam as diferentes populações identificadas, em cada uma das condições testadas, para as linhas celulares C2BBel, LSI034 e WiDr.

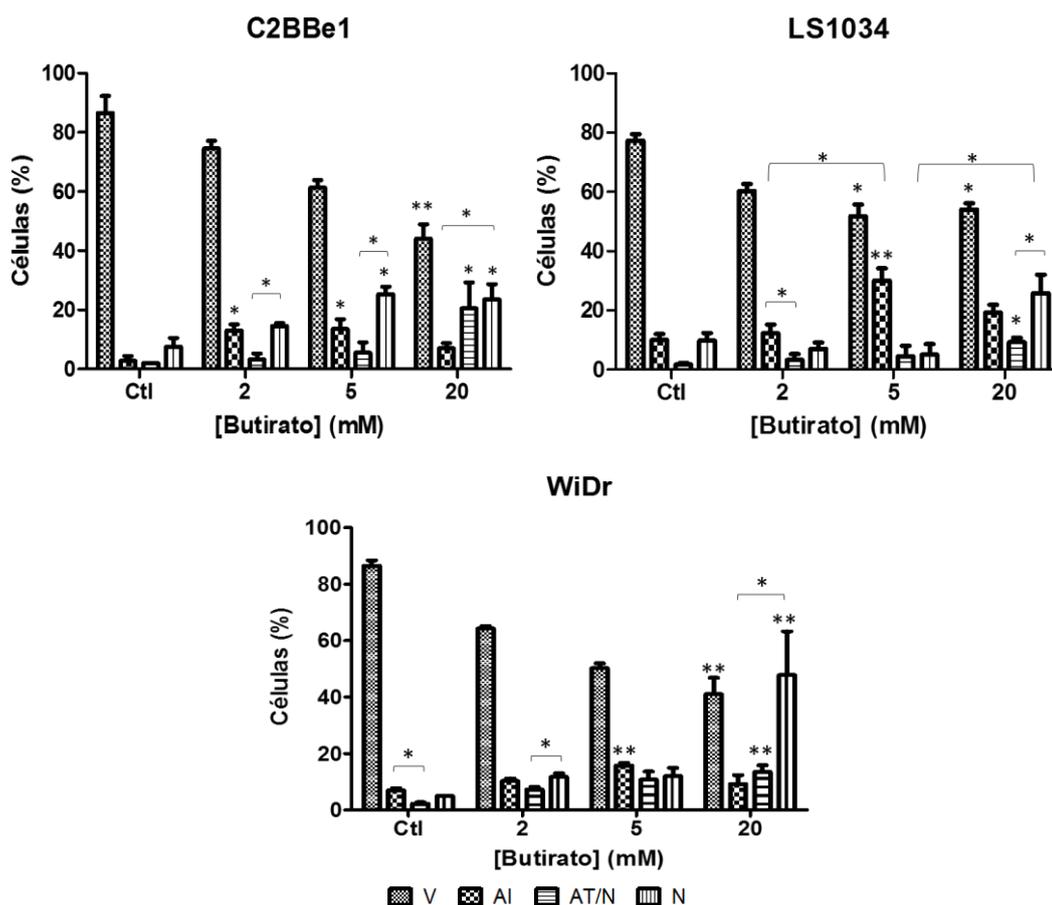
Como podemos verificar, com o recurso à Figura 21 os estudos da viabilidade celular realizados, revelaram que o butirato induz uma diminuição da população de células viáveis e o aumento do número de células em apoptose tardia/necrose ou necrose, dependendo da

---

<sup>2</sup> Os resultados apresentados ao longo deste subtópico foram obtidos em coautoria com o Mestre Telmo José Dias Gonçalves.

concentração de butirato e da linha celular. Como é possível observar, na linha celular C2BBel a população de células viáveis no controlo corresponde a 88,3 %, mas após 48 horas de tratamento com 20 mM de butirato diminuiu para 50 %, em que apenas se verificou significância estatística para esta condição em relação ao controlo ( $p=0,002$ ). Quanto à morte celular por apoptose, verifica-se que a população de células em apoptose inicial aumenta ligeiramente à medida que a concentração de butirato aumenta, em que apenas se verificou significância estatística para as condições de 2 mM e de 5 mM em relação ao controlo ( $p=0,022$  e  $p=0,018$ , respetivamente). Relativamente à morte celular por apoptose tardia/necrose, esta população celular aumenta em relação ao controlo quando as células são tratadas com 20 mM de butirato ( $p=0,012$ ). Nesta linha celular verifica-se também que o tipo de morte celular predominante quando as células são tratadas com 5 e com 20 mM de butirato é a necrose, com significância estatística ( $p=0,028$  e  $p=0,010$ , respetivamente).

Na linha celular LS1034, o controlo possui uma população de células viáveis de



**Figura 21.** Avaliação da viabilidade celular. Os resultados estão representados na forma de percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N), 48 horas após a incubação com butirato nas linhas C2BBel, LS1034 e WiDr. Os resultados exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com \* para  $p < 0,05$  e \*\* para  $p < 0,01$ .

78,3 %, diminuindo para 53 % após tratamento com 20 mM de butirato durante 48 horas ( $p=0,031$ ). Foi também verificada significância estatística para a condição de 5 mM ( $p=0,011$ ). Podemos verificar pela Como podemos verificar, com o recurso à Figura 21 os estudos da viabilidade celular realizados, revelaram que o butirato induz uma diminuição da população de células viáveis e o aumento do número de células em apoptose tardia/necrose ou necrose, dependendo da concentração de butirato e da linha celular. Como é possível observar, na linha celular C2BBel a população de células viáveis no controlo corresponde a 88,3 %, mas após 48 horas de tratamento com 20 mM de butirato diminuiu para 50 %, em que apenas se verificou significância estatística para esta condição em relação ao controlo ( $p=0,002$ ). Quanto à morte celular por apoptose, verifica-se que a população de células em apoptose inicial aumenta ligeiramente à medida que a concentração de butirato aumenta, em que apenas se verificou significância estatística para as condições de 2 mM e de 5 mM em relação ao controlo ( $p=0,022$  e  $p=0,018$ , respetivamente)., um aumento da população celular em apoptose inicial com a concentração de 5 mM de butirato em comparação com o controlo, com significância estatística ( $p=0,006$ ). Por sua vez, também se verificou o aumento significativo da população celular em apoptose inicial com 5 mM em comparação com a incubação das células com 2 mM ( $p=0,042$ ). O mesmo se verifica para a população em apoptose tardia/necrose para a incubação com 20 mM de butirato, em que podemos verificar significância estatística para o aumento da população celular nesta condição relativamente ao controlo ( $p=0,030$ ). Em relação à indução de morte por necrose verifica-se um aumento estatisticamente significativo com a concentração de 20 mM em relação à incubação das células com 5 mM ( $p=0,015$ ).

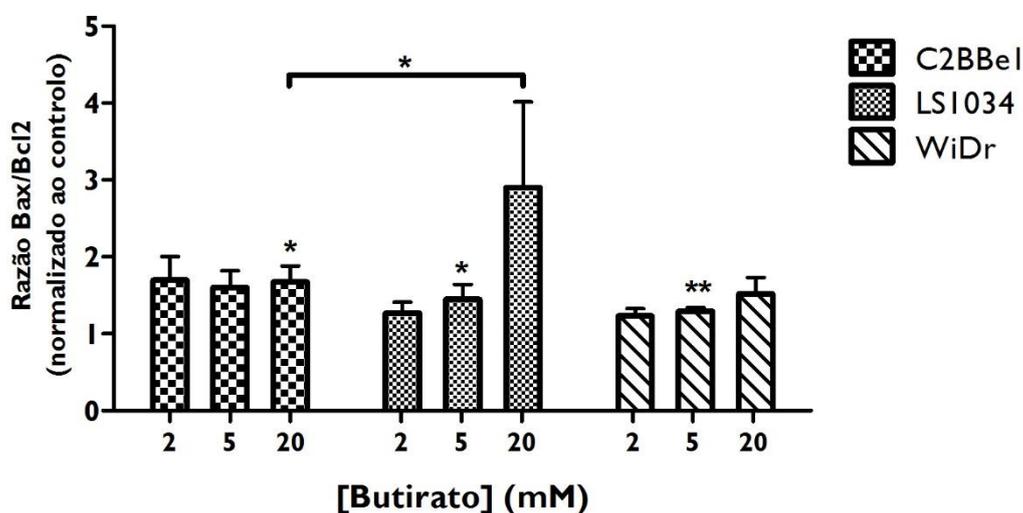
Na linha celular WiDr a população celular viável no controlo é de 85,3 % mas após tratamento com 20 mM de butirato esta população diminuiu significativamente para 39,3 % ( $p=0,002$ ). Tal como aconteceu na linha celular C2BBel, em que o incremento da concentração de butirato provocou um aumento significativo a nível da população celular em apoptose inicial com a concentração de 5 mM com butirato ( $p=0,006$ ). A concentração de 20 mM de butirato provocou um aumento significativo de células em apoptose tardia/necrose relativamente ao controlo ( $p=0,005$ ). Pela análise do gráfico, podemos verificar também que, quando as células são tratadas com 20 mM de butirato, existe um aumento considerável da população celular em necrose, face à que se observa no controlo ( $p=0,002$ ).

### 3.1.1.3. AVALIAÇÃO DA RAZÃO BAX/BCL-2<sup>3</sup>

Para determinar a relação entre a expressão da proteína pró-apoptótica BAX e a proteína anti-apoptótica BCL-2 sob o efeito do butirato recorreu-se, como referido anteriormente, à citometria de fluxo. Os gráficos da Figura 22 representam os valores da razão BAX/BCL-2 obtidos em cada uma das condições testadas para as linhas celulares C2BBe1, LS1034 e WiDr.

Pela análise da Figura 22 podemos verificar que, relativamente ao controlo, a incubação das células tumorais com butirato tende a induzir um aumento da razão BAX/BCL-2 para todas as linhas celulares em estudo, sendo este aumento mais evidente na linha celular LS1034 e menos evidente na linha celular WiDr. Este aumento indica-nos então que há uma maior expressão da proteína pró-apoptótica em relação à anti-apoptótica, em resposta ao tratamento com butirato.

Na linha celular LS1034 observa-se uma tendência para o aumento da razão BAX/BCL-2, de forma dependente da concentração de butirato, sendo este aumento verificado com significância estatística para a concentração de 5 mM relativamente ao controlo ( $p=0,024$ ).



**Figura 22.** Análise da razão da expressão entre a BAX e a BCL-2 em resposta ao butirato nas linhas celulares C2BBe1, LS1034 e WiDr. Os resultados são expressos em razão BAX/BCL-2 para cada uma das condições em estudo e exprimem a média e o desvio padrão de três experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo e entre condições estão representadas por \* para  $p<0,05$  e \*\* para  $p<0,01$ .

<sup>3</sup> Os resultados apresentados ao longo deste subtópico foram obtidos em coautoria com o Mestre Telmo José Dias Gonçalves.

Na linha tumoral C2BBel é de notar o aumento da razão BAX/BCL-2 em relação ao controlo para qualquer concentração de butirato testada, verificando-se significância estatística para a concentração de 20 mM em relação ao controlo ( $p=0,018$ ).

Relativamente às células WiDr, é possível observar uma tendência para um aumento gradual da razão BAX/BCL-2 à medida que se utilizam concentrações crescentes de butirato, mas apenas com diferenças significativas relativamente ao controlo para a concentração de 5 mM de butirato ( $p=0,006$ ).

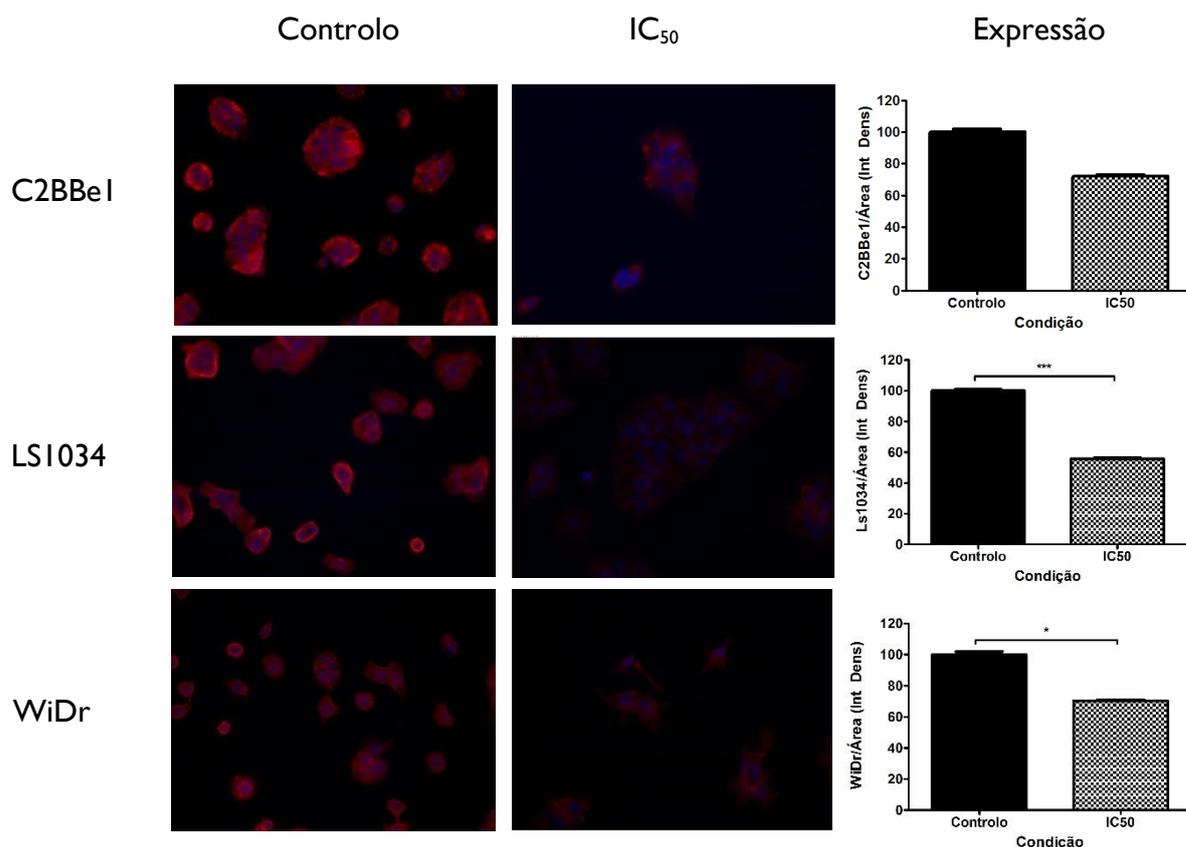
#### **3.1.1.4. EXPRESSÃO DE $\beta$ -CATENINA**

O uso da imunofluorescência para este estudo, recorde-se, tem como objetivo a localização e a quantificação da  $\beta$ -catenina nas três linhas celulares tumorais e verificar o efeito do butirato sobre a mesma. Para tal fez-se uma primeira marcação com o anticorpo primário da  $\beta$ -catenina e o secundário para a visualização da expressão de  $\beta$ -catenina no microscópio de fluorescência e uma segunda marcação ao ADN, para averiguar a sua localização.

De acordo com a Figura 23, na coluna controlo, as imagens demonstram uma marcação forte da  $\beta$ -catenina. Podemos observar que a marcação se encontra em quase toda a célula, isto é, encontra-se uma forte marcação no citoplasma, sugerindo também as imagens a existência de marcação na região nuclear. Podemos ver este comportamento em todas as linhas tumorais em estudo.

Nas imagens referentes à incubação com butirato em concentrações correspondentes ao  $IC_{50}$  durante 48 horas, podemos observar uma marcação menos intensa em relação ao controlo.

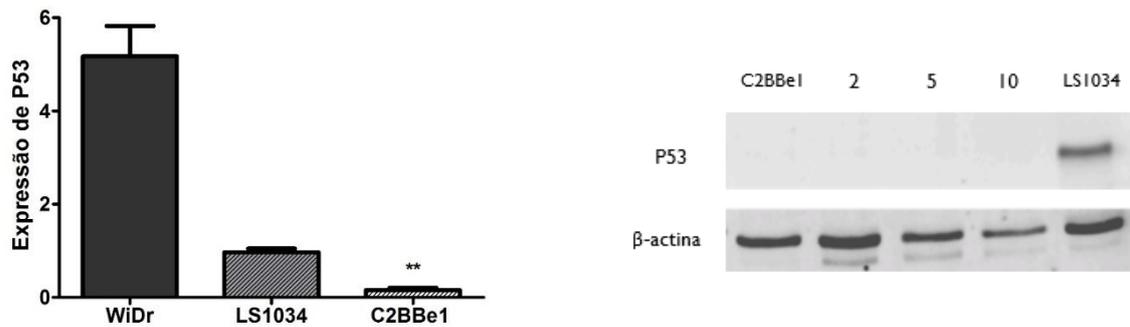
De facto, ao observarmos os gráficos referentes à quantificação da proteína  $\beta$ -catenina, verificamos uma diminuição da  $\beta$ -catenina total na célula. Este comportamento verifica-se para todas as linhas tumorais, mas apenas com significância estatística para as linhas celulares LSI034 ( $p\leq 0,001$ ) e WiDr ( $p=0,021$ ).



**Figura 23.** Análise de expressão de  $\beta$ -catenina em resposta ao butirato nas linhas celulares C2BBe1, LSI034 e WiDr. As imagens representam a dupla marcação para a  $\beta$ -catenina e para o ADN para as três linhas celulares não sujeitas a tratamento e com a incubação dos respetivos IC<sub>50</sub> às 48 horas. A expressão da  $\beta$ -catenina está normalizada por área. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão de três experiências independentes (está representado \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  para a comparação do IC<sub>50</sub> com o controlo).

### 3.1.1.5. EXPRESSÃO DE P53

Outro dos objetivos do trabalho consistiu na avaliação da expressão da proteína P53 após o tratamento com butirato. Para tal, as linhas celulares tumorais em estudo foram incubadas com as concentrações de 2 mM, de 5 mM e de 10 mM durante 48 horas. Como é possível observar na Figura 24, a linha celular LSI034 tem uma menor expressão de P53 em relação à linha WiDr, sendo que a linha celular C2BBe1 não expressa a proteína P53 ( $p=0,002$ ). De notar que foi verificado que a linha celular C2BBe1 não expressava a proteína P53, como se observa na Figura 24, razão pela qual não se prosseguiram os estudos nesta linha celular em termos de alterações na expressão de P53.



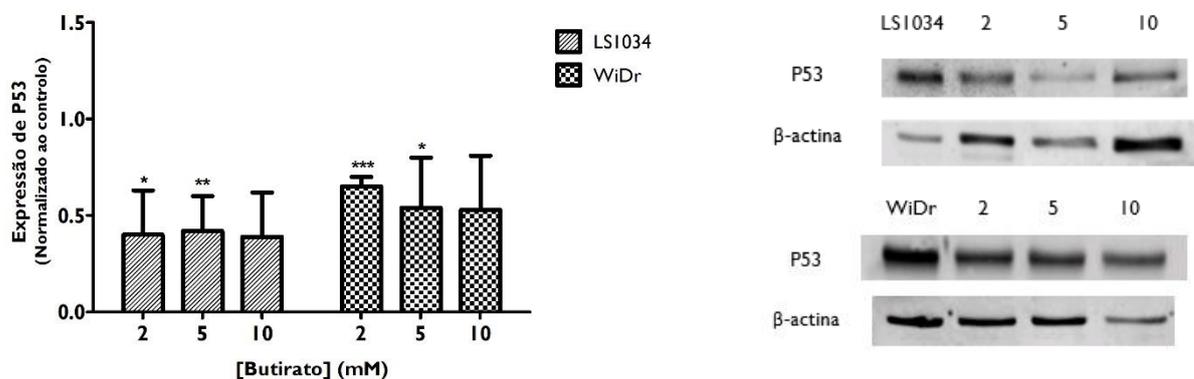
**Figura 24.** Avaliação da expressão da proteína P53 por western blot nas três linhas celulares C2BBel, LS1034 e WiDr. À esquerda, o gráfico representa a expressão da proteína p53 das três linhas celulares sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência de P53 e a intensidade de fluorescência da  $\beta$ -actina apresentando a média e o desvio padrão de três experiências diferentes obtidas. À direita, avaliação da expressão da proteína P53 por western blot na linha celular C2BBel. O imunoblot ilustrativo representa a expressão da proteína P53 e da  $\beta$ -actina para o controlo da linha C2BBel, e respetivas incubações com 2, 5 e 10 mM de butirato, e ainda um controlo com a linha LS1034 que, neste caso foi usado como controlo positivo da expressão da P53.

Assim, conhecendo o perfil individual de cada linha celular para a expressão da proteína P53, foi possível avaliar o efeito do aumento da concentração do butirato na sua expressão.

Através da análise do gráfico da Figura 25, podemos observar uma diminuição da expressão da proteína P53 em ambas as linhas celulares após o tratamento com concentrações crescentes de butirato (2 mM, 5 mM e 10 mM), relativamente ao controlo.

Verifica-se também que para a linha LS1034, após a incubação com butirato, a expressão de P53 diminui, com significância estatística para as condições 2 mM ( $p=0,024$ ) e 5 mM ( $p=0,006$ ).

O mesmo podemos verificar para a linha tumoral WiDr, em que após a incubação com butirato podemos observar a diminuição da expressão de P53, com significância estatística para a incubação com 2 mM ( $p<0,001$ ) e 5 mM ( $p=0,018$ ) de butirato, relativamente ao controlo.



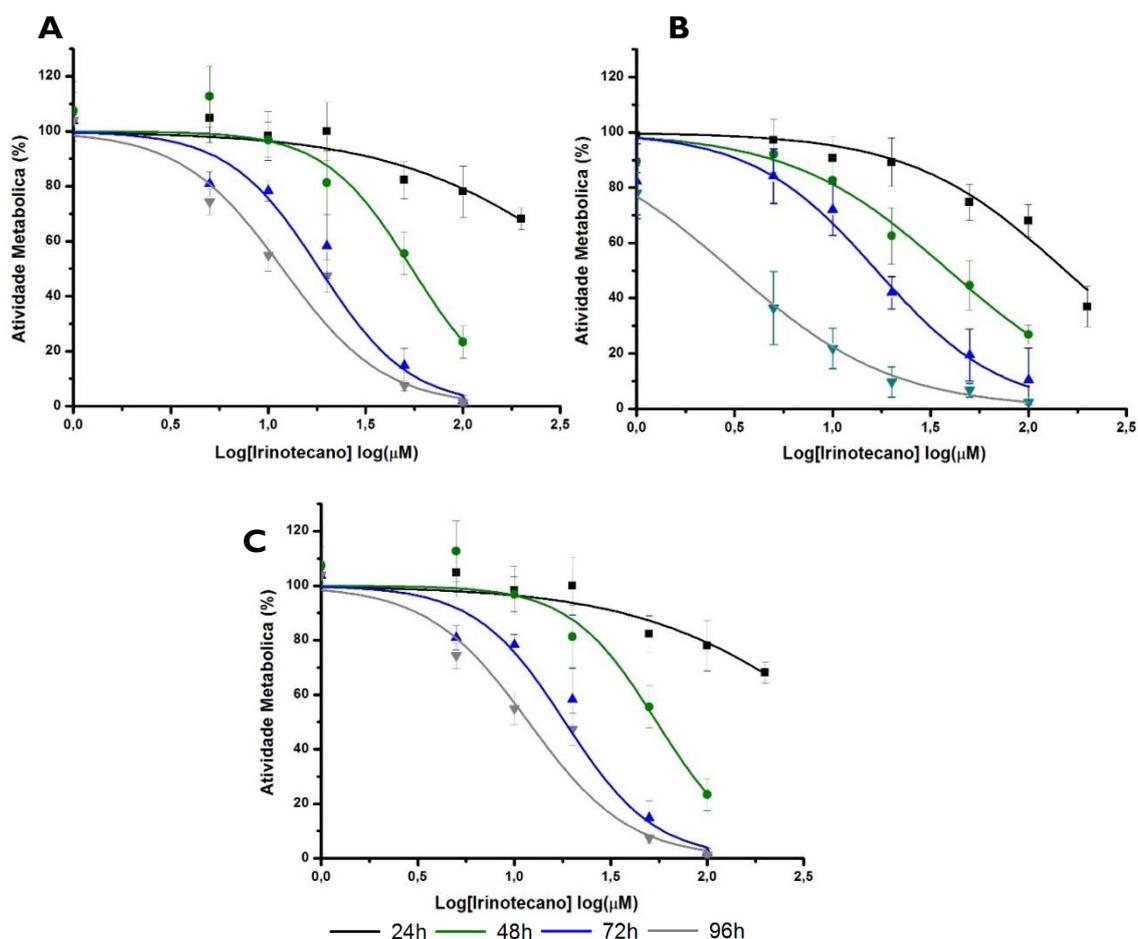
**Figura 25.** Avaliação da expressão da proteína P53 por western blot nas linhas celulares LS1034 e WiDr. À esquerda, o gráfico representa a expressão da proteína P53 sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência de P53 e a intensidade de fluorescência da  $\beta$ -actina, normalizada em relação ao controlo, apresentando a média e desvio padrão de pelo menos quatro experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas por \* para  $p<0,05$ , \*\* para  $p<0,01$  e \*\*\* para  $p<0,001$ . À direita, o imunoblot ilustrativo da expressão da proteína P53 e da  $\beta$ -actina para cada uma das condições experimentais.

### 3.1.2. MONOTERAPIA COM IRINOTECANO

Como um dos principais focos do trabalho é avaliar o potencial da combinação do butirato com o irinotecano foi necessário estudar o seu efeito isolado na proliferação das três linhas celulares tumorais, servindo estes resultados como termo de comparação.

#### 3.1.2.1. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para a definição de uma estratégia de combinação de compostos, tornou-se imperativo determinar o efeito citotóxico do irinotecano nas linhas celulares C2BBel, LSI034, e WiDr. Desta forma, as culturas celulares foram incubadas com concentrações crescentes deste composto que variaram entre 1  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$ . Os gráficos da Figura 26 representam as curvas dose-resposta obtidas a partir do tratamento com irinotecano nas



**Figura 26.** Curvas dose-resposta das três linhas celulares em estudo em resposta à incubação com irinotecano. Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio de MTT 24, 48, 72 e 96 horas após incubação com concentrações crescentes de irinotecano nas linhas celulares C2BBel (A), LSI034 (B) e WiDr (C). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado ( $n \geq 6$ ).

linhas celulares C2BBe1 (Figura 26 A), LS1034 (Figura 26 B) e WiDr (Figura 26 C) após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação

Através da observação da Figura 26, podemos verificar que o irinotecano possui um efeito inibitório da atividade metabólica em todas as linhas celulares tumorais em estudo, e que este efeito é dependente da concentração do composto e do tempo de incubação.

Verificou-se, com apoio da Tabela 4, que o valor de  $IC_{50}$  diminui à medida que se aumenta o tempo de incubação com o irinotecano, para todas as linhas celulares tumorais independentemente da sua localização e origem.

**Tabela 4.** Valores de  $IC_{50}$  obtidos para a incubação das linhas celulares C2BBe1, LS1034 e WiDr com irinotecano durante 24, 48, 72 e 96 horas. Estão também representados os valores de  $r^2$  e respetivos intervalos de confiança.

Linha celular	Tempo de incubação (h)	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	$r^2$	Intervalo de confiança ( $\mu M$ )
C2BBe1	24	*	*	*
	48	54,63	0,97	[37,90; 78,74]
	72	18,28	0,99	[11,13; 30,04]
	96	11,83	0,97	[7,64; 18,31]
LS1034	24	154,31	0,94	[102,97; 231,23]
	48	39,19	0,99	[30,36; 50,59]
	72	16,78	0,95	[12,15; 23,19]
	96	3,09	0,99	[2,31; 4,15]
WiDr	24	167,07	0,90	[94,77; 294,54]
	48	25,46	0,99	[18,32; 35,39]
	72	18,22	0,98	[9,53; 34,83]
	96	5,59	0,98	[2,91; 10,73]

Observando os valores de  $IC_{50}$  presentes na Tabela 4 constata-se que, as linhas celulares WiDr e LS1034 são mais sensíveis ao irinotecano do que as C2BBe1, não sendo sequer possível, para esta linha celular, determinar o  $IC_{50}$  às 24 horas de incubação com o composto. Assim, verifica-se que estas células são as mais resistentes ao irinotecano. Todavia, a linha celular tumoral mais sensível ao composto em estudo, apresentando os valores de  $IC_{50}$  mais baixos para tempos de incubação mais curtos é a linha celular WiDr e para tempos mais longos é a linha celular LS1034.

### **3.1.3. TERAPIA COMBINADA**

Uma vez efetuada a avaliação do efeito citotóxico do butirato e do irinotecano em monoterapia, foi analisado então o efeito da sua combinação, tendo por base o desenho experimental desenvolvido por Chou e colaboradores (Chou, 2010).

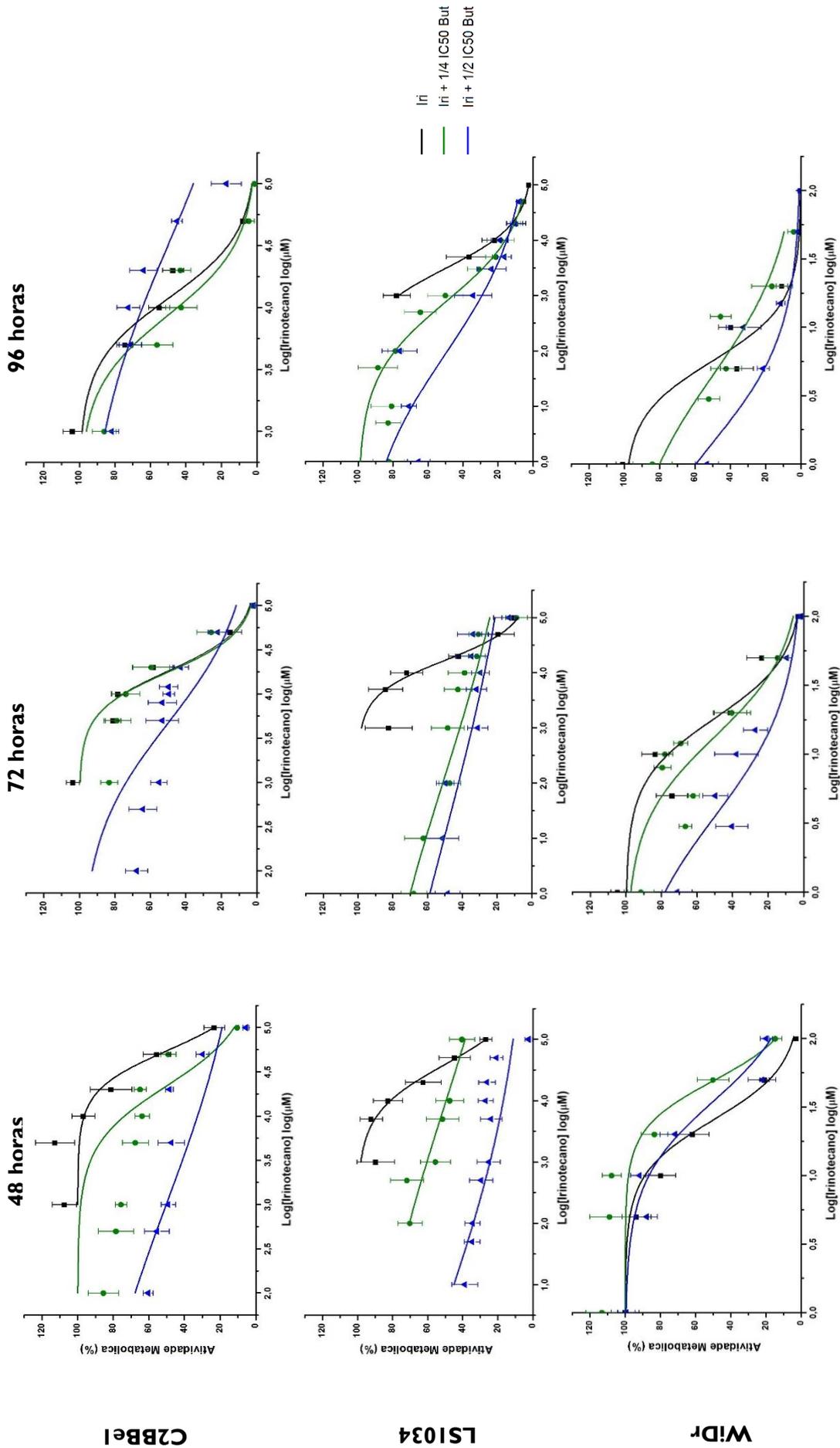
#### **3.1.3.1. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR**

Mais uma vez foi realizado o ensaio de MTT para avaliar o efeito da combinação dos dois compostos na capacidade de proliferação das células, após 48, 72 e 96 horas de incubação. A adição do irinotecano efetuou-se a diferentes tempos: em simultâneo e 24 horas após a incubação com o butirato, de modo a determinar qual a melhor estratégia de utilização da terapia combinada em estudo.

Os resultados com a incubação de irinotecano após 24 horas de incubação com butirato não se mostraram ser tão promissores como a incubação em simultâneo, tendo-se assim abandonado essa estratégia experimental.

Assim, na Figura 27 estão apresentados os resultados obtidos na proliferação das linhas celulares C2BBe1, LSI034 e WiDr após a incubação com concentrações crescentes de irinotecano isoladamente e em combinação com  $\frac{1}{4}$  ou  $\frac{1}{2}$  do  $IC_{50}$  de butirato durante 48, 72 e 96 horas.

De modo a traçar as curvas dose-resposta após a combinação dos compostos, foi necessário um controlo, correspondendo este às células que foram tratadas com o veículo de administração do irinotecano (DMSO), às quais se atribuiu o valor de proliferação celular de 100%. As curvas de dose-resposta foram calculadas recorrendo ao *software* OriginPro v. 8.0, o qual através do processamento dos resultados obtidos permitiu obter a curva de melhor ajuste aos resultados experimentais e forneceu a equação da mesma. Logo, foi possível, a partir das curvas concentração-resposta, calcular as concentrações de irinotecano que em combinação com butirato inibe em 50% a proliferação das linhas celulares em estudo. Estes valores estão apresentados na Tabela 5.

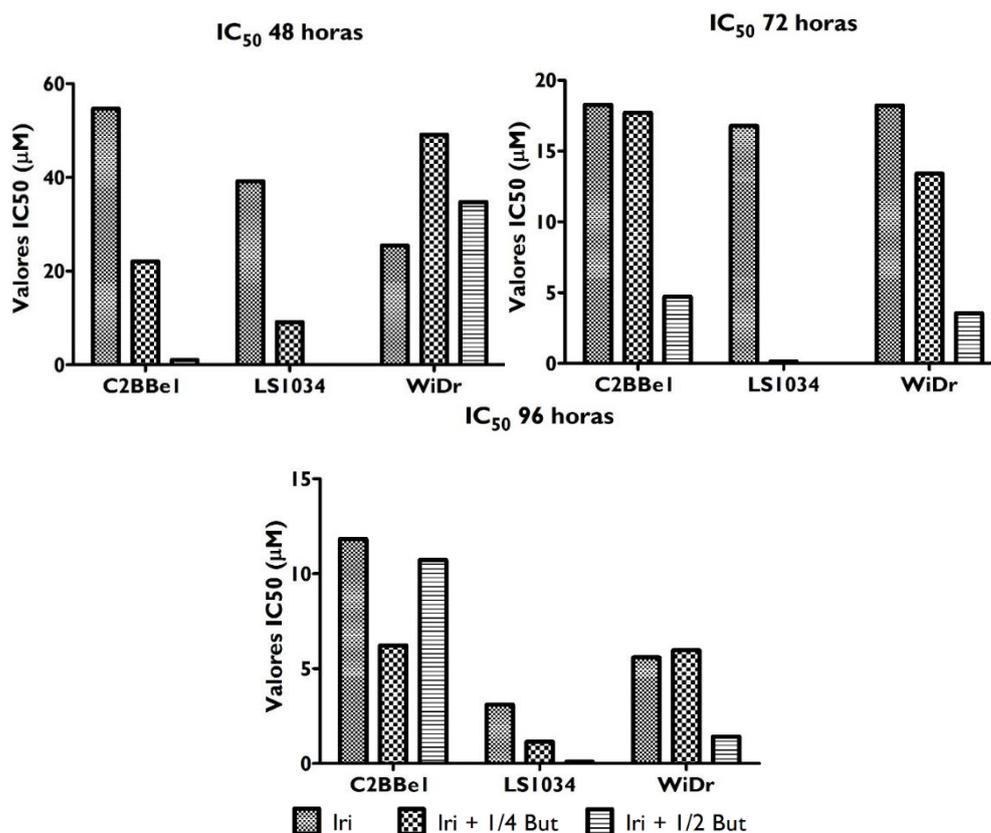


**Figura 27.** Curvas dose-resposta das três linhas celulares em estudo em resposta à incubação com concentrações crescentes de irinotecano isoladamente e em combinação com  $\frac{1}{4}$  ou  $\frac{1}{2}$  do IC<sub>50</sub> de butirato. Avaliação da atividade metabólica foi efetuada com recurso ao ensaio de MTT após 48, 72 e 96 horas de incubação com concentrações definidas em estudo para a terapia combinada nas linhas celulares C2Be1, LSI034 e WiDr. Os resultados expressam a média e o desvio-padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado (n≥6).

**Tabela 5.** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos após incubação das linhas celulares C2BBe1, LSI034 e WiDr com irinotecano e butirato após 48, 72 e 96 horas. Estão também representados os valores de r<sup>2</sup> e os intervalos de confiança obtidos.

Linhas Celulares	Condição	Tempo de Incubação (h)	IC <sub>50</sub> (μM)	r <sup>2</sup>	Intervalo de Confiança (μM)
C2BBe1	¼ IC <sub>50</sub> But	48	22,06	0,85	[9,10; 53,49]
		72	17,70	0,94	[6,54; 47,93]
		96	6,22	0,98	[3,75; 10,34]
	½ IC <sub>50</sub> But	48	1,04	0,56	[0,04; 25,38]
		72	4,71	0,72	[1,42; 15,57]
		96	10,73	0,74	[5,43; 21,20]
LSI034	¼ IC <sub>50</sub> But	48	9,13	0,88	[1,93; 43,15]
		72	0,13	0,79	[0,01; 1,67]
		96	1,15	0,85	[0,40; 3,30]
	½ IC <sub>50</sub> But	48	0,004	0,61	[0,00; 0,22]
		72	0,01	0,70	[0,00; 0,28]
		96	0,09	0,93	[0,03; 0,32]
WiDr	¼ IC <sub>50</sub> But	48	49,13	0,97	[30,25; 79,80]
		72	13,40	0,88	[6,67; 26,90]
		96	5,96	0,81	[1,29; 27,53]
	½ IC <sub>50</sub> But	48	34,79	0,97	[23,30; 51,93]
		72	3,54	0,92	[1,79; 6,99]
		96	1,41	0,78	[0,56; 3,55]

Na Figura 28 estão representados os valores de IC<sub>50</sub> de irinotecano obtidos em monoterapia e em combinação com ½ e ¼ do valor de IC<sub>50</sub> do butirato para as linhas celulares C2BBe1, LSI034 e WiDr.



**Figura 28.** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos em monoterapia e em terapia combinada. Os gráficos representam os valores de IC<sub>50</sub> do irinotecano em monoterapia e em terapia combinada com butirato nas linhas celulares C2BBel, LS1034 e WiDr para os três períodos de incubação considerados na terapia combinada (48, 72 e 96 horas).

Este estudo permitiu, através do cálculo do índice de combinação, averiguar a existência de sinergia entre o irinotecano e o butirato. Como foi referido anteriormente, no capítulo Materiais e Métodos, o índice de combinação pode tomar valores inferiores, iguais ou superiores a 1, sendo que se o resultado for igual a 1, considera-se que a combinação dos compostos em estudo tem um efeito aditivo; se o resultado for inferior a 1 então existe sinergia entre ambos; e se, pelo contrário, o resultado for superior a 1, então a combinação é antagonista. Os valores de IC obtidos em cada linha celular para cada condição estão representados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Valores do índice de combinação obtidos após incubação das linhas celulares C2BBe1, LS1034 e WiDr com irinotecano e butirato após 48, 72 e 96 horas. Os valores do índice de combinação representados a negrito demonstram as combinações dos compostos em que se obteve sinergia. Estão também apresentados os valores de p obtidos para cada linha celular.

	Índice de combinação	C2BBe1	p	LS1034	p	WiDr	p
48h	Iri + 1/4 But	<b>0,654</b>	0,180	<b>0,483</b>	0,053	2,179	0,216
	Iri + 1/2 But	<b>0,519</b>	<0,001	<b>0,500</b>	0,007	1,866	0,060
72h	Iri + 1/4 But	1,218	1,000	<b>0,258</b>	0,005	<b>0,985</b>	1,000
	Iri + 1/2 But	<b>0,758</b>	<0,001	<b>0,501</b>	0,005	<b>0,694</b>	0,337
96h	Iri + 1/4 But	<b>0,776</b>	1,000	<b>0,620</b>	0,461	1,317	0,621
	Iri + 1/2 But	1,407	<0,0001	<b>0,529</b>	0,002	<b>0,753</b>	1,000

Assim, através da análise da Tabela 6, verifica-se que os efeitos resultantes da combinação dependem da linha celular, do tempo de incubação e da concentração de butirato testada.

Vejamos, na linha celular C2BBe1, ocorre de efeito sinérgico mas apenas para algumas condições. Isto é, às 48 horas para as combinações testadas constatou-se a existência de sinergia, enquanto que para os tempos de incubação mais longos apenas com uma das combinações testadas foi verificado efeito sinérgico, com  $\frac{1}{2}$  do  $IC_{50}$  do butirato às 72 horas e com  $\frac{1}{4}$  do  $IC_{50}$  do butirato às 96 horas. Todavia, nesta linha tumoral verificou-se um comportamento antagónico, como evidenciado na tabela, às 72 e 96 horas nas restantes combinações.

Relativamente à linha celular LS1034, a linha tumoral quimiorresistente, obteve-se efeito sinérgico para todas as condições testadas, isto é, para qualquer tempo de incubação e concentração de butirato. Desta forma, existe sinergia com  $\frac{1}{4}$   $IC_{50}$  de butirato às 48 horas ( $IC=0,483$ ), 72 horas ( $IC=0,258$ ) e 96 horas ( $IC=0,620$ ) de incubação e com  $\frac{1}{2}$   $IC_{50}$  de butirato às 48 horas ( $IC=0,500$ ), 72 horas ( $IC=0,501$ ) e às 96 horas de incubação ( $IC=0,529$ ). Além disto, nesta linha celular foi possível diminuir significativamente ( $p=0,005$ ) o  $IC_{50}$  do irinotecano às 72 horas quando comparado com o mesmo período de incubação em monoterapia. Em geral, para todas as combinações testadas verificou-se o decréscimo do  $IC_{50}$  do irinotecano em relação à monoterapia.

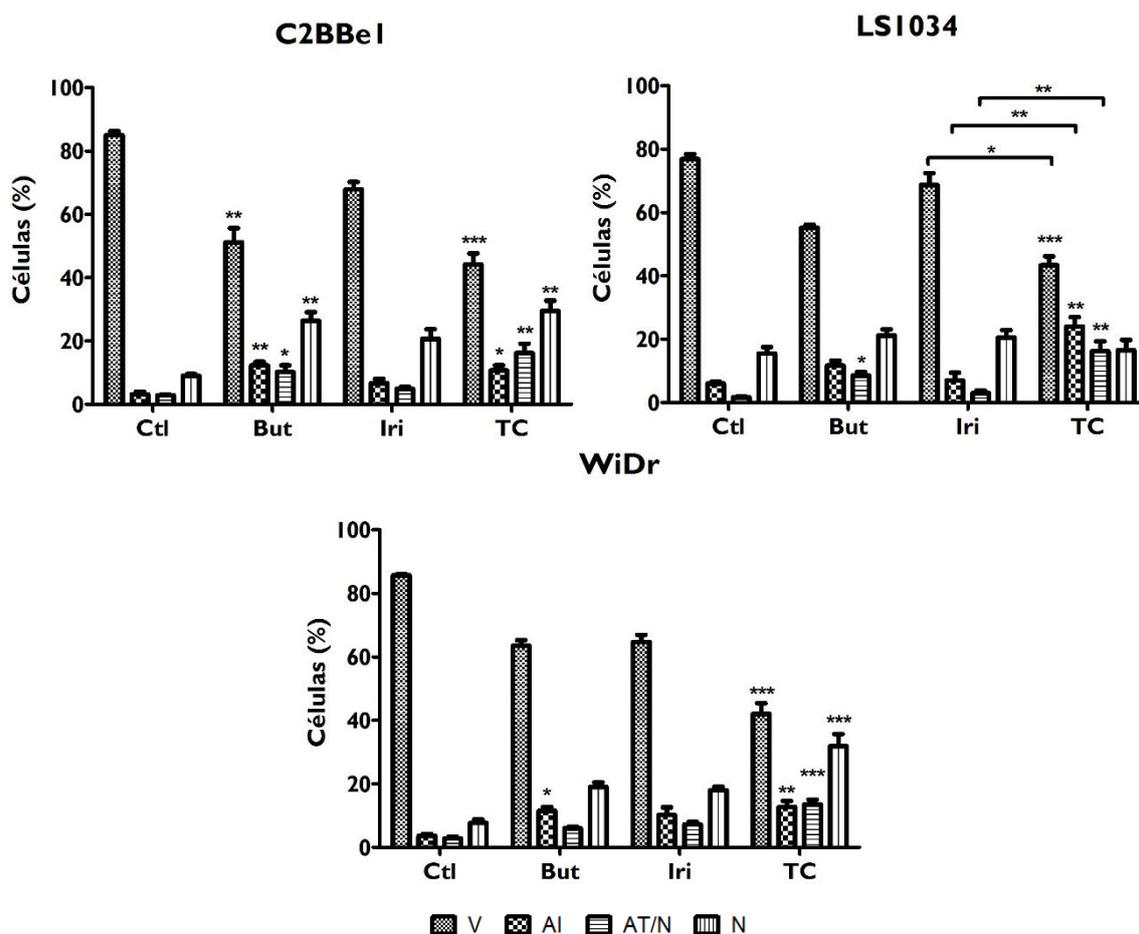
Por sua vez, na linha celular WiDr, verificou-se efeito sinérgico apenas para 72 horas de incubação em ambas as condições testadas e para 96 horas de incubação com  $\frac{1}{2}$  do IC<sub>50</sub> do butirato. Para as restantes combinações testadas verificou-se que existe um efeito antagónico.

Deste modo, os valores de concentração dos dois compostos obtidos da melhor combinação com um menor tempo de incubação para cada linha celular foram usadas para os restantes ensaios. Assim, para as linhas celulares LS1034 e C2BBel foram usadas as concentrações obtidas do IC<sub>50</sub> do irinotecano em combinação com  $\frac{1}{2}$  do IC<sub>50</sub> do butirato às 48 horas. Enquanto que, para a linha WiDr, como a sinergia foi obtida apenas a partir das 72 horas de incubação com os dois compostos, logo, foram usadas concentrações correspondentes ao IC<sub>50</sub> do irinotecano obtido da combinação com  $\frac{1}{2}$  do IC<sub>50</sub> do butirato às 72 horas.

### **3.1.3.2. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR**

Após avaliação do efeito sinérgico da combinação de butirato com irinotecano a nível da proliferação celular, foi impreterível verificar até que ponto esta sinergia é traduzida também a nível da viabilidade celular. A Figura 29 apresenta os resultados dos estudos da viabilidade celular realizados. Estes revelaram que tanto quando presentes em monoterapia como em terapia combinada, o butirato e o irinotecano induziram uma diminuição da população de células viáveis e o aumento do número de células em apoptose tardia/necrose ou necrose, nas linhas celulares em estudo. Tal como dito anteriormente, as condições testadas correspondem às concentrações de butirato e de irinotecano com que se obtiveram os melhores resultados no ensaio de MTT, num menor tempo de incubação.

Como se pode verificar, na linha celular C2BBel é possível observar que a população de células viáveis no controlo corresponde a 85 %, sendo que após 48 horas de tratamento com a terapia combinada, esta diminuiu para 44,2 %, com significância estatística em relação ao controlo ( $p < 0,001$ ). Verifica-se também diferenças estatisticamente significativas com a monoterapia com butirato ( $p = 0,009$ ) relativamente ao controlo. Podemos também observar um aumento significativo na população celular em apoptose inicial após a incubação com butirato ( $p = 0,004$ ) e com os dois compostos ( $p = 0,023$ ). A incubação com butirato leva a um aumento significativo da população celular em apoptose tardia/necrose ( $p = 0,024$ ), facto que



**Figura 29.** Avaliação da viabilidade celular. Os resultados estão representados na forma de percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N), 48 horas sem tratamento ou após a incubação com butirato, irinotecano e os dois compostos para as linhas celulares C2BBe1 e LSI034 e, 72 horas para a linha celular WiDr. Os resultados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com \* para  $p < 0,05$ ; \*\* para  $p < 0,01$  e \*\*\* para  $p < 0,001$ .

também se verifica quando as células são incubadas com os dois compostos em simultâneo ( $p = 0,001$ ). Podemos também observar que a incubação com butirato leva a um aumento significativo da população em necrose ( $p = 0,008$ ) e o mesmo se verifica para a incubação com os dois compostos em simultâneo ( $p = 0,005$ ).

Ao observar o comportamento dos compostos a nível da viabilidade celular na linha LSI034, podemos verificar que a viabilidade decresce significativamente desde a condição controlo, não sujeita a tratamento, de 76,8 % para 43,3 % com a incubação com os dois compostos, com diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo ( $p < 0,001$ ) e relativamente à monoterapia com irinotecano ( $p = 0,011$ ). É possível também observar que a incubação com os dois compostos leva a um aumento significativo da população celular em apoptose inicial com significância estatística ( $p = 0,003$ ). Este mesmo tratamento com a terapia combinada induz um aumento significativo da população em apoptose inicial em relação ao tratamento apenas com o irinotecano ( $p = 0,008$ ). A incubação

com butirato induz um aumento da população celular em apoptose tardia/necrose, em que podemos verificar significado estatístico ( $p=0,043$ ); este comportamento também se pode verificar quando a população celular é incubada com os dois compostos em simultâneo ( $p=0,001$ ). O tratamento com os dois compostos induz também um aumento significativo da população em apoptose tardia/necrose em relação ao tratamento com irinotecano ( $p=0,006$ ).

Ao observar a linha celular WiDr, verifica-se que a viabilidade decresce significativamente de 85,7 % para 42,0 % quando as células são incubadas com os dois compostos em simultâneo ( $p<0,001$ ). Podemos verificar também que existe um aumento da população celular em apoptose inicial com a incubação com butirato ( $p=0,018$ ) e com os dois compostos em simultâneo ( $p=0,006$ ). Este mesmo tratamento simultâneo das células com os dois compostos leva a um aumento da população celular em apoptose tardia/necrose e da população celular em necrose em relação ao controlo ( $p<0,001$  para ambas as comparações).

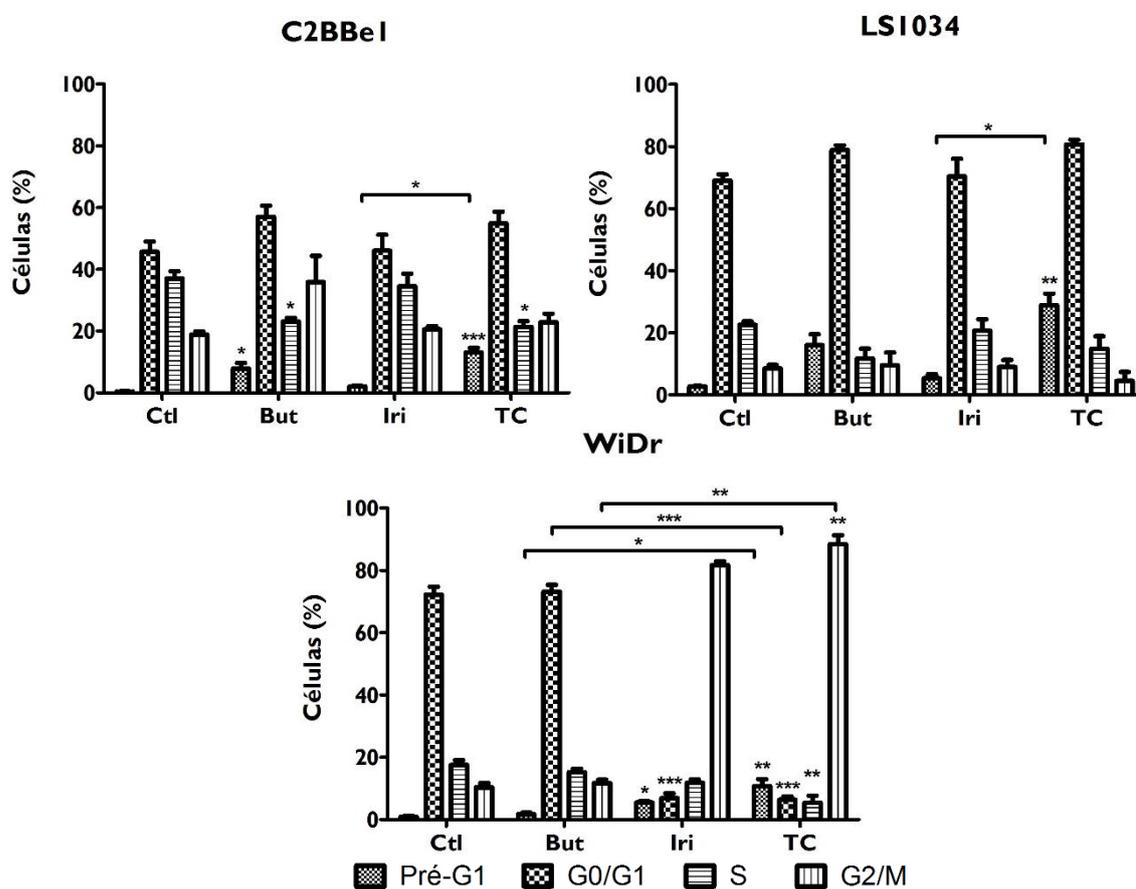
De realçar que nas linhas celulares LS1034 e WiDr, a terapia combinada induziu diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo em termos de diminuição da viabilidade celular e aumento da morte celular, diferenças essas que não se verificaram nas respetivas monoterapias com butirato e irinotecano.

### **3.1.3.3. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR**

Como foi referido no capítulo anterior, com o propósito de avaliar em que fase do ciclo celular as células C2BBel, LS1034 e WiDr se encontram com ou sem tratamento, recorreu-se à citometria de fluxo com a marcação com a sonda de IP/RNase. Neste estudo, avaliaram-se os efeitos da terapia combinada no ciclo celular, uma vez que se pretende relacionar a fase do ciclo celular com os restantes resultados.

Ao analisar o gráfico da Figura 30 correspondente às células C2BBel podemos verificar que nesta linha celular há um aumento significativo do pico pré-apoptótico (fase pré-G1) relativamente ao controlo, no tratamento com butirato ( $p=0,01$ ), verificando-se o mesmo após tratamento com a combinação dos dois compostos ( $p<0,001$ ). Quando as células foram tratadas com butirato e terapia combinada, verificou-se uma diminuição significativa da população celular em fase S ( $p=0,040$  e  $p=0,012$ , respetivamente) em relação ao controlo. Relativamente ao efeito destes dois compostos nas outras fases do ciclo celular,

não parece haver diferenças significativas da população celular em fase G0/G1 e na fase G2/M, na qual apesar de se observar um aumento da população nesta fase do ciclo celular, esta não tem significância estatística.



**Figura 30.** Avaliação do ciclo celular. Os resultados estão representados na forma de percentagem (%) de células em cada uma das fases do ciclo celular, 48 horas sem tratamento ou após a incubação com butirato, irinotecano e os dois compostos para as linhas celulares C2BBel e LS1034 e 72 horas para a linha celular WiDr. Os resultados exprimem a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$  e \*\*\* para  $p < 0,001$ .

No gráfico da Figura 30 relativo à linha celular LS1034, verificou-se que, apesar de qualquer uma das condições induzir um aumento da população celular em fase pré-G1, apenas existe significado estatístico na terapia combinada ( $p=0,001$ ). Podemos também verificar que há um aumento do número de células em fase G0/G1 em relação ao controlo, quando as células são incubadas com butirato e com a terapia combinada, contudo sem diferenças estatisticamente significativas. Em relação à população celular em fase S, repara-se que existe uma diminuição ligeira desta população em relação ao controlo quando esta foi incubada com butirato e com a combinação dos dois compostos, no entanto, este resultado não mostrou ter significância estatística. As ligeiras alterações na fase G2/M que se

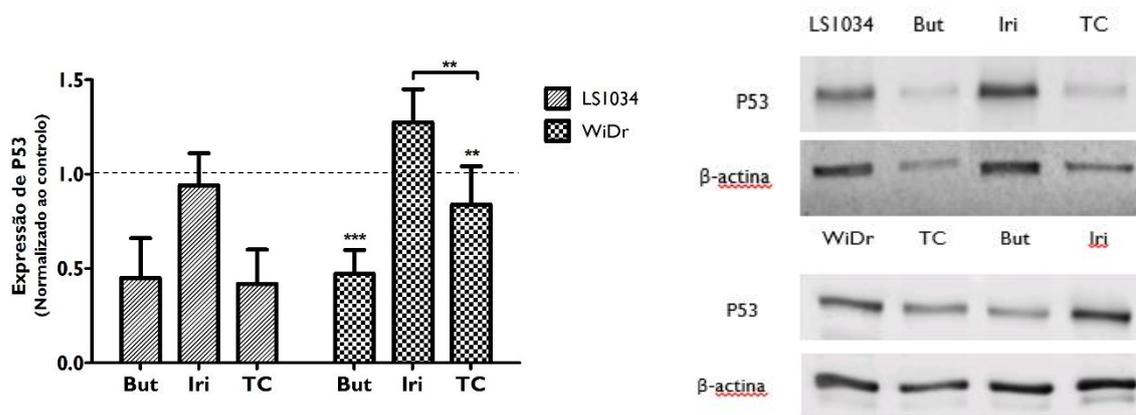
verificaram em relação ao controlo em todas as condições, não demonstraram qualquer significado estatístico.

Observando o gráfico da Figura 30 correspondente à população celular da linha WiDr, podemos verificar que, a incubação com butirato não alterou significativamente o perfil da população celular nas fases do ciclo celular, em relação ao controlo. Por outro lado a incubação com irinotecano induz um aumento significativo do pico apoptótico ( $p=0,035$ ), tal como o tratamento com a terapia combinada ( $p=0,001$ ). Quando as células são tratadas com irinotecano ou com os dois compostos em simultâneo verifica-se também uma diminuição significativa da população celular em fase G0/G1 ( $p<0,001$  e  $p<0,001$ , respetivamente), sendo esta diminuição acompanhada por um aumento da população celular em G2/M em ambas as condições, sendo este resultado significativo apenas para a terapia combinada ( $p=0,004$ ).

#### **3.1.3.4. EXPRESSÃO DE P53**

De modo a avaliar o efeito da terapia combinada na expressão de P53 nas linhas celulares C2BBel, LS1034 e WiDr procedeu-se a um ensaio de *western blot*. No entanto, como referido acima, as células C2BBel não expressam a proteína P53 e, por isso, este estudo focou-se apenas nas linhas celulares tumorais LS1034 e WiDr, sendo que estas foram tratadas com as concentrações de butirato e irinotecano com as quais melhores resultados se obtiveram no ensaio de MTT, num menor tempo de incubação.

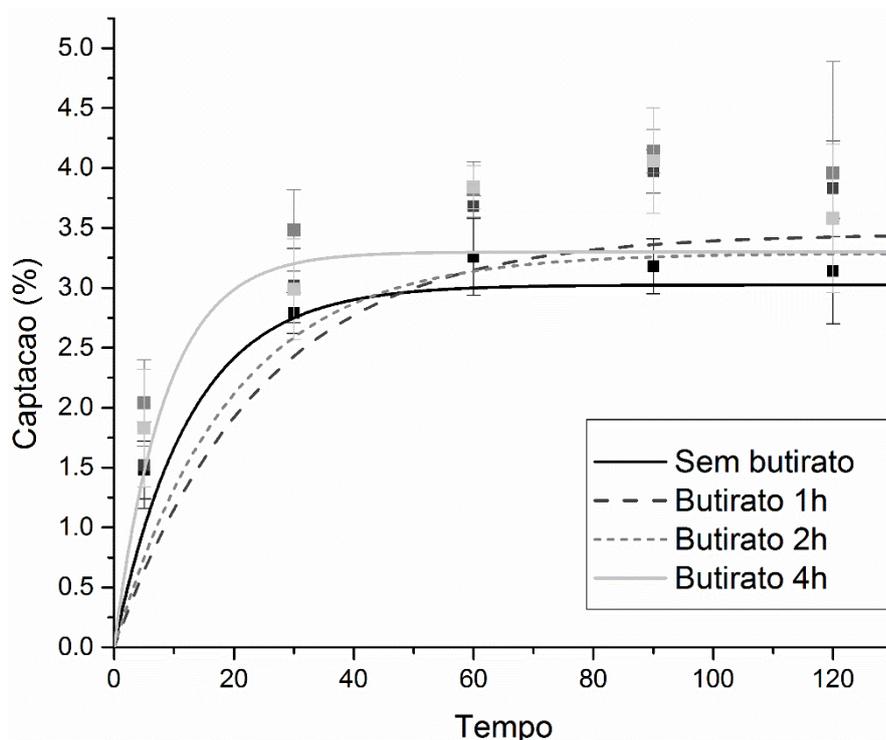
Através da análise do gráfico da Figura 31, podemos observar uma diminuição da expressão da proteína P53 relativamente ao controlo em ambas as linhas celulares após o tratamento com butirato, sendo este resultado significativo para a linha celular WiDr ( $p<0,001$ ). Também se pode verificar que a incubação com irinotecano leva a um aumento da expressão da proteína P53 na linha WiDr, no entanto não se verificou significância estatística para este evento. É possível verificar que a incubação das linhas celulares com a terapia combinada leva a um decréscimo da expressão de P53, no entanto, só se verificou significância estatística para a terapia combinada na linha celular WiDr em relação ao controlo e à incubação com irinotecano ( $p=0,006$  e  $p=0,002$ , respetivamente).



**Figura 31.** Avaliação da expressão da proteína P53 por western blot nas duas linhas celulares LSI034 e WiDr. À esquerda, o gráfico representa a expressão da proteína P53 nas condições testadas (butirato - But, irinotecano - Iri e terapia combinada - TC) sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência de P53 e a intensidade de fluorescência da  $\beta$ -actina, apresentando a média e o desvio padrão de pelo menos 3 experiências diferentes obtidas. As diferenças significativas em relação ao controle estão representadas por \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$  e \*\*\* para  $p < 0,001$ . À direita, o imunoblot ilustrativo da expressão da proteína P53 e da  $\beta$ -actina para cada uma das condições experimentais.

### 3.1.4. AVALIAÇÃO DA CAPTAÇÃO DO $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI

Pelo estudo dos efeitos da terapia combinada sobre as linhas celulares C2BBel, LSI034 e WiDr, foi possível verificar que os resultados mais promissores, isto é, menores índices de combinação e menores valores de  $\text{IC}_{50}$ , foram obtidos para a linha celular LSI034.



**Figura 32.** Curvas de influxo do composto  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI na linha celular LSI034. A capturação foi expressa em porcentagem de atividade total. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experiências independentes realizadas em duplicado ( $n=8$ ).

A linha celular LSI034, recorde-se, que esta linha celular está descrita como sendo quimiorresistente e, de acordo com o capítulo anterior, expressa uma proteína que lhe confere resistência a fármacos pela extrusão dos mesmos. Segundo Luo e colaboradores (Luo *et al.*, 2002), o irinotecano é substrato da glicoproteína P (gpP). Uma vez que nesta linha se obteve os melhores valores de combinação, isto poderá sugerir que o irinotecano não está a ser extrusado pela gpP. Esta questão levantou a hipótese de que o butirato possa estar a influenciar o comportamento normal desta proteína. Assim, recorreu-se aos estudos de captação com o  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI. Como foi dito no capítulo anterior, este radiofármaco é catiónico e lipofílico, características comuns de vários substratos de bombas de efluxo da MDR, como a proteína gpP. Assim, o  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI constitui um possível método para medir a atividade funcional deste tipo de proteínas (Piwnica-Worms *et al.*, 1993).

Deste modo as células foram tratadas com butirato durante 1, 2 e 4 horas antes do início dos estudos de captação com  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI. Como se pode verificar na Figura 32, repara-se que existe um aumento significativo da captação do composto  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI ao final de 90 minutos, quando as células são incubadas com butirato aos diferentes tempos em relação ao controlo (1 hora,  $p=0,011$ ; 2 horas,  $p=0,002$ ; e às 4 horas,  $p=0,005$ ). É possível verificar um aumento da captação nos primeiros tempos com a incubação com butirato (4 horas), no entanto este evento não demonstrou ser estatisticamente significativo.

**Tabela 7.** Valores dos parâmetros  $A_{\max}$  (captação máxima) e  $T_{50}$  (tempo para atingir metade da captação máxima), erros padrão e valores de  $p$  obtidos para a linha celular LSI034, para cada condição de incubação com butirato.

Tempo de Incubação (h)	$A_{\max}$ (%)	Erro Padrão	$T_{50}$ (min)	Erro Padrão
0	3,024	0,258	8,678	7,757
1	3,451	0,841	17,084	20,632
2	3,290	1,054	13,485	26,529
4	3,299	0,444	5,909	18,054
p-value		0,980		0,978

Pela análise da Tabela 7, é possível verificar diferenças nos valores de captação máxima ( $A_{\max}$ ) entre a incubação com butirato durante 1, 2 e 4 horas ( $A_{\max}=3,451\%$ ,  $A_{\max}=3,290\%$  e  $A_{\max}=3,299\%$ , respetivamente) e a ausência do butirato (condição de controlo,  $A_{\max}=3,024\%$ ), sendo que realmente as maiores diferenças de  $A_{\max}$  se verificam

para a 1 hora com a incubação com butirato em relação ao controlo. No entanto, o tempo que foi necessário para atingir metade da captação máxima ( $T_{50}$ ), foi maior quando as células foram incubadas com butirato durante 1 ( $T_{50}=17,1$  min) e 2 horas ( $T_{50}=13,5$  min) do que no controlo ( $T_{50}=8,7$  minutos). No entanto, observou-se que, quando as células são sujeitas à incubação com butirato durante 4 horas, o tempo necessário para atingir metade da captação máxima ( $T_{50}=5,9$  minutos) é menor do que na condição de controlo. No entanto, estas diferenças nos parâmetros das captações não demonstraram qualquer significância estatística.

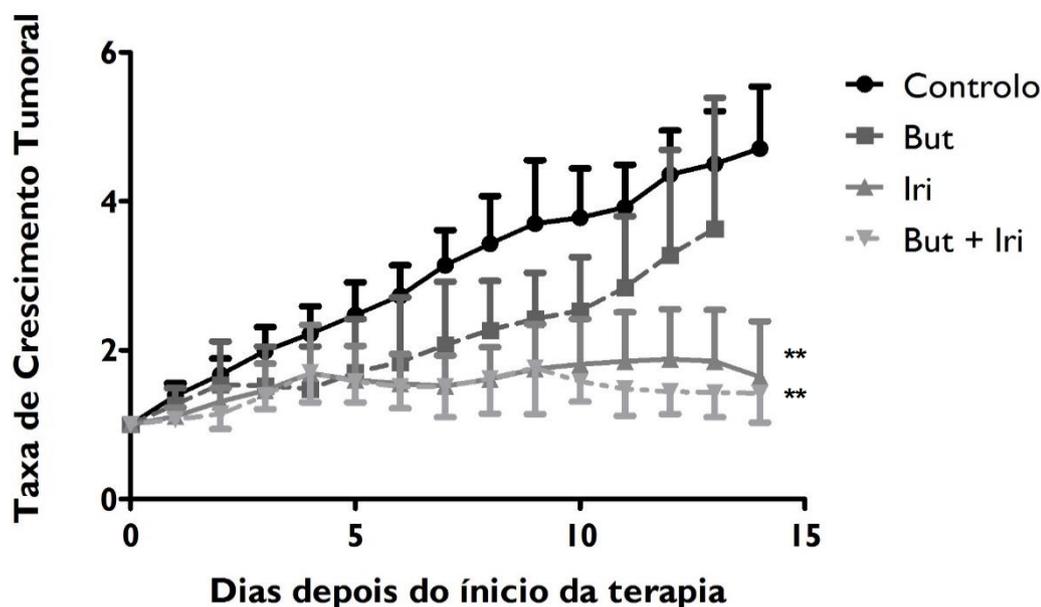
### **3.2. ESTUDOS *IN VIVO***

Uma vez efetuada a avaliação do efeito da combinação com butirato e com irinotecano *in vitro*, foi analisado o efeito da combinação *in vivo*. Para tal, como dito anteriormente no capítulo Materiais e Métodos, usaram-se dois modelos animais, o modelo heterotópico, com o objetivo de avaliar o potencial da combinação com a evolução do crescimento tumoral num tumor implantado fora do seu local de origem e o modelo ortotópico, com o objetivo de avaliar o efeito do butirato após inoculação das células no seu local de origem, mimetizando assim o microambiente tumoral. No modelo heterotópico, a linha tumoral inoculada foi a linha WiDr, uma vez que esta linha tumoral é capaz de desenvolver tumor num curto espaço de tempo e com um comportamento pouco variável, o que permitiu realizar rapidamente os estudos para todas as terapias em causa. Nos modelos ortotópicos, a linha inoculada foi a linha tumoral LSI034, uma vez que esta linha celular tem como local de origem o cego e, sendo esta zona, uma das zonas em que se verifica elevada incidência do cancro do cólon tem todo o interesse estudar o efeito do butirato sobre esta condição *in vivo*. Por outro lado, os resultados obtidos nos estudos *in vitro* com esta linha celular mostraram ser bastante promissores, com uma boa resposta à terapia com butirato e com a combinação de butirato e irinotecano.

### 3.2.1. MODELOS HETEROTÓPICOS

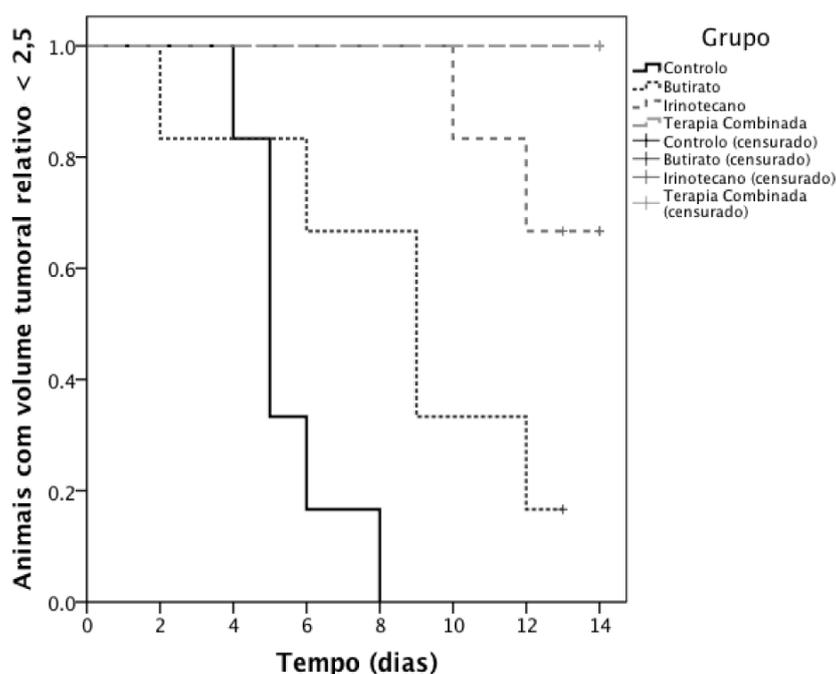
Após inoculação das células WiDr quando o volume tumoral atingiu valores entre os 300 e os 500 mm<sup>3</sup>, procedeu-se ao início do tratamento.

Primeiro, começou-se por avaliar o potencial terapêutico do butirato administrado isoladamente durante 14 dias, cuja metodologia foi descrita no capítulo anterior. Verifica-se pela Figura 33 a inibição do crescimento tumoral ao longo do tempo, na medida em que com o decorrer do tratamento, a taxa de crescimento tumoral é inferior à do controlo, no entanto, este resultado não se demonstrou possuir significado estatístico.



**Figura 33.** Avaliação da taxa de crescimento tumoral em xenotransplantes com a linha tumoral WiDr. A figura evidencia quatro grupos de animais: (1) Controlo, isto é, não sujeitos a tratamento; (2) But, sujeitos a terapia com uma injeção i.p. diária de butirato na primeira semana e de dois em dois dias na segunda semana; (3) Iri, sujeitos a terapia com injeção i.p. no 1º, 5º e 9º dia com irinotecano e (4) But + Iri, sujeitos a terapia combinada de butirato e irinotecano, em que os animais foram sujeitos às duas terapias em simultâneo. Os resultados representam a média e desvio-padrão de seis ratinhos por condição. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas por \*\* para  $p < 0,01$ .

De seguida, avaliou-se o efeito do irinotecano no crescimento tumoral e, para tal, o irinotecano foi administrado isoladamente durante 14 dias, como já foi referido no capítulo anterior. Ao observar a Figura 33 podemos verificar que o irinotecano induz uma diminuição significativa da taxa de crescimento tumoral em relação ao controlo ( $p=0,003$ ).



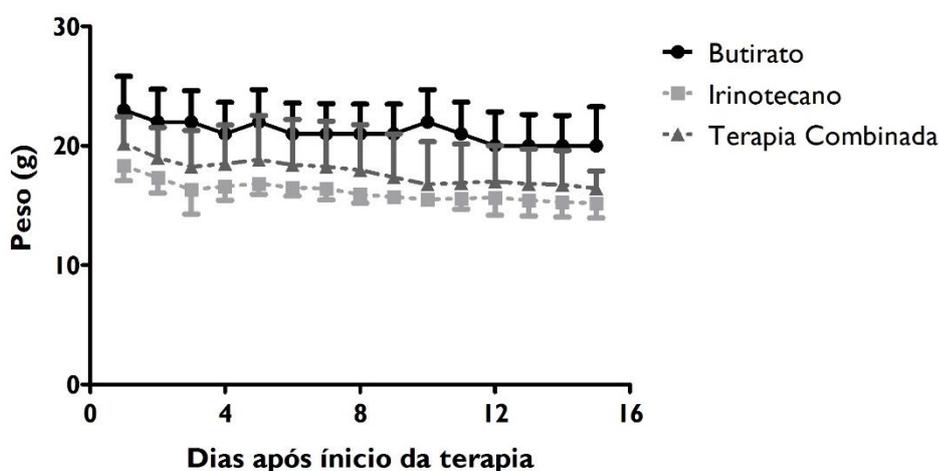
**Figura 34.** Curvas Kaplan-Meier. Avaliação do tempo de evento para os grupos de tratamento. Cada grupo de tratamento foi composto por 6 animais em terapia durante 14 dias. Os animais foram divididos em quatro grupos: 1º grupo controlo, em que estes não foram sujeitos a tratamento (linha contínua), 2º grupo com butirato, em que os animais foram sujeitos à terapia com butirato (linha a tracejado escuro), 3º grupo irinotecano, em que os animais foram sujeitos à terapia com irinotecano (linha a tracejado cinza escuro) e, 4º grupo da terapia combinada, em que os animais foram sujeitos à terapia com butirato e irinotecano em simultâneo (linha a tracejado cinza claro).

Por último, pretendeu-se avaliar o efeito da terapia combinada e, com este fim, os dois compostos foram administrados durante 14 dias. Como se pode verificar, a taxa de crescimento tumoral decresce significativamente em relação ao controlo ( $p=0,003$ ). Podemos verificar também que a inibição do crescimento tumoral, após tratamento com a terapia combinada, é mais acentuada a partir do 9º dia em relação a todas as restantes condições.

Na Figura 34 apresentam-se as curvas Kaplan-Meier, as quais permitem uma análise de sobrevivência. Neste caso a curva foi adotada para analisar um evento, de forma a comparar o tempo que o animal em estudo desenvolve determinado evento. Este evento foi definido como o momento em que o volume tumoral relativo atinja um valor superior ou igual a 2,5.

Neste estudo, os animais que não atingiram o evento até ao final do tempo de terapia são censurados. Logo, este tipo de análise permite usar a informação de todos os animais até o momento em que desenvolveram o evento, constituindo uma técnica ideal para analisar o efeito terapêutico dos 3 tratamentos.

Ao observar a Figura 34, verifica-se que no grupo controlo (ausência de tratamento), após 8 dias de terapia todos os animais tinham atingido o evento, isto é, o volume tumoral relativo ser superior a 2,5. Nenhum dos animais foi censurado durante os 14 dias. Quando verificamos o grupo de tratamento com butirato, reparamos que no 2º dia de tratamento um animal tinha atingido o evento em estudo. No entanto, é necessário chegar ao fim de 13 dias de terapia para que 5 dos 6 animais em estudo atinjam o evento. Ao observarmos o grupo de estudo com tratamento com irinotecano, reparamos que apenas 2 dos 6 animais em estudo atingiram o evento até ao final da terapia. Por último, no grupo da terapia combinada, reparamos que nenhum dos 6 animais em estudo atingiu o evento até ao final do tempo de terapia.

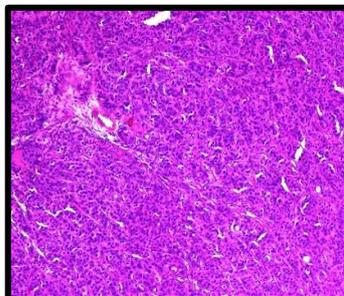


**Figura 35.** Variação de massa dos animais por grupo ao longo do tempo de terapia. O gráfico representa a média e desvio padrão da variação da massa corporal dos 6 animais de cada grupo.

Durante as terapias, a massa dos animais foi monitorizado ao longo do tempo, sendo que a média das massas dos animais em controlo era de 23 g ao longo do tempo de terapia. A partir da análise do gráfico da Figura 35, repara-se que todos os tratamentos levam a uma ligeira diminuição da massa dos animais ao longo do tempo. Pode-se então observar que a terapia com butirato leva a uma menor diminuição das massas dos animais do que as restantes terapias. Por outro lado, a terapia com irinotecano e a terapia combinada são as terapias em estudo em que se pode evidenciar uma diminuição mais acentuada.

Como foi referido no capítulo anterior, os tumores foram excisados dos animais para posterior avaliação. Foram analisados 4 tumores, um de cada grupo de tratamento (butirato, como é possível ver na Figura 36, irinotecano e terapia combinada) e um controlo, em que o exame microscópico permitiu avaliar uma neoplasia maligna de comportamento expansivo, morfológicamente constituída por maciços e trabéculas de células de citoplasma

hipereosinófilico e núcleos hipercromáticos, irregulares, com pleomorfismo nuclear moderado a grave. Foi possível também verificar necrose, bem como apoptose e atividade mitótica. Destas observações, podemos concluir que se estava presente a um carcinoma pouco diferenciado/indiferenciado

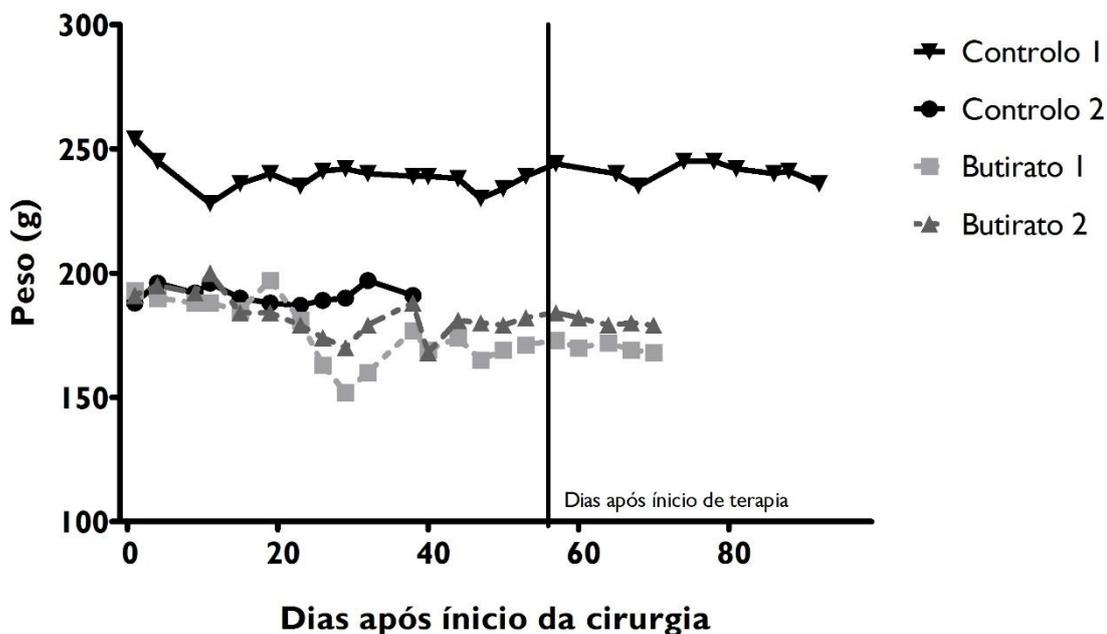


**Figura 36.** Tumor excisado de um animal sujeito a tratamento com butirato.

### 3.2.2. MODELOS ORTOTÓPICOS

Depois de avaliar os efeitos do butirato *in vitro* e sobre o crescimento tumoral, pretendeu-se desenvolver uma terapia num modelo ortotópico. A linha tumoral mais sensível ao butirato e ao efeito da terapia combinada foi a linha celular LSI034, uma linha quimiorresistente, de origem humana do cego. Assim, para este procedimento foram utilizados 4 animais, sujeitos a cecostomia (uma intervenção cirúrgica de uso menos comum, usada em caso de oclusão intestinal para esvaziar todo o intestino a montante da obstrução intestinal). Estes animais foram divididos em dois grupos: o grupo controlo, constituído por dois animais submetidos a cecostomia com posterior monitorização das suas massas e da sua condição fisiológica duas vezes por semana durante o tempo de experiência; e o grupo do butirato, constituído por dois animais sujeitos a terapia com butirato, três semanas após a última inoculação das células tumorais. Estes animais foram injetados com o butirato diariamente na primeira semana e de dois em dois dias na segunda semana, durante os 14 dias de terapia.

Na Figura 37, é possível observar a variação da massa corporal dos 4 animais após a cirurgia e a terapia. Como se pode observar na figura, após cirurgia a massa corporal dos animais baixa ligeiramente. Cerca de três semanas após cirurgia, os animais foram sujeitos às inoculações com as células tumorais.



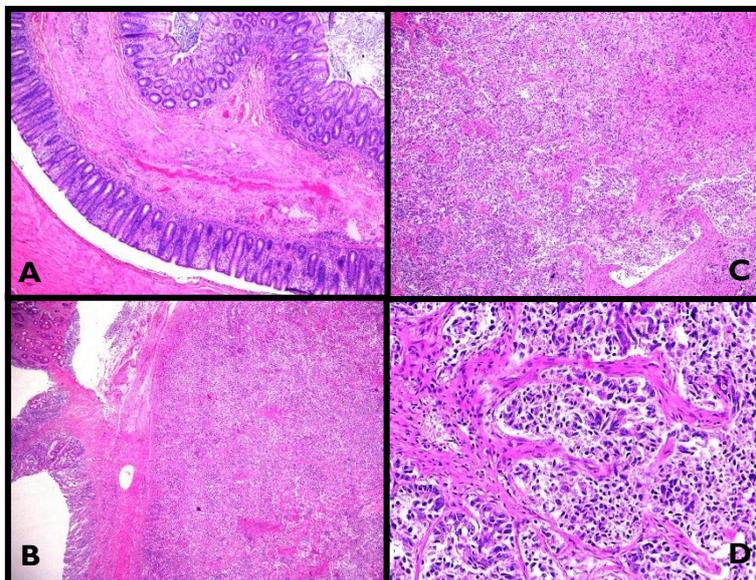
**Figura 37.** Variação de massa dos 4 animais em estudo. O gráfico representa a variação da massa corporal dos dois animais em condição de controlo e dois animais sujeitos a terapia com butirato. Ao 57º dia após cirurgia, dois animais foram sujeitos a terapia com butirato durante duas semanas. Todos os animais foram sujeitos às mesmas condições de cirurgia e inoculação com o mesmo número de células tumorais.

Após três semanas da última inoculação com as células tumorais dois animais foram sujeitos à terapia com butirato como foi dito anteriormente. Repara-se que o animal controlo 1 foi sujeito a um maior tempo de experiência. Isto deveu-se ao facto do animal após cirurgia necessitar de um maior tempo de recuperação. Repara-se também que o controlo 2 não cumpriu o tempo destinado para o fim da experiência. Este animal desenvolveu tumor e ao 40º dia após cirurgia, como foi atingido um dos *endpoints* estipulados para a experiência, o animal teve de ser occisado. Durante as duas semanas da terapia com butirato, os dois animais em estudo sofreram um ligeiro decréscimo da sua massa corporal, no entanto não se verificaram alterações na sua condição fisiopatológica.

De acordo com a Figura 38, no primeiro animal tratado com butirato (A), observa-se mucosa cólica sem alterações, observando-se também infiltrado inflamatório de tipo misto, com predomínio linfoplasmocitário. Não se visualizou neoplasia. No entanto, no animal controlo, ao observar a Figura 38 (B, C e D) verificou-se uma neoplasia epitelial maligna intraparietal, por vezes rodeada por faixa fibroinflamatória, de crescimento expansivo, constituída morfológicamente por elementos glandulares e maciços de células de citoplasma eosinófilo, com pleomorfismo nuclear moderado, de núcleos irregulares, ora

hipercromáticos, ora de cromatina aberta e nucléolo evidente. Há apoptose, necrose, bem como atividade mitótica, por vezes atípica.

Pode-se concluir que desenvolveu uma neoplasia epitelial maligna em cecostomia, enquadrável em adenocarcinoma colorretal de alto grau (pouco diferenciado), do tipo G3.

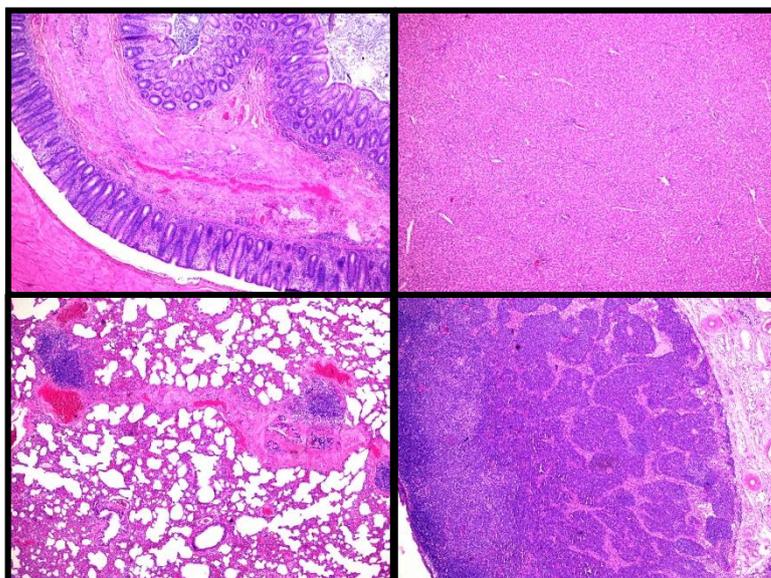


**Figura 38.** Imagens de cortes histológicos de uma zona do cego de um animal controlo e de um animal sujeito a terapia com butirato. A imagem representa uma fotografia de: (A) um corte histológico de uma zona do cego de um animal sujeito a butirato com uma ampliação de 40 vezes, (B,C e D) um tumor de um dos animais controlo com uma ampliação de 20, 40 e 200 vezes, respetivamente.

No primeiro animal tratado com butirato, como foi referido, não se visualizou neoplasia como se pode verificar pela análise da Figura 39. No fígado observa-se parênquima com discreta congestão sinusoidal, sem alterações valorizáveis. No pulmão observou-se um parênquima marcadamente congestivo, com septos alveolares ligeiramente espessados e aparente reforço do tecido linfoide associado aos brônquios (BALT). O tecido excisado da região intestinal correspondia a cinco gânglios linfáticos com alterações reativas e congestão vascular.

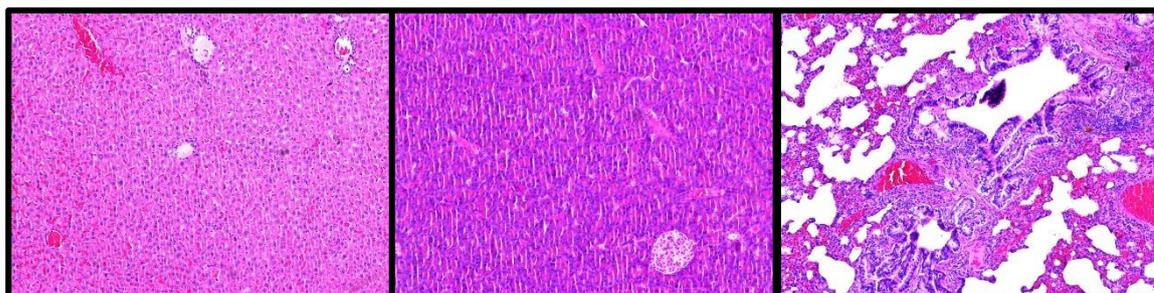
No segundo animal tratado com butirato, foi possível verificar no fígado parênquima com distensão sinusoidal ligeira a moderada e difusa, com congestão vascular, bem como discreto infiltrado inflamatório portal. No pâncreas observam-se vários lobos distribuídos num padrão mesentérico, com ácinos pancreáticos, sem alterações valorizáveis, observando-se ainda no seio destes ilhéus de Langerhans, sem alterações.

No pulmão observou-se parênquima marcadamente congestivo, com septos alveolares ligeiramente espessados. Observou-se também num vaso de calibre médio um trombo organizado e aparente reforço do tecido linfoide associado aos brônquios (BALT).



**Figura 39.** Imagens de cortes histológicos das zonas de análise do estudo do 1º animal sujeito a terapia com butirato. A imagem representa 4 cortes com ampliação 40 vezes realizados no cólon (esquerda superior), fígado (direita superior), pulmão (esquerda inferior) e gânglio (direita inferior).

Neste animal, foi ainda possível observar, na vertente cutânea da cecostomia aspetos reativos a nível do epitélio cutâneo, com áreas erosionadas, bem como úlceras recobertas por tecido necroinflamatório. Na vertente cólica da cecostomia observou-se atrofia, assim como marcada fibrose no tecido conjuntivo sub-epitelial. A restante mucosa cólica não mostrou alterações. Verificou-se também a existência de um infiltrado inflamatório de tipo misto, com predomínio linfoplasmocitário. No entanto, não se visualizou neoplasia como se pode verificar na Figura 40.



**Figura 40.** Imagens de cortes histológicos das zonas de análise do estudo do 2º animal sujeito a terapia com butirato. A imagem representa 3 cortes realizados com ampliação de 100 vezes no fígado (esquerda), pâncreas (no centro), pulmão (direita).

No 2º animal controlo, na generalidade dos órgãos, observaram-se aspetos inespecíficos, muitos dos quais reativos, no entanto, não se verificou doença neoplásica.



## 4. DISCUSSÃO



As opções de quimioterapia do CCR incluem fluoropirimidinas (ex. 5-fluorouracilo, 5-FU), a oxaliplatina e o irinotecano. Como foi dito anteriormente os potenciais benefícios do irinotecano (controlo de sintomas, manutenção e melhoria da qualidade de vida e o aumento da sobrevivência) têm de ser pesados com os potenciais riscos do tratamento relacionados com a mortalidade e a morbilidade, nomeadamente a neutropenia, as náuseas, os vómitos, a diarreia e a astenia (Oostendorp *et al.*, 2010). Foi descrito que, pelo menos, 36% dos doentes tratados com irinotecano sofrem de efeitos adversos com toxicidades graves, potencialmente fatais (Marsh and Hoskins, 2011).

As desacetilases das histonas (HDAC) têm sido intensamente estudadas ao longo dos últimos anos, por duas razões principais. Primeiro, estas enzimas foram relacionadas com a patogénese do cancro, assim como com outras doenças; em segundo lugar, porque os inibidores das HDAC (HDACi) têm a capacidade de interferir com a atividade das HDAC e, por conseguinte, alcançar efeitos biológicos significativos em modelos pré-clínicos de cancro (Minucci and Pelicci, 2006). No entanto a atividade dos HDACi como agentes únicos, isto é, em regime de monoterapia, é limitada, sendo que estes compostos foram combinados com outras terapias no cancro. Devido aos resultados promissores encontrados em estudos pré-clínicos utilizando os HDACi em combinação com outros agentes anti-cancerígenos, muitos ensaios clínicos em tumores sólidos e em leucemias foram realizados. A maior parte destes estudos têm demonstrado resultados promissores. Muitos efeitos sinérgicos ou aditivos dos HDACi quando combinados com outros fármacos foram também observados (Stiborová *et al.*, 2012).

O butirato é intensamente descrito como tendo a capacidade de inibir as HDAC. Alguns ensaios clínicos, em que foram usados derivados do butirato demonstraram resultados promissores (Minucci and Pelicci, 2006). No entanto, um desses derivados, o composto AN-9 usado para o tratamento do cancro do pulmão, de melanoma e de leucemias demonstrou que, em monoterapia, era bem tolerado. Para além disso, cerca de 10% dos casos demonstraram resposta ao tratamento, no entanto, quando combinado com o docetaxel, este demonstrou uma toxicidade severa, razão pela qual o estudo foi interrompido (Minucci and Pelicci, 2006).

Um outro estudo demonstrou a redução da toxicidade *in vivo* do irinotecano com o aumento de bactérias benéficas para a mucosa do cólon. As fibras alimentares têm sido demonstradas como capazes de promover a saúde intestinal através de produtos de fermentação bacteriana de ácidos gordos de cadeia curta, especialmente o butirato. A

maioria do butirato formado é consumida pelas células das mucosas, promovendo a proliferação e o crescimento de colonócitos normais, a melhoria da função da barreira epitelial e a supressão da inflamação e do stresse oxidativo. Assim, o efeito protetor do butirato neutraliza lesões causadas pelo SN-38 (composto resultante da metabolização do irinotecano), atenuando a sua toxicidade sem causar efeitos colaterais pronunciados (Lin *et al.*, 2014).

Assim, como referido anteriormente, este estudo teve como principal objetivo a avaliação do potencial terapêutico da combinação do butirato com o irinotecano.

Inicialmente, o objetivo consistiu na avaliação da citotoxicidade do butirato em três linhas celulares de cancro colorretal e em duas linhas celulares normais. Para avaliar a resposta das linhas celulares ao butirato utilizou-se um ensaio que nos permite inferir acerca da atividade metabólica celular, o ensaio de MTT. O butirato demonstrou ter um efeito anti-proliferativo nas linhas tumorais, C2BBe1, LS1034 e WiDr, sendo que esse efeito demonstrou ser dependente da concentração e do tempo de exposição ao composto. Já nas linhas celulares normais CCD-841 CoN e HFF1, o butirato não demonstrou ter efeitos citotóxicos, não tendo sido possível calcular os respetivos valores de IC<sub>50</sub>.

A linha tumoral C2BBe1 demonstrou ser a linha mais resistente ao efeito do butirato, com um IC<sub>50</sub> de 14,36 mM às 48 horas, e para os tempos mais longos, como as 96 horas, um IC<sub>50</sub> de 4,17 mM. Esta linha celular, como referido anteriormente não expressa P53. Esta proteína desempenha um papel fulcral no controlo do ciclo celular, na indução da apoptose e no reparo do ADN. Tendo a capacidade de regular o ciclo celular, a P53 é responsável pelo bloqueio do mesmo quando existe um dano no ADN permitindo, dessa forma, a sua reparação ou, promovendo a apoptose caso a reparação não seja possível (Vermeulen *et al.*, 2003). O dano induzido pelo butirato poderá ser provocado a nível do ADN, no entanto este é tolerado pela célula tumoral que, sem P53, prossegue no ciclo celular e na replicação do ADN, podendo assim explicar o facto de esta linha ser mais resistente ao efeito do butirato.

Por outro lado, a linha tumoral LS1034, a linha quimiorresistente, demonstrou ser a linha mais sensível ao efeito do butirato para os tempos de incubação mais longos, em que foi possível obter um IC<sub>50</sub> de 1,34 mM às 96 horas de incubação. Este resultado pode levantar a questão de o butirato ser capaz de afetar a quimiorresistência da célula. Por outro lado, o mecanismo pelo qual o butirato é capaz de inibir a proliferação celular da linha

LSI034 pode ser explicado pelo facto de a célula poder ser mais sensível ao efeito inibitório das HDAC (Ferragut and Saceda, 2002; Schüler *et al.*, 2010).

A linha tumoral WiDr revelou ser a linha mais sensível ao butirato para os tempos de incubação mais curtos, sendo possível obter um  $IC_{50}$  de 2,84 mM às 48 horas de incubação com butirato. Esta linha celular possui o gene *TP53* mutado, no entanto foi descrito pela ATCC, que a sua mutação é o suficiente para que a proteína P21 não seja regulada pela proteína P53 após dano provocado no ADN. A ATCC também demonstra que o gene *TP53* está mutado e atua como um oncogene nesta linha celular. No entanto, esta linha celular demonstra-se ser mais sensível para tempos de incubação curtos. Uma vez que a proteína mutada P53 não é capaz de regular a P21, então outro mecanismo poderá estar a ser responsável pela inibição da proliferação celular. No entanto, um estudo com o butirato demonstrou que este era capaz de induzir a paragem do ciclo celular promovendo a expressão da proteína P21, por via independente da regulação pela P53 (Mahyar-Roemer and Roemer, 2001).

Quando as linhas normais HFF1 e CCD-841 CoN são submetidas à incubação com butirato durante 48 e 72 horas, o seu comportamento é díspar em comparação com as três linhas tumorais, na medida em que não foi possível obter os respetivos  $IC_{50}$ . Assim, estes resultados corroboram os resultados obtidos por Donohoe e colaboradores, nos quais o autor verificou que a ausência de efeitos citotóxicos em células normais assim como a presença de efeitos citotóxicos em células tumorais pode ser explicado pela acumulação de butirato na célula. De facto, na célula tumoral existe uma maior acumulação de butirato do que na célula normal, provavelmente pela preferência da glicólise para a obtenção de energia pela célula tumoral. Por outro lado o aumento da concentração de butirato nas células tumorais também aumenta o seu efeito inibitório sobre as HDAC (Donohoe *et al.*, 2012).

Uma vez que o estudo de proliferação por MTT avalia a atividade metabólica das células, foi necessário corroborar os resultados obtidos por uma técnica que nos permita avaliar a viabilidade celular. Assim, o estudo de viabilidade celular por citometria de fluxo com dupla marcação com AnV/IP permitiu obter mais informação relativamente aos tipos de morte induzidos pelo butirato. De notar que o ensaio de proliferação por MTT foi importante para a determinação dos valores de  $IC_{50}$ , a partir dos quais se delinearão os desenhos experimentais a utilizar nos ensaios realizados posteriormente. Assim, com esse propósito, três concentrações foram escolhidas para estudar a viabilidade celular, a concentração de 2 mM, de 5 mM e de 20 mM com um tempo de exposição ao butirato de

48 horas. Estas concentrações escolhidas tiveram como propósito avaliar o efeito do butirato em concentrações de valores mais baixos, próximos (na maioria das linhas tumorais) e superiores aos valores de  $IC_{50}$ .

Os resultados demonstraram que com o aumento da concentração de butirato, a viabilidade celular diminui nas três linhas celulares. Foi possível verificar que com baixas concentrações de butirato (2 e 5 mM) a linha celular que demonstrou uma menor população de células viáveis após o tratamento foi a linha WiDr e a que apresentou uma maior população de células viáveis foi a linha celular C2BBe1. Estes resultados corroboram os valores obtidos no ensaio de proliferação com MTT, em que os valores mais altos de  $IC_{50}$  para as 48 horas, recorde-se, foram obtidos para a linha celular C2BBe1 e os valores mais baixos foram obtidos na linha WiDr.

Em relação aos tipos de morte provocados pelo butirato foi possível verificar que a incubação com concentrações baixas de butirato, de 2 e de 5 mM, induz um aumento da população celular em apoptose inicial em todas as linhas tumorais, sendo que, na linha LS1034 trata-se, de facto, o tipo de morte mais proeminente. No entanto, também é possível verificar que, com concentrações baixas de butirato, há um aumento da população celular em necrose, sendo que na linha tumoral C2BBe1, é o tipo de morte predominante. Quando as células são incubadas com concentrações elevadas de butirato, de 20 mM, é possível verificar que o tipo de morte proeminente nas três linhas celulares C2BBe1, LS1034 e WiDr é a necrose.

A diferença qualitativa entre os dois processos, apoptose e necrose, não indica que os dois tipos de morte celular sejam, necessariamente desencadeados por estímulos diferentes. Isto é, o mesmo estímulo de morte pode desencadear apoptose ou necrose como consequência do grau de alteração celular induzida. O facto de a célula morrer por necrose ou por apoptose depende muito da gravidade da lesão. A apoptose normalmente não induz inflamação, sendo um tipo de morte adequado para um papel na renovação celular normal durante a embriogénese e em tecidos adultos. A necrose, por outro lado, é um tipo de morte celular patológica ou accidental, em que a célula aumenta de volume e provoca danos nos organelos, em particular nas mitocôndrias, impedindo o equilíbrio interno e levando à lise celular (Fadeel and Orrenius, 2005). O facto do tratamento das linhas celulares, com concentrações mais baixas de butirato, induzir a apoptose, poderá demonstrar a capacidade de, com baixas concentrações, o butirato regular os mecanismos de apoptose. Enquanto, em concentrações mais elevadas, o estímulo é de tal ordem, que o

butirato torna-se demasiado agressivo para as células tumorais, originando o processo necrótico.

Como foi dito, quando presente em baixas concentrações, o butirato induz um aumento da apoptose em todas as linhas celulares. No entanto, a proteína P53 está mutada ou ausente nas três linhas celulares, isto é, a linha tumoral C2BBel não possui expressão desta proteína e, no caso da linha WiDr a mutação na P53 não permite que, em caso de dano no ADN, esta interaja com a proteína P21, não sendo capaz de induzir a paragem do ciclo celular para a reparação do ADN ou, caso o dano não seja possível de ser reparado, levar a célula à apoptose. A linha celular LS1034, por outro lado, possui uma mutação no gene que codifica a proteína P53, sendo esta mutação descrita pela ATCC como *lhe* conferindo propriedades oncogénicas. No entanto, foi demonstrado pela ATCC, que apesar da sua mutação, esta é capaz de regular fracamente a proteína P21, quando são induzidos danos no ADN. Assim, é possível haver o reparo do ADN ou, caso o dano seja irreparável, induzir a apoptose. O processo apoptóticos, como já foi referido, não tem de ser necessariamente regulado pela P53, podendo ser regulado pela via extrínseca ou mesmo pela via intrínseca (ou via mitocondrial) sem que exista intervenção da proteína P53. Por exemplo, foi demonstrado por Janson e colaboradores, que o butirato era capaz de induzir a apoptose por uma via independente do estado da P53 (Janson *et al.*, 1997). Por outro lado, a família BCL-2 é uma família de proteínas repressoras de morte celular por apoptose que participam ativamente na regulação da apoptose.

Por sua vez, a BAX, a BID e a BAK são proteínas pró-apoptóticas. A regulação da transcrição da BCL-2 resulta da P53, porém o recrutamento da BAX para a mitocôndria não necessita da intervenção da P53 (Degenhardt *et al.*, 2002). A homeostasia é mantida pelo balanço entre proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas. Por exemplo, estímulos, como dano do ADN, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas e esse desequilíbrio induz a apoptose. Entre as proteínas mais estudadas, desta família, estão a BAX (pró-apoptótica) e a BCL-2 (anti-apoptótica) a qual é sobreexpressa em adenomas e em carcinomas colorretais (Shanmugam *et al.*, 2008). Assim, avaliou-se a razão BAX/BCL-2 nas três linhas tumorais, uma vez que foi possível observar, através dos ensaios de viabilidade, que as concentrações mais baixas de butirato induziam a apoptose. Assim, o aumento da razão BAX/BCL-2 significará uma maior ativação da apoptose por via mitocondrial.

Foi possível verificar a partir dos resultados que, em todas as linhas celulares, após o tratamento com 2 mM, 5 mM e 20 mM de butirato houve um aumento da razão BAX/BCL-2

indicando que o processo apoptótico pela via intrínseca estaria a ser ativado pelo butirato. A linha celular LSI034 apresentou uma maior razão de BAX/BCI-2 quando sujeita a 20 mM de butirato (no entanto, sem significância estatística relativamente ao controlo). Este resultado corrobora os resultados obtidos na dupla marcação com AnV/IP, em que foi possível denotar uma maior população celular em apoptose em relação às outras linhas tumorais. No entanto, este aumento da razão BAX/BCI-2 não mostrou ser dependente da concentração de butirato. De uma forma geral, estes resultados corroboram os níveis de apoptose obtidos nos ensaios de viabilidade celular, nos quais se verificou um aumento da população celular em apoptose relativamente ao controlo em todas as linhas celulares. Estes resultados são também corroborados por Zhang e colaboradores, que demonstraram que em células tumorais do cólon o butirato induzia a apoptose por via das caspase-9 e caspase 3 e que a ativação da via MAPK JNK desempenha um papel importante na apoptose induzida pelo butirato. Além disso, durante o processo apoptótico, a ativação de JNK promove a translocação de BAX para a mitocôndria (Zhang *et al.*, 2010).

Uma mutação no gene *TP53*, seja pontual ou não, altera de forma significativa a proteína P53, o que resulta na incapacidade desta efetuar a paragem do ciclo celular ou induzir o mecanismo de apoptose. As proteínas P53 mutadas (P53mt) apresentam geralmente uma fosforilação significativa e acetilação em locais que são bem conhecidos por estabilizar a P53 normal, facilitando assim a acumulação da P53 disfuncional no núcleo, onde, o gene *TP53* pode atuar como um oncogene. Embora as proteínas P53mt sejam muitas vezes descritas como sendo inativas no processo de transcrição, algumas proteínas P53mt são incapazes de ativar a transcrição de genes sujeitos à transcrição da P53 normal. No entanto, podem potenciar a ativação da transcrição de genes associados com o crescimento ou com a atividade da promoção da sobrevivência (Sigal and Rotter, 2000). Algumas proteínas P53mt são capazes de se ligar aos promotores de alguns genes alvo da P53 normal como a proteína P21 e a MDM2 mas não são capazes de se ligar aos promotores de genes pró-apoptóticos como a BAX (Pan & Haines, 2000). Consequentemente, esta classe de P53mt pode induzir a paragem do ciclo celular de forma tão eficaz como a P53 normal mas, no entanto, não são capazes de induzir a apoptose (Bai and Zhu, 2006).

Uma vez que as linhas em estudo possuem P53mt e, de facto, a sua mutação está descrita como conferindo propriedades de um oncogene, torna-se necessário estudar o efeito do butirato na sua expressão. No entanto, foi demonstrado a capacidade do butirato regular a expressão da proteína P21, esta responsável pela paragem do ciclo celular na fase

GI, por via independente da P53 (Mahyar-Roemer and Roemer, 2001). Assim, foi objetivo deste trabalho avaliar o efeito do butirato sobre a expressão da proteína P53 apenas nas linhas tumorais LS1034 e WiDr, uma vez que a linha C2BBel, recorde-se, não expressa a proteína P53.

Foi possível verificar que, nas linhas LS1034 e WiDr, o butirato induziu a diminuição da expressão da proteína P53. Não se observou uma diminuição da expressão desta proteína dependente do aumento da concentração de butirato. No entanto, foi possível visualizar, que a linha mais sensível a alterações causadas pelo butirato a nível da expressão da P53 foi a linha tumoral quimiorresistente LS1034. Por outro lado, também temos de notar que a proteína P53 normalmente está ligada a MDM2 inativa e transportada do núcleo celular para o citoplasma, onde é degradada. Mas, após o estímulo inicial, a proteína P53 é fosforilada e quebra a sua ligação com o MDM2, podendo assim ligar-se ao ADN da célula e, conseqüentemente, induzir a paragem do ciclo celular ou a apoptose. Assim, tem interesse, futuramente estudar o efeito da proteína P53 fosforilada, permitindo não só o estudo da sua expressão mas também da sua função.

Ao associarmos os resultados da expressão de P53 e a razão BAX/BCL-2 podemos concluir que o butirato estará de facto, a induzir o aumento da razão BAX/BCL-2 independentemente do estado da P53, uma vez que o aumento da expressão da P53 está associado a uma diminuição da expressão de BCL-2 (Basu and Haldar, 1998). O mesmo se verifica em caso inverso, isto é, a diminuição ou a ausência da expressão de P53 aumenta a expressão de BCL-2. Uma vez que a linha C2BBel não possui expressão de P53, esta não é capaz de regular os níveis de BCL-2 e, uma vez que foi verificado o aumento da razão BAX/BCL-2 nesta linha celular, então provavelmente haverá um aumento da expressão de BAX com o tratamento com butirato independentemente da expressão de P53. Os resultados obtidos demonstram a diminuição da P53 após tratamento com butirato, podendo este estar a induzir o recrutamento de BAX para a mitocôndria por via independente da P53.

Outra característica comum à maioria das células tumorais de cancro do cólon é a mutação no complexo APC. Quando qualquer proteína do complexo APC está mutada, como a proteína APC, a  $\beta$ -catenina poderá não ser degradada. Instantaneamente, a  $\beta$ -catenina é translocada para o núcleo onde vai interagir com a Tcf4 e ativa a transcrição de vários genes alvo (Sancho *et al.*, 2004) que promovem o crescimento e a sobrevivência da célula tumoral. Duas das linhas tumorais em estudo, a C2BBel e a LS1034 estão descritas

pela ATCC como possuindo uma mutação homozigótica no gene que codifica a proteína APC. De notar, que a ATCC denomina o gene *APC* como sendo um oncogene na linha LS1034, isto é, esta mutação permite à célula tumoral a sua sobrevivência e a sua proliferação. A linha WiDr é descrita também por possuir a proteína APC mutada (Heinen *et al.*, 1995).

Por outro lado, Cagatay e colaboradores demonstraram que mutações no gene *TP53* levam a uma acumulação aberrante da proteína  $\beta$ -catenina nas células tumorais (Cagatay and Ozturk, 2002). Uma vez que as três linhas tumorais em estudo não expressam ou possuem a proteína P53 mutada e possuem mutações no gene *APC*, então avaliou-se também o efeito do butirato sobre a expressão e a localização da proteína  $\beta$ -catenina.

Os resultados obtidos mostraram que concentrações de butirato correspondentes aos respetivos valores de  $IC_{50}$ , em cada uma das linhas, induzem um decréscimo da presença de  $\beta$ -catenina nas células. No entanto, para que haja a transcrição de genes-alvo por parte da  $\beta$ -catenina, esta tem de estar presente no núcleo da célula e interagir com a Tcf4. Pelas imagens obtidas no processo de imunofluorescência é possível, a partir da sobreposição das marcações com bis-benzimine (marcação ao ADN) e com um anticorpo fluorescente para a  $\beta$ -catenina, detetar a zona nuclear com  $\beta$ -catenina, no entanto, não podemos afirmar que a  $\beta$ -catenina está ou não, menos ou mais marcada na zona nuclear, uma vez que este tipo de microscopia nos dá uma imagem que representa a sobreposição de vários planos. No entanto, é possível afirmar que na totalidade das células, há um decréscimo da marcação com  $\beta$ -catenina total, o que nos poderá indicar que existe uma menor disponibilidade da  $\beta$ -catenina no núcleo e uma possível menor interação com Tcf4 e, conseqüentemente, uma diminuição da sobrevivência e da proliferação celular por esta via de sinalização. Futuramente, um estudo que permita avaliar não só a presença de  $\beta$ -catenina mas também a sua localização será necessário, recorrendo por exemplo à microscopia confocal, de forma a sustentar os resultados obtidos.

É possível verificar que a linha LS1034 foi a linha em que o decréscimo da  $\beta$ -catenina foi mais notório e significativo. Isto poderá dever-se ao facto do butirato induzir um maior decréscimo da proteína P53mt e, conseqüentemente, uma provável interação com a presença de  $\beta$ -catenina na célula. Foi possível verificar também um decréscimo significativo na linha tumoral WiDr, o que, como foi dito, poderá também ser provocado pelo decréscimo de P53mt. A linha C2BBel foi a linha celular que demonstrou um menor

decréscimo na presença de  $\beta$ -catenina na célula, no entanto sem significância estatística. Como esta linha celular não possui expressão de P53, poderá indicar que o butirato também tem a capacidade de regular a expressão de  $\beta$ -catenina de forma independente do estado da proteína P53.

No caso da linha LSI034, com as mutações nos genes *TP53* e *APC*, estes são descritos como oncogenes, garantindo a sobrevivência, o crescimento e a proliferação celular (ATCC, 2014). Na presença de butirato, a expressão destas duas proteínas decresce acentuadamente. A dependência destes dois fatores para o crescimento e para a proliferação celular da linha celular LSI034 poderá ser a justificação para o facto desta ser a linha celular mais sensível ao efeito do butirato após longos tempos de incubação.

Deste modo, o butirato demonstrou ter vários efeitos que podem contribuir para a inibição da proliferação celular e da redução da viabilidade celular. Foi possível, de facto, constatar um efeito citotóxico nas três linhas tumorais em estudo, dependendo da sua localização de origem no cólon, ao contrário do que verificado com o mesmo tratamento nas linhas normais CCD-84I CoN e HFFI, nas quais se verificou ausência de citotoxicidade. A linha quimiorresistente LSI034 revelou ser a linha mais sensível após longos tempos de exposição ao butirato e aos seus efeitos na expressão de P53, de  $\beta$ -catenina e na razão BAX/BCL-2, é de facto importante tendo em conta que esta linha celular tem origem no cego, uma das zonas em que se verifica elevada incidência do cancro do cólon. Assim, teve todo o interesse a combinação deste efeito induzido pelo butirato com o irinotecano, um agente quimioterapêutico usado no tratamento do cancro do cólon.

Assim, uma vez que um dos principais objetivos do trabalho é avaliar o potencial da combinação do butirato com o irinotecano, foi necessário estudar o seu efeito isolado na proliferação das três linhas celulares tumorais, como termo de comparação.

A linha C2BBel demonstrou ser a linha mais resistente com tempos mais curtos de exposição ao irinotecano, às 48 horas, com o valor de  $IC_{50}$  de 54,63  $\mu$ M, enquanto para as linhas LSI034 e WiDr se obtiveram valores de  $IC_{50}$  de 39,19  $\mu$ M e de 25,46  $\mu$ M, respetivamente. Para os tempos mais longos de exposição ao irinotecano, a linha C2BBel revelou também ser a linha mais resistente às 96 horas com o valor de  $IC_{50}$  de 11,83  $\mu$ M às 96 horas, sendo que para as restantes linhas celulares LSI034 e WiDr foi possível obter valores de  $IC_{50}$  de 3,09  $\mu$ M e 5,59  $\mu$ M, respetivamente. Esta resistência por parte da linha C2BBel ao irinotecano pode dever-se ao facto de, mais uma vez, a linha celular não expressar P53. O irinotecano é um inibidor das topoisomerasas I, o que provoca a inibição

da replicação do ADN e, por conseguinte, induz dano no ADN. No entanto, uma vez que as células da linha C2BBel não expressam P53, não há o reconhecimento do dano por parte desta proteína pelo que não há paragem do ciclo celular para a reparação do ADN. Existem resistências associadas ao dano do irinotecano mediadas pela degradação proteossomal das topoisomerasas I inibidas (Xu, 2002) havendo, assim, a progressão do ciclo celular da célula tumoral.

Uma vez obtidos os valores de  $IC_{50}$  após o tratamento com irinotecano nas três linhas tumorais foi possível obter resultados com a combinação dos dois compostos e avaliar a sua possível sinergia.

O desenho experimental para estudar a combinação dos dois compostos em simultâneo consistiu na incubação das células com  $\frac{1}{4}$  ou com  $\frac{1}{2}$  da concentração de butirato correspondente ao valor de  $IC_{50}$  obtido em monoterapia, com concentrações crescentes de irinotecano, durante 48, 72 e 96 horas.

De uma forma geral, os valores de  $IC_{50}$  do irinotecano obtidos quando em combinação com o butirato, foram inferiores aos valores de  $IC_{50}$  do mesmo quando testado em monoterapia.

Quando o irinotecano é combinado com menores concentrações de butirato ( $\frac{1}{4}$  do  $IC_{50}$ ) na linha C2BBel os valores de  $IC_{50}$  de irinotecano obtidos decrescem acentuadamente em relação aos valores obtidos apenas com o irinotecano em monoterapia. Foi possível obter índices de combinação com esta associação menores que 1, ou seja sinergia, às 48 horas e às 96 horas. Quando o irinotecano é combinado com maiores concentrações de butirato ( $\frac{1}{2}$  do  $IC_{50}$ ) os valores de  $IC_{50}$  de irinotecano obtidos decrescem acentuadamente com os tempos mais curtos, sendo possível obter sinergia da combinação às 48 e às 72 horas. Recorde-se que os valores de  $IC_{50}$  do irinotecano mais elevados foram obtidos para a linha C2BBel. Esta ocorrência, provavelmente devendo-se ao facto destas células não expressarem P53, induzindo uma maior resistência aos danos do ADN provocados pelo irinotecano. No entanto, foi possível verificar que em combinação com butirato, a resistência ao irinotecano diminui acentuadamente, sendo possível observar sinergia nos tempos mais curtos, tanto com as concentrações maiores de butirato como com as menores. O butirato é um inibidor das HDACs, enzimas que permitem que as histonas ganhem força, condensando o ADN. As histonas são proteínas que estão ligadas ao ADN, o qual, por sua vez, se estiver muito associado às histonas, não poderá ser transcrito. Assim, o butirato, ao inibir as HDAC, induz um maior relaxamento da cromatina e, conseqüentemente, do ADN

pelo que poderá estar a fornecer um maior “acesso” do irinotecano ao ADN. Assim, o estímulo provocado à célula pela combinação dos dois compostos poderá inibir a progressão da proliferação celular. Estudos realizados anteriormente corroboram esta hipótese, na medida em que demonstraram a sinergia entre os HDACi e os inibidores das topoisomerasas I e II (Stiborová *et al.*, 2012).

A linha celular LSI034 foi a mais sensível ao efeito do irinotecano combinado com menores ou maiores concentrações de butirato ( $1/4$  ou  $1/2$  do  $IC_{50}$ ) para todos os tempos estudados. Com os tempos de incubação mais curtos, às 48 horas, as células LSI034 mostraram ser as mais sensíveis, na medida em que se obteve o  $IC_{50}$  mais baixo (9,13  $\mu$ M). Com o mesmo tempo de incubação, quando o irinotecano é combinado com concentrações de butirato mais elevadas ( $1/2$  do  $IC_{50}$ ), os valores de  $IC_{50}$  do irinotecano decrescem acentuadamente, apresentando um  $IC_{50}$  de 4 nM. Com os tempos mais longos de exposição ao irinotecano combinado com concentrações menores de butirato ( $1/4$  do  $IC_{50}$ ), o valor de  $IC_{50}$  às 96 horas foi de 1,15  $\mu$ M. Quando as células são sujeitas ao tratamento com irinotecano combinado com maiores concentrações de butirato ( $1/2$  do  $IC_{50}$ ), os valores de  $IC_{50}$  do irinotecano decrescem acentuadamente, apresentando um  $IC_{50}$  de 90 nM e verificou-se sinergia em todas as combinações estudadas. Estes resultados demonstraram ser bastante promissores uma vez que a linha LSI034 é quimiorresistente e expressa a gpP, responsável pela extrusão de fármacos como o irinotecano. Assim, uma vez que esta linha celular demonstrou ter baixos  $IC_{50}$  de irinotecano com a combinação com butirato, este último poderá estar a ser responsável pela inibição da sua quimiorresistência.

A linha WiDr demonstrou ser a linha mais resistente ao efeito da combinação nos tempos mais curtos, em que só foi possível observar sinergia a partir das 72 horas. Por outro lado, foi observado que esta foi a linha celular mais sensível ao butirato às 48 horas. No entanto quando o irinotecano é combinado com butirato ( $1/4$  e  $1/2$  do  $IC_{50}$ ) não se verifica efeito sinérgico às 48 horas. Isto poderá acontecer devido às concentrações de butirato usadas serem demasiado baixas, não sendo suficientes para potenciar o efeito do irinotecano.

Em suma, foi verificada a existência de sinergia entre os compostos em todas as linhas celulares. Para corroborar e dar uma maior sustentabilidade aos resultados de citotoxicidade foi necessário estudar a viabilidade e os tipos de morte celular induzida pela combinação dos dois compostos. Assim, após análise dos resultados obtidos a nível da proliferação celular, foram escolhidas as combinações nas quais se verificou a existência de sinergia. Isto é, para

as linhas C2BBeI e LS1034 escolheram-se os valores de  $IC_{50}$  do irinotecano obtidos às 48 horas em combinação com  $\frac{1}{2}$  do  $IC_{50}$  do butirato, e para a linha WiDr os valores de  $IC_{50}$  do irinotecano obtidos às 72 horas em combinação com  $\frac{1}{2}$  do  $IC_{50}$  do butirato.

Observou-se que a terapia combinada dos dois compostos foi responsável pela diminuição da viabilidade celular nas três linhas celulares em mais de 50%, apresentando uma diminuição estatisticamente significativa relativamente ao controlo em todas as linhas. Por outro lado, a terapia combinada também induz um aumento da percentagem de células C2BBeI e WiDr em necrose, resultados estes com significância estatística. No entanto, na linha C2BBeI foi possível observar que a maior parte desse efeito se deve ao butirato, apesar de com na terapia combinada ter sido possível observar um aumento de apoptose tardia e necrose em relação ao butirato.

Este aumento da necrose na linha celular C2BBeI poderá ser explicado pelo facto de estas células, não possuírem a proteína P53, pelo que não são capazes de detetar o dano do ADN e parar o ciclo celular para a sua reparação. Quando a linha celular C2BBeI é tratada com os dois compostos, o dano acumulado pode ser de tal ordem que este tratamento se torna demasiado agressivo para as células tumorais, originando o processo de morte celular por necrose. Isto poderá explicar também o facto das células da linha WiDr possuírem maior percentagem de células mortas por necrose, uma vez que a mutação da P53 que estas células têm não permite que esta regule a P21 após o dano no ADN (ATCC, 2014). As características destas linhas celulares poderão explicar o facto do aumento de necrose após os tratamentos. No entanto, quando tratadas com butirato podemos ver um aumento da apoptose que, tal como foi referido anteriormente, poderá ser devido ao facto do butirato induzir um aumento da razão BAX/BCL-2. Por outro lado, na linha celular LS1034 foi possível verificar que o tipo de morte proeminente com a terapia combinada é por apoptose, e este aumento foi significativo em relação ao tratamento com irinotecano. Isto poder-se-á dever ao facto de que a mutação do gene *TP53* não impede a regulação da P21, o que poderá levar à paragem do ciclo celular em G1 e, como o dano no ADN é demasiado para a possível reparação, a célula é guiada para o processo apoptótico. Por outro lado, foi nesta linha que se verificaram maiores diferenças na razão BAX/BCL-2, o que poderá justificar também o aumento de apoptose.

Como já foi referido, de um modo geral, é possível afirmar que existem duas classes de genes que, quando mutados, induzem o processo cancerígeno, levando à promoção do crescimento celular descontrolado. São eles, os proto-oncogenes, ou genes promotores de

crescimento, cuja atividade normal na célula está relacionada com o crescimento celular, e os genes supressores tumorais, cuja função é prevenir que as células se multipliquem descontroladamente. No entanto, a mutação num proto-oncogene, ou seja um oncogene, pode liderar um crescimento celular descontrolado, levando à formação do tumor (por exemplo, por uma mutação no gene que codifica a proteína  $\beta$ -catenina) (Koesters *et al.*, 1999). Os genes supressores tumorais previnem a multiplicação descontrolada das células, uma vez que participam na síntese de proteínas que bloqueiam a divisão celular, mantendo-as na fase G0 do ciclo celular. Quando os genes supressores tumorais sofrem mutações, permanecem incapazes de controlar a divisão celular o que, por consequência, leva a que o processo ocorra de uma forma descontrolada. Este é o caso da P53mt presente nas linhas celulares em estudo (Sherr, 1996).

Para avaliar a capacidade das linhas celulares em estudo regular o ciclo celular após o tratamento, foi necessário medir as alterações induzidas no mesmo após a incubação com as condições da terapia combinada. De certa forma, estes resultados complementaram os obtidos a nível da viabilidade celular, ajudando na compreensão de como as linhas celulares responderam ao tratamento induzido.

É possível ao constatar que na linha C2BBel existe um aumento da população celular na fase G0/G1 e um aumento do pico pré-G1 (pico apoptótico) quando as células são incubadas com a terapia combinada. O facto de haver um aumento do pico pré-G1 corrobora o aumento de apoptose verificado com a dupla marcação AnV/IP. Por outro lado, é possível verificar que existe um aumento da população na fase G0/G1 com o tratamento com butirato e com a terapia combinada. Este resultado sugere um atraso do ciclo celular na fase G0/G1, o qual estará associado a uma regulação do ciclo pela inibição dos complexos CDK-ciclina.

A P21 é responsável pela inibição dos complexos CDK2-ciclina E e CDK4/6-ciclina D na fase G1. No entanto, é de conhecimento que a P53 regula a P21, isto é, quando há dano no ADN, a P53 induz a expressão de P21 para a paragem do ciclo celular em G1. No entanto, estudos verificaram que o butirato é capaz de promover a expressão da proteína P21 de forma independente do estado da P53 (Crim *et al.*, 2008). Além disso, é possível verificar nos resultados da linha C2BBel que o irinotecano não altera a população celular em relação ao controlo, com exceção de um ligeiro aumento da população em pré-G1 (pico pré apoptótico). Estes dados certificam o facto de que, uma vez que a linha C2BBel não expressa P53, o dano no ADN não é identificado, induzindo a célula na progressão do ciclo

celular com os danos no ADN. Por outro lado, a população celular em G0/G1 é maior com a incubação com butirato e em terapia combinada em relação ao controlo, o que poderá indicar que o butirato induz um aumento da expressão da P21 com consequente paragem do ciclo celular em G0/G1. Futuramente, será necessário o estudo de outras condições de tratamento com irinotecano que poderão favorecer a combinação, pois poderá fornecer informações que ajudem a perceber melhor o que acontece a nível do ciclo celular.

Na linha LS1034 podemos verificar que a terapia combinada induz um aumento significativo da população em pré-G1, corroborando os resultados da viabilidade celular, em que o tipo de morte predominante é a apoptose. Por outro lado, podemos verificar que tanto o butirato como a terapia combinada induzem um ligeiro aumento da população celular em G0/G1, no entanto, esse aumento não se verifica quando as células são incubadas com irinotecano em monoterapia. Isto poderá sugerir que a P21 nesta linha celular é fracamente regulada pela P53. Recorde-se que a P53 desta linha é mutada e regula fracamente a proteína P21 após dano no ADN. No entanto, esperava-se um possível ligeiro aumento da população em G0/G1, mas, possivelmente a regulação da proteína P21 não é o suficiente para levar à paragem do ciclo. Por outro lado, é possível verificar que o butirato poderá estar a promover a expressão da proteína P21 e, assim, aumentar a população celular na fase G0/G1 com a incubação com butirato e com a terapia combinada. Assim, futuramente, será necessário avaliar a expressão de P21 e estudar o efeito do butirato e da terapia combinada na expressão desta proteína nas linhas celulares em estudo, de modo a fornecer maiores certezas sobre o possível mecanismo de atuação destas terapias sobre o ciclo celular.

Em último, é possível verificar uma diferença bastante acentuada entre a terapia combinada e a terapia com butirato na linha celular WiDr. Isto é, quando as células são incubadas com butirato, não há diferenças das populações em relação ao controlo. Mas quando as células são incubadas com irinotecano é possível observar um aumento notório da população em G2/M. O irinotecano é um fármaco que induz o seu dano na fase S do ciclo celular devido à inibição das topoisomerasas I. É ativado então o *checkpoint* em resposta ao dano no ADN que, envolvendo a ativação do complexo ATM (do inglês *ataxia telangiectasia mutated*), induz a paragem do ciclo celular em G2/M pelo dano no ADN detetado na fase S (Haug *et al.*, 2008; Xu, 2002). Quando a linha celular WiDr é sujeita à terapia combinada, é possível verificar um perfil semelhante à condição com o irinotecano, no entanto, associado também a um aumento da população celular em pré-G1 o que corrobora o aumento da

população celular em apoptose. A linha WiDr foi aquela onde foi mais notório o aumento da população em necrose após a incubação com a terapia combinada. Além disso, a concentração de irinotecano usada em combinação nas WiDr assim como o tempo de exposição do mesmo foi maior do que para as outras linhas celulares, isto é, foi usada uma concentração de 3,54  $\mu\text{M}$  com um tempo de exposição de 72 horas, enquanto nas C2BBel e LS1034 as concentrações de irinotecano foram de 1  $\mu\text{M}$  e 4 nM, respetivamente, com um tempo de exposição de 48 horas. Uma vez que a linha WiDr não é capaz de regular o ciclo celular em G0/G1 após o dano no ADN, é possível que na fase G2/M a célula não tenha condições para progredir e, devido ao dano causado pelo irinotecano na fase S do ciclo celular, acaba por conduzir a célula à necrose.

Ao observarmos os resultados do ciclo celular, podemos chegar a algumas conclusões acerca da regulação da P53 por parte do butirato e da sua influência no ciclo celular. Recorde-se que foi possível verificar que a incubação com butirato induzia a diminuição da expressão da proteína P53. Como foi referido, sabe-se que o aumento da expressão de P53 como reconhecimento do dano do ADN induz o aumento da expressão de P21 que, por sua vez, leva à paragem do ciclo celular na fase G1. Por outro lado, duas linhas celulares (LS1034 e WiDr) expressam a proteína P53mt e a linha C2BBel não possui expressão de P53. No entanto, é possível verificar o aumento da população em G0/G1 após a incubação com butirato ou com terapia combinada nas linhas LS1034 e C2BBel. Verificou-se também que a incubação com irinotecano nestas linhas não alterou a população em G0/G1 em relação ao controlo, indicando-nos que a expressão de P53mt ou a ausência da sua expressão induz o progresso do ciclo celular e que, por isso, quando em combinação, é o butirato que está a induzir o bloqueio na fase G0/G1.

Assim, é evidente o papel da proteína P53 ao longo deste estudo. Desta forma, tornou-se necessário estudar as possíveis alterações a nível da expressão da P53 após tratamento com butirato e com irinotecano, isoladamente e em combinação.

Verificou-se que quando as células são sujeitas ao butirato isoladamente, a expressão da P53 diminui nas duas linhas tumorais, sendo significativa para a linha WiDr. Quando tratadas com irinotecano, não se verificaram diferenças nas células LS1034, no entanto, nas células WiDr podemos observar um aumento de cerca de 27 % na expressão de P53 em relação ao controlo, mas sem significância estatística. Quando as células foram tratadas com a terapia combinada, existiu um decréscimo da expressão de P53 nas duas linhas tumorais, no entanto só foi significativo para a linha WiDr.

Os resultados da expressão de P53 obtidos após tratamento com irinotecano fornecem uma informação acerca do estado da P53mt e a sua capacidade de detetar o dano do ADN. É possível verificar que na linha LSI034, o irinotecano não induz alterações na P53, no entanto, existe uma diminuição da viabilidade celular com a concentração de irinotecano usada, indicando que a P53mt na linha LSI034 não é capaz de reconhecer o dano no ADN e, conseqüentemente, não consegue induzir a paragem do ciclo celular. Na linha WiDr, o irinotecano induz o aumento da proteína P53, podendo indicar que a proteína P53mt da linha celular WiDr é capaz de reconhecer o dano do ADN, mas como já foi referido, o facto de esta mutação não permitir regular a proteína P21, a paragem do ciclo celular não se realiza. Quando as linhas LSI034 e WiDr são tratadas com a terapia combinada, a expressão de P53mt diminui em relação ao controlo, facto que só demonstra significância estatística para a linha WiDr. Por outro lado é possível verificar que na linha LSI034, os valores da expressão da P53mt são semelhantes aos valores de expressão do tratamento só com butirato. Uma vez que as terapias induzem alterações na expressão da P53, pretende-se futuramente, realizar um estudo que permita avaliar o dano do ADN após o tratamento com butirato, com irinotecano e com a terapia combinada. Um estudo possível será a realização de um ensaio cometa. Este ensaio é um método sensível e rápido para a deteção de quebras na cadeia de ADN em células individuais (Fairbairn *et al.*, 1995).

Assim, é possível verificar que as diferentes mutações no gene que codifica a proteína P53 podem ter diferentes funções e não é claro o quanto efetivo é a modulação de apenas uma dessas funções. No entanto, a habilidade da P53mt em participar em vias de sinalização que promovem o crescimento e a sobrevivência da célula tumoral é verificada em alguns estudos (Muller and Vousden, 2013). O facto de esta terapia diminuir a expressão da P53mt nas linhas celulares, principalmente devido à presença de butirato, poderá de facto diminuir a interação da P53mt nessas vias de sinalização. No entanto, a P53mt estudada pode não estar na forma ativa, isto é, na sua forma fosforilada. Ou seja, a função de P53mt poderá não estar a ser diminuída com o tratamento. Assim, de futuro, para dar maior sustentabilidade aos resultados obtidos, pretende-se analisar o efeito da terapia combinada na expressão da proteína P53 na sua forma ativa, ou seja, na sua forma fosforilada.

Ao observarmos os resultados, podemos verificar que, independentemente da combinação usada, a linha quimiorresistente LSI034 apresentou sinergia para todas as condições, sendo que esses valores foram significativos para todos os tempos de incubação. Pôde-se verificar também um decréscimo notório dos valores de IC<sub>50</sub> do irinotecano em

combinação comparado com os valores de  $IC_{50}$  do irinotecano em monoterapia, realçando o facto de o butirato reverter de alguma forma a quimiorresistência associada a esta linha celular. Além disso, as células LSI034 demonstraram uma diminuição da viabilidade celular com aumento da apoptose quando tratadas com apenas 4 nM de irinotecano combinado com 3,4 mM de butirato. Estes resultados levantaram a hipótese de o butirato poder, de certa forma, afetar o mecanismo de resistência ao irinotecano da linha tumoral LSI034.

Sabendo de antemão que a quimiorresistência das células LSI034 está relacionada com a sua capacidade de extrusar fármacos através da gpP, foi imprescindível verificar se o butirato interferia com a extrusão do irinotecano por estas células. Para tal, foram efetuados estudos de captação com o  $^{99m}Tc$ -MIBI. Como já foi referido, este radiofármaco apresenta características comuns de vários substratos (como o irinotecano) de bombas de efluxo das MDR (entre estas a gpP) (Luo *et al.*, 2002). Assim, o  $^{99m}Tc$ -MIBI constituiu um possível método para medir a atividade funcional deste tipo de proteínas. Um aumento da extrusão do  $^{99m}Tc$ -MIBI é um indício da presença de elevados níveis da gpP, assim como da sua funcionalidade, podendo prever o desenvolvimento de resistência a certos agentes quimioterapêuticos mediados pela mesma proteína, como é o caso do irinotecano. Assim, podemos afirmar que o aumento da captação de  $^{99m}Tc$ -MIBI indica uma menor extrusão do mesmo, logo menor atividade da gpP.

De facto, a presença de butirato durante 1, 2 e 4 horas induziu o aumento da captação máxima do radiofármaco relativamente ao controlo (captação máxima 3,02 %), em que os valores das captações máximas obtidas foram de 3,45%, 3,29% e 3,30%, respetivamente. Porém, o aumento de captação com a incubação com butirato só foi significativo 90 minutos após a incubação das células com butirato durante 4 horas.

Assim, é possível afirmar que o butirato interfere no mecanismo de quimiorresistência da linha celular LSI034, com diminuição da atividade da proteína gpP e, por conseguinte, com menor extrusão de irinotecano, e consequente inibição da proliferação celular. Noutros estudos, diversos autores também verificaram a capacidade do butirato afetar a gpP (Bates *et al.*, 1992; Gonçalves *et al.*, 2011). Além disso, estudos demonstraram que mutações no gene *TP53* estão relacionadas com a resistência a alguns agentes de quimioterapia (Lowe *et al.*, 1993) e que a expressão da proteína gpP é regulada e ativada pela P53mt (Bodey *et al.*, 1997). Uma vez que o butirato tem a capacidade de diminuir a expressão de P53mt, um possível mecanismo de atuação na diminuição da atividade da gpP poderá estar associado à sua menor expressão. Esta hipótese poderá ser

refutada futuramente pela análise da expressão de gpP após a incubação com butirato, por citometria de fluxo, como realizado a nível basal por Casalta-Lopes e colaboradores (Casalta-Lopes *et al.*, 2011).

Posteriormente, foi avaliado o efeito desta terapia *in vivo*, de modo a averiguar o seu potencial terapêutico. Assim, os modelos heterotópicos demonstraram a capacidade da terapia combinada inibir o crescimento tumoral. Alguns estudos demonstraram a capacidade do butirato inibir o crescimento tumoral em murganhos e ratos (Kuefer *et al.*, 2004).

Ao observar os resultados verificou-se que, a monoterapia com butirato diminuiu a taxa de crescimento tumoral em relação ao controlo ao final dos 14 dias de terapia. No entanto, também se observou que a monoterapia com o irinotecano induziu uma maior diminuição da taxa de crescimento tumoral em relação à terapia apenas com butirato. Estas duas monoterapias contribuíram para perceber o efeito dos dois compostos isoladamente *in vivo*, uma vez que uma das abordagens é conjugá-las de forma a diminuir a toxicidade do irinotecano e potenciar os seus efeitos terapêuticos. Assim, verificou-se, a partir dos resultados da monoterapia, um decréscimo, sem significância estatística, da taxa de crescimento tumoral, quando os ratinhos foram sujeitos ao tratamento com a terapia combinada, em relação à terapia apenas com irinotecano.

Por outro lado, é de realçar que a opção que mais diminuiu a massa corporal dos animais foi a terapia combinada e a terapia com irinotecano, enquanto a terapia com butirato, foi a terapia que menos diminui a massa corporal dos animais. É de considerar a possível associação da diminuição da massa corporal dos animais em estudo sujeitos ao tratamento com irinotecano e o seu efeito tóxico. Um dos efeitos tóxicos do irinotecano é a nível intestinal, pelo que em casos de toxicidade, se pode observar uma severa perda de peso resultantes das diarreias graves causadas pelo fármaco (Lin *et al.*, 2012; Oostendorp *et al.*, 2010). É um objetivo futuro a diminuição de efeitos secundários causados pelo irinotecano, através da diminuição da concentração administrada.

As curvas de Kaplan-Meier ao longo dos 14 dias de terapia são representativas do evento escolhido para comparar as diferentes abordagens terapêuticas, isto é, quando o volume tumoral relativo atinge um valor superior ou igual a 2,5. Esta análise robustece o que foi possível demonstrar nos resultados evidenciados anteriormente referentes à taxa de crescimento tumoral, em que foi possível verificar que a terapia combinada demonstra uma melhor resposta da inibição do crescimento tumoral comparado com as monoterapias com butirato e com irinotecano. A partir destas curvas, observou-se que nenhum animal sujeito a

terapia combinada atingiu o volume tumoral relativo de 2,5 pelo que esta terapia foi considerada mais eficaz do que a monoterapia com irinotecano, apesar de não se ter demonstrado significância estatística.

Assim, é de realçar que a terapia combinada foi mais eficaz que a terapia isolada com irinotecano na diminuição da taxa de crescimento tumoral e no menor decréscimo da massa corporal dos animais durante o tratamento. Num estudo futuro, a concentração de irinotecano administrada deverá ser menor, de forma a otimizar a relação benefício-efeito da combinação entre o irinotecano e o butirato. Por outro lado, é de notar que, recentemente, tem sido demonstrado que o processo angiogénico necessita do recrutamento do papel transcripcional da  $\beta$ -catenina (Clifford *et al.*, 2008; Naik *et al.*, 2009; Orlandini *et al.*, 2003). O facto de ter existido uma maior inibição do crescimento tumoral nos murganhos com a terapia combinada e com o butirato poderá também ser explicada pela inibição da angiogénese. Torna-se, pois, necessário estudar o efeito do butirato na expressão de VEGF e correlacioná-lo com o processo angiogénico.

De notar que, o modelo heterotópico foi desenvolvido com a linha celular WiDr. Relembre-se que foi nesta linha que a combinação do butirato com irinotecano só apresentou sinergia às 72 horas, enquanto a linha C2BBel e a linha LS1034 demonstraram sinergia às 48 horas. Este modelo, com recurso à linha celular WiDr, foi fácil de desenvolver, na medida em que mostrou ser bastante reprodutível e cujos tumores se desenvolviam rapidamente, permitindo prosseguir o estudo com os quatro grupos de animais. O mesmo não foi possível para o caso das linhas celulares C2BBel e LS1034, cujo desenvolvimento dos modelos heterotópicos foi iniciado, contudo, não se mostrando reprodutível, não permitiu o seguimento dos estudos. No entanto, tendo em conta os resultados promissores obtidos *in vitro*, torna-se necessário no futuro, otimizar o modelo heterotópico para estas linhas celulares tumorais e, posteriormente, avaliar o potencial da terapia combinada entre o irinotecano e o butirato.

Nos modelos ortotópicos, a linha inoculada foi a linha tumoral LS1034. Esta linha celular apresentou resultados bastante promissores, com uma boa resposta à terapia tanto com o butirato, como com a combinação de butirato com irinotecano. Além disso, esta linha celular tem como local de origem o cego e, sendo esta zona uma das zonas em que se verifica elevada incidência do cancro do cólon teve todo o interesse estudar o efeito do butirato nesta condição *in vivo*. Além disso, as maiores concentrações de butirato no intestino são obtidas na região do cego, sendo possível obter concentrações da ordem dos

20 mM (Cummings *et al.*, 1987), demonstrando o potencial desta terapia para tumores com características semelhantes às da linha tumoral LS1034.

Dos resultados preliminares dos dois animais em estudo no grupo controle, os resultados evidenciaram o desenvolvimento de tumor num deles, no entanto, o segundo animal não desenvolveu tumor. Os dois animais em estudo do grupo da terapia com butirato, não mostraram indícios de doença neoplásica, ao fim dos 14 dias de tratamento. Assim, um de dois eventos poderá ter ocorrido: (1) não ocorreu desenvolvimento de doença neoplásica, ou (2) ocorreu desenvolvimento de doença neoplásica, a qual foi revertida pelo tratamento com butirato a que o animal foi sujeito. De realçar que estes resultados constituem resultados preliminares, pelo que mais estudos terão que ser realizados com o intuito de inferir algo mais em concreto no que diz respeito à influência que o butirato pode ter no desenvolvimento tumoral, no seu microambiente de origem. De referir que, de futuro, é também de extrema importância a utilização de um método que permita a monitorização do desenvolvimento tumoral, por exemplo, pela utilização de técnicas imagiológicas com recurso a um radiofármaco específico.

Podemos afirmar que se trata de um modelo promissor para o estudo e poderá permitir a compreensão da influência da terapia com butirato, assim como da terapia combinada no desenvolvimento tumoral. Sugere-se também para futuro a quantificação de marcadores como a P53mt, a  $\beta$ -catenina e o VEGF nas amostras excisadas, de forma a permitir avaliar melhor o potencial terapêutico e o mecanismo de ação desta combinação de compostos.

Tendo em conta os resultados obtidos, podemos afirmar que a combinação entre o butirato e o irinotecano constitui uma abordagem sinérgica do efeito anticancerígeno em três linhas celulares humanas de cancro do cólon, C2BBel, LS1034 e WiDr. No entanto, foram evidentes os comportamentos diferentes entre as três linhas celulares em resposta ao tratamento com o butirato e com a terapia combinada. Por outro lado, também se tornou clara a importância do conhecimento do perfil tumoral para o sucesso da terapia combinada, pelo que mais estudos deverão ser realizados para complementar as informações obtidas ao longo deste trabalho. Além disso, verificou-se que o perfil quimiorresistente da linha LS1034, devido à atividade da gpP, é afetado pela presença do butirato, sensibilizando a célula ao irinotecano. Este resultado é bastante promissor, demonstrando o potencial terapêutico do butirato em conjugação com o irinotecano. Por outro lado, é possível constatar que a terapia combinada teve um efeito citotóxico nas três linhas celulares C2BBel, LS1034 e

WiDr, apesar das suas diferentes localizações no intestino grosso e do seu diferente perfil genético.

Foi possível também verificar o sucesso da combinação dos dois compostos em ratinhos, sem penalização do bem-estar dos animais, reforçando o potencial terapêutico entre o irinotecano e o butirato. No entanto, é de extrema relevância a realização de estudos em modelos heterotópicos com as linhas celulares C2BBel e LSI034. Além disso, é necessário prosseguir com o estudo em modelos ortotópicos, de forma a melhor mimetizar a resposta clínica após recurso à terapia com butirato e com a combinação de butirato e irinotecano.



## 5. CONCLUSÃO



Ao longo deste trabalho experimental, que teve como objetivo principal avaliar o potencial terapêutico da combinação entre o butirato e o irinotecano em estudos *in vitro* e *in vivo*, foi possível avaliar os efeitos do tratamento com butirato em linhas celulares tumorais e normais, bem como o seu efeito no crescimento tumoral em xenotransplantes de cancro colorretal.

O ensaio MTT permitiu verificar que o efeito do butirato na inibição da proliferação celular é dependente da concentração em que este está presente. A linha tumoral C2BBel demonstrou ser a linha mais resistente ao seu efeito, provavelmente devido à ausência da expressão de P53 e à menor alteração da razão BAX/BCL-2 induzida pelo butirato. Por outro lado, a linha tumoral LSI034, descrita como quimiorresistente, demonstrou ser a linha mais sensível ao efeito do butirato a longos tempos de incubação. Este efeito poderá dever-se à ação do butirato sobre a inibição da expressão de P53 e de  $\beta$ -catenina e a inibição da atividade da glicoproteína-P.

Através do estudo da viabilidade celular e tipos de morte foi possível corroborar os resultados do ensaio de MTT. Foi possível verificar que o aumento da concentração de butirato induzia a diminuição da viabilidade celular nas três linhas celulares. No entanto, não se verificou um tipo de morte em comum nas três linhas celulares. Isto é, foi possível verificar que em baixas concentrações de butirato, o tipo de morte predominante foi a apoptose, com exceção da linha C2BBel e, com altas concentrações de butirato (20 mM), o tipo de morte predominante nas três linhas celulares foi a necrose. Os valores da razão BAX/BCL-2 permitem comprovar o efeito do butirato no processo apoptótico nas linhas tumorais, sendo que em baixas concentrações, o butirato induz um aumento da razão BAX/BCL-2, cuja menor diferença foi verificada na linha C2BBel.

Foi possível verificar que o butirato induz a diminuição da expressão da proteína P53 nas linhas LSI034 e WiDr acompanhada com o decréscimo da expressão de  $\beta$ -catenina. A presença de P53 mutada e do complexo APC mutado, que levam à acumulação aberrante de  $\beta$ -catenina na célula, são causas responsáveis pelo crescimento, sobrevivência e proliferação celular em células tumorais. Com os resultados obtidos é possível afirmar que, o facto do butirato diminuir a expressão destes dois fatores de sobrevivência tumoral, poderá ser uma das causas da diminuição da viabilidade celular e inibição da proliferação celular.

Uma vez que um dos principais objetivos do trabalho foi avaliar o potencial da combinação do butirato com o irinotecano foi necessário estudar o seu efeito isolado na proliferação das três linhas celulares tumorais, como termo de comparação. Mais uma vez o

ensaio MTT foi utilizado para avaliar o efeito citotóxico do irinotecan. Uma vez obtidos os valores de  $IC_{50}$  após o tratamento com irinotecano nas três linhas tumorais delineou-se o melhor desenho experimental de combinação dos dois compostos e avaliou-se a presença de sinergia.

Foi possível verificar, de uma forma geral, que os valores de  $IC_{50}$  do irinotecano obtidos quando em combinação com o butirato, foram inferiores aos valores de  $IC_{50}$  do mesmo quando testado em monoterapia. A linha LS1034 demonstrou ser a linha mais sensível ao efeito da combinação, provavelmente devido ao facto de o butirato ser capaz de modular a atividade da glicoproteína-P. Por outro lado, o butirato é um inibidor das HDAC, induzindo um maior relaxamento da cromatina e, conseqüentemente do ADN e, poderá estar então, a fornecer um maior “acesso” do irinotecano ao ADN. Assim, o estímulo provocado à célula pela combinação dos dois compostos poderá inibir mais acentuadamente a progressão da proliferação celular. Foi averiguado também, a existência de sinergia entre os compostos a partir das 48 horas de incubação nas linhas celulares C2BBel e LS1034, no entanto, só foi possível verificar sinergia na linha WiDr a partir das 72 horas.

Os resultados relativos ao estudo da viabilidade e tipos de morte celular induzida pela combinação dos dois compostos corroboraram os resultados obtidos pelo ensaio de MTT. O estudo do ciclo celular permitiu verificar que existe um aumento da população em pré-G1 (pico apoptótico), corroborando os resultados relativos à apoptose. Foi possível verificar um aumento em G0/G1 com o tratamento com butirato e com a terapia combinada nas linhas celulares C2BBel e LS1034, sugerindo que o butirato poderá estar a influenciar a expressão de P21. No entanto, na linha WiDr, verificaram-se alterações no ciclo celular, em que o tratamento com terapia combinada e irinotecano demonstraram um aumento da população em G2/M, provavelmente devido à maior concentração de butirato usada e ao maior tempo de exposição do mesmo. Relativamente à expressão de P53, foi possível verificar que com o tratamento com a terapia combinada, a expressão de P53 é menor relativamente ao controlo. No entanto, a diminuição da expressão de P53 nas linhas celulares foi acompanhada com a diminuição da viabilidade e morte celular. No entanto, para dar maior sustentabilidade aos resultados obtidos, pretende-se analisar, de futuro, o efeito da terapia combinada na expressão da proteína P53 na sua forma ativa, ou seja, na sua forma fosforilada. Por outro lado, torna-se necessário avaliar o dano no ADN, e para tal, de futuro, pretende-se também realizar um ensaio que o permita, como o ensaio cometa.

Na segunda parte do trabalho, foi avaliado o efeito desta terapia *in vivo*, de modo a averiguar o seu potencial terapêutico. Assim, os modelos heterotópicos com recurso à linha celular WiDr demonstraram a eficácia da terapia combinada na inibição do crescimento tumoral. De notar que foi possível verificar, um decréscimo da taxa de crescimento tumoral quando os ratinhos foram sujeitos ao tratamento com a terapia combinada, em relação à terapia apenas com irinotecano, no entanto sem significância estatística. Num estudo futuro a dose de irinotecano administrada deverá ser menor, de forma a otimizar a relação benefício-efeito da combinação entre o irinotecano e o butirato. Foi possível também verificar o sucesso da combinação dos dois compostos em ratinhos, sem penalização do bem-estar dos animais, reforçando o potencial terapêutico entre o irinotecano e o butirato. No entanto, é de extrema relevância a realização de estudos em modelos heterotópicos com as linhas celulares C2BBel e LSI034. Além disso, é necessário prosseguir com o estudo em modelos ortotópicos, de forma a melhor mimetizar a resposta clínica após recurso à terapia com butirato e com a combinação de butirato com irinotecano.

Este trabalho demonstrou o potencial terapêutico do uso do butirato em combinação com o irinotecano. O uso dos inibidores de HDAC com agentes quimioterapêuticos que têm como alvo o ADN parece ser uma possível solução no tratamento do cancro colorretal (Stiborová *et al.*, 2012). Por outro lado, um estudo recente demonstrou que o efeito protetor do butirato neutraliza lesões causadas pelo SN-38 (composto resultante da metabolização do irinotecano), atenuando a sua toxicidade sem causar efeitos colaterais pronunciados (Lin *et al.*, 2014). Assim, parece que o butirato poderá ter um papel quimiopreventivo na terapia contra o cancro colorretal, daí que uma dieta rica em fibra durante o regime de quimioterapia poderá tornar o tratamento mais eficaz e menos lesivo para o doente. No entanto, é necessário compreender melhor os mecanismos associados a possíveis sinergias com os agentes quimioterapêuticos usados atualmente na prática clínica. É importante, cada vez mais, perceber quais os doentes que podem beneficiar com um tipo de tratamento (como o 5-FU e o irinotecano) e a eficácia do mesmo segundo a variabilidade interindividual no comportamento farmacogenético. O uso de compostos naturais como o butirato poderá aumentar a eficácia do tratamento com a diminuição de efeitos adversos da terapia.



## 6. BIBLIOGRAFIA



- ALBA, F. J. *et al.* - Protein Blotting and Detection. Totowa, NJ. 536, (2009), 407–416.
- AMBUDKAR, S. V *et al.* - P-glycoprotein: from genomics to mechanism. Oncogene. (2003), 7468–85.
- AMERICAN CANCER SOCIETY - Colorectal Cancer Facts & Figures. (2013).
- ATCC - Genes and Biocompounds. (2014).
- ATCC - Genes and Biocompounds. (2010).
- BAI, L.; ZHU, W. - p53: Structure , Function and Therapeutic Applications. (2006), 141–153.
- BASU, A.; HALDAR, S. - The relationship between Bcl2 , Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. Molecular Human Reproduction. 4, 12 (1998), 1099–1109.
- BATES, S. E. *et al.* - Modulation of P-glycoprotein phosphorylation and drug transport by sodium butyrate. Biochemistry. 31, 28 (1992) 6366–72.
- BEDNER, E. *et al.* - Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. Cytometry. 35, 3 (1999), 181–95.
- BILLIN, A N.; THIRLWELL, H.; AYER, D. E. - Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator. Molecular and cellular biology. 20, 18 (2000), 6882–90.
- BODEY, B. *et al.* - Immunocytochemical detection of the p170 multidrug resistance (MDR) and the p53 tumor suppressor gene proteins in human breast cancer cells: clinical and therapeutical significance. Anticancer research. 17, 2B (1997), 1311–8.
- BORDONARO, M.; LAZAROVA, D. L.; SARTORELLI, A. C. - The activation of beta-catenin by Wnt signaling mediates the effects of histone deacetylase inhibitors. Experimental cell research. 313, 8 (2007), 1652–66.
- BORNER, C. - The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. Molecular immunology. 39, 11 (2003), 615–47.
- BRAS-GONÇALVES, R. A. *et al.* - Synergistic efficacy of 3n-butyrate and 5-fluorouracil in human colorectal cancer xenografts via modulation of DNA synthesis. Gastroenterology. 120, 4 (2001), 874–888.
- BUCH, K. *et al.* - Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay: a comparative study. Radiation oncology. (2012).
- CAGATAY, T.; OZTURK, M. - P53 mutation as a source of aberrant beta-catenin accumulation in cancer cells. Oncogene. 21, 52 (2002), 7971–80.
- CASALTA-LOPES, J. - Efflux Pumps Modulation in Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines: The Role of Nuclear Medicine. Journal of Cancer Therapy. 2, 3 (2011) 408–417.

CHOU, T. - Theoretical Basis , Experimental Design , and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. Pharmacological Reviews. 58 (2007), 621-681.

CHOU, T.-C. - Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer research. 70, 2 (2010) 440–6.

CLIFFORD, R. L.; DEACON, K.; KNOX, A. J. - Novel regulation of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) by transforming growth factor (beta)1: requirement for Smads,  $\beta$ -catenin, and GSK3 $\beta$ . The Journal of biological chemistry. 283, 51 (2008).

CRIM, K. C. *et al.* - Upregulation of p21Waf1/Cip1 expression in vivo by butyrate administration can be chemoprotective or chemopromotive depending on the lipid component of the diet. Carcinogenesis. 29, 7 (2008), 1415–20.

CRISMAN, H. A; STEINKAMP, J. A - Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. The Journal of cell biology. 59, 3 (1973), 766–71.

CUMMINGS, J. H. *et al.* - Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. Gut. 28, 10 (1987) 1221–7.

DAGROSA, M. A. *et al.* - Experimental application of boron neutron capture therapy to undifferentiated thyroid carcinoma. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics. 57, 4 (2003) 1084–1092.

DARZYNKIEWICZ, Z. *et al.* - Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. Cytometry. 13, 8 (1992) 795–808.

DAVIE, J. R. - Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate. The Journal of nutrition. (2003), 2485–2493.

DEGENHARDT, K. *et al.* - BAX and BAK mediate p53-independent suppression of tumorigenesis. Cancer cell. 2, 3 (2002), 193–203.

DONOHUE, D. R. *et al.* - The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. Molecular cell. 48, 4 (2012), 612–26.

EASWARAN, V. *et al.* -  $\beta$ -Catenin Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Colon Cancer. Cancer Research. 63, (2003) 3145–3153.

EGORIN, M. J. *et al.* - Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats. Cancer chemotherapy and pharmacology. 43, 6 (1999) 445–53.

FADEEL, B.; ORRENIUS, S. - Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. Journal of internal medicine. 258, 6 (2005) 479–517.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; NEILL, K. L. O. - The comet assay: a comprehensive review. Mutation Research. 33, 9 (1995) 37–59.

FEARON, E. F.; VOGELSTEIN, B. - for Colorectal Tumorigenesis. 61,1990, 759–767.

FEDERICO, M.; BAGELLA, L. - Histone deacetylase inhibitors in the treatment of hematological malignancies and solid tumors. Journal of biomedicine & biotechnology. (2011).

FERLAY, J. *et al.* - Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. European journal of cancer. 49, 6 (2013) 1374–403.

FERRAGUT, J. A.; SACEDA, M. - Trichostatin A effects in different drug-resistant tumor cell lines. (2002), 175–179.

FRIDMAN, J. S.; LOWE, S. W. - Control of apoptosis by p53. Oncogene. 22, 56 (2003).

GANAPATHY, V. *et al.* - Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cancer. The AAPS journal. 10, 1 (2008), 193–9.

GILES, R. H. *et al.* - Interplay between VHL/HIF1 $\alpha$  and Wnt/beta-catenin pathways during colorectal tumorigenesis. Oncogene. 25, 21 (2006), 3065–70.

GILL, R. K. *et al.* - Expression and membrane localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. American journal of physiology. Cell physiology. 289, 4 (2005), 846–52.

GODMAN, C. A *et al.* - HDAC3 impacts multiple oncogenic pathways in colon cancer cells with effects on Wnt and vitamin D signaling. Cancer biology & therapy. 7, 10 (2008) 1570–80.

GOMES, M. - Modelos Ortotópicos de Adenocarcinoma Colorretal: Caracterização Funcional e Molecular, 2013.

GONÇALVES, P.; GREGÓRIO, I.; MARTEL, F. - The short-chain fatty acid butyrate is a substrate of breast cancer resistance protein. American journal of physiology. Cell physiology. 301, 5 (2011), 984–94.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. - Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nature reviews. Cancer. (2002), 48–58.

GRIVICICH, I. *et al.* - Irinotecan and oxaliplatin: an overview of the novel chemotherapeutic options for the treatment of advanced colorectal cancer. Brazilian journal of medical and biological research. 34, 9 (2001), 1087–103.

HAMER, H. M. *et al.* - Review article: the role of butyrate on colonic function. Alimentary pharmacology & therapeutics. 27,2 (2008), 104–19.

HAN, J. I.; NA, K. J. - Wnt /  $\beta$  Catenin Signaling Pathway in Canine Skin Melanoma and a Possibility as a Cancer Model for Human Skin Melanoma. (2010).

HAUG, K.; KRAVIK, K. L.; ANGELIS, P. M. DE - Cellular response to irinotecan in colon cancer cell lines showing differential response to 5-fluorouracil. Anticancer research. 28,2 (2008), 583–92.

HEINEN, C. D. *et al.* - Microsatellite Instability in Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines That Have Full-Length Adenomatous Polyposis Coli Protein Advances in Brief Microsatellite Instability in Colorectal Adenocarcinoma. (1995), 4797–4799.

HENGARTNER, M. O. - The biochemistry of apoptosis. Nature. (2000) 770–6.

HERNANDEZ, A *et al.* - Butyrate sensitizes human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. Surgery. 130,2 (2001) 265–72.

HIJOVA, E.; CHMELAROVA, A - Short chain fatty acids and colonic health. Bratislavské lekárske listy. 108,8 (2007) 354–8.

ILYAS, M. *et al.* - Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 94,19 (1997).

INFARMED - Irinotecan - Folheto informativo: Informação para o utilizador. (2011).

JANSON, W.; BRANDNER, G.; SIEGEL, J. - Butyrate modulates DNA-damage-induced p53 response by induction of p53-independent differentiation and apoptosis. Oncogene. 15, 12 (1997), 1395–406.

JEMAL, A.; BRAY, F.; FERLAY, J. - Global Cancer Statistics. 61:2 (2011) 69–90.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. - Histologia e biologia celular. (2012).

KIM, Y.-H. *et al.* - Sodium butyrate sensitizes TRAIL-mediated apoptosis by induction of transcription from the DR5 gene promoter through Sp1 sites in colon cancer cells. Carcinogenesis. 25, 10 (2004) 1813–20.

KIRAT, D.; KATO, S. - Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) mediates transport of short-chain fatty acids in bovine caecum. Experimental physiology. 91,5 (2006).

KOESTERS, R. *et al.* - Mutational Activation of the  $\beta$ -Catenin Proto-Oncogene Is a Common Event in the Development of Wilms' Tumors Advances in Brief Development of Wilms' Tumors I. (1999) 3880–3882.

KUEFER, R. *et al.* - Sodium butyrate and tributyrin induce in vivo growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer. British journal of cancer. 90, 2 (2004), 535–41.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. - Western blotting. Methods (San Diego, Calif.) 38, 4 (2006) 283–93.

LABIANCA, R. *et al.* - Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. (2013), 64–72.

LANGDON, S. P. - Cancer Cell Culture: Methods and protocols. Humana Pre ed. New Jersey.

LI, Y. *et al.* - HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced beta-catenin nuclear localization. The Journal of biological chemistry. 283, 19 (2008).

LIN, X. B. *et al.* - Irinotecan (CPT-11) chemotherapy alters intestinal microbiota in tumour bearing rats. (2012).

LIN, X. B. *et al.* - The role of intestinal microbiota in development of irinotecan toxicity and in toxicity reduction through dietary fibres in rats. (2014).

LOPES, T. *et al.* - Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. (2002).

LOWE, S. W. *et al.* - P53-Dependent Apoptosis Modulates the Cytotoxicity of Anticancer Agents. Cell. 74, 6 (1993), 957–67.

LUCZYŃSKA, E.; ANIOŁ, J. - Neoangiogenesis in prostate cancer. Contemporary oncology. 17,3 (2013) 229–233.

LUO, F. R. *et al.* - Intestinal transport of irinotecan in Caco-2 cells and MDCK II cells overexpressing efflux transporters PGP, CMOAT, and MRPI. (2002), 763–770.

MA, X.; EZZELDIN, H. H.; DIASIO, R. B. - Histone deacetylase inhibitors: current status and overview of recent clinical trials. Drugs. 69, 14 (2009) 1911–34.

MAHYAR-ROEMER, M.; ROEMER, K. - p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. Oncogene. 20, 26 (2001), 3387–98.

MARC, D.; SAUSVILLE, A. - I Study of the in Patients Orally with Administered Solid Butyrate. (1998), 629–634.

MARSH, S.; HOSKINS, J. M. - Irinotecan pharmacogenomics. (2011).

MARTIN, P. M. *et al.* - Identity of SMCT1 (SLC5A8) as a neuron-specific Na<sup>+</sup>-coupled transporter for active uptake of L-lactate and ketone bodies in the brain. Journal of neurochemistry. 98, 1 (2006), 279–88.

MARTINEZ, J. D. *et al.* - Molecular Biology of Cancer. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery.

MINUCCI, S.; PELICCI, P. G. - Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. Nature reviews. Cancer. 6, 1 (2006), 38–51.

MOSMANN, T. - Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods. 65, 1-2 (1983), 55–63.

MULLER, P. A J.; VOUSDEN, K. H. - P53 Mutations in Cancer. Nature cell biology. 15, 1 (2013), 2–8.

MURPHY, K. M. *et al.* - Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. Cell death and differentiation. 7, 1 (2000), 102–11.

NAIK, S. *et al.* - Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Is Synthetic Lethal to Aberrant {beta}-Catenin Activation in Colon Cancer. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 15, 24 (2009) 7529–7537.

OOSTENDORP, L. J. M. *et al.* - Systematic review of benefits and risks of second-line irinotecan monotherapy for advanced colorectal cancer. Anti-cancer drugs. 21, 8 (2010), 749–58.

ORLANDINI, M.; SEMBOLONI, S.; OLIVIERO, S. - Beta-catenin inversely regulates vascular endothelial growth factor-D mRNA stability. The Journal of biological chemistry. 278, 45 (2003).

PAJAK, B.; ORZECZOWSKI, A; GAJKOWSKA, B. - Molecular basis of sodium butyrate-dependent proapoptotic activity in cancer cells. Advances in medical sciences. (2007), 83–8.

PAN, M.-H. *et al.* - Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. Molecular nutrition & food research. 55, 1 (2011), 32–45.

PAN, Y.; HAINES, D. S. - Identification of a tumor-derived p53 mutant with novel transactivating selectivity. (2000).

PANTALEÃO, C.; LUCHS, A. - Câncer e modelos experimentais de tumores murinos Cancer and experimental models of mouse tumor. Revista Instituto Adolfo Lutz. 69, 4 (2010), 439–445.

PARODER, V. *et al.* - Na(+)/monocarboxylate transport (SMCT) protein expression correlates with survival in colon cancer: molecular characterization of SMCT. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103, 19 (2006), 7270–5.

PELLIZZARO, C.; CORADINI, D. - Modulation of angiogenesis-related proteins synthesis by sodium butyrate in colon cancer cell line HT29 Sodium butyrate ( NaB ), a short-chain fatty acid naturally arrest , differentiation and apoptosis in colon cancer cells . (2002).

PENG, L.; JIANG, H.; BRADLEY, C. - [Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on lymphoma cells undergoing apoptosis]. Journal of West China University of Medical Sciences. 32, 4 (2001), 602–4, 620.

- PETERSON, M. D.; MOOSEKER, M. S. - Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2BBE clones of the human intestinal cell line, Caco-2. Journal of cell science. (1992), 581–600.
- PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. - Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. Biochimica et biophysica acta. (2004) 83–94.
- PIWNICA-WORMS, D. *et al.* - Functional Imaging of Multidrug-resistant P-Glycoprotein with an Organotechnetium Complex Functional Imaging of Multidrug-resistant P-Glycoprotein. (1993).
- ROSE, D. J. *et al.* - Influence of Dietary Fiber on Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer: Importance of Fermentation Pattern. (2007).
- ROTHENBERG, M. L. - Irinotecan (CPT-11): Recent Developments and Future Directions- Colorectal Cancer and Beyond. The Oncologist. 6, 1 (2001), 66–80.
- SANCHO, E.; BATLLE, E.; CLEVERS, H. - Signaling pathways in intestinal development and cancer. Annual review of cell and developmental biology. (2004) 695–723.
- SARMA, K. D.; RAY, D.; ANTONY, A - Improved sensitivity of trypan blue dye exclusion assay with Ni<sup>2+</sup> or Co<sup>2+</sup> salts. Cytotechnology. 32, 2 (2000) 93–5.
- SCHAFFER, K. A. - The Cell Cycle: A Review. Veterinary Pathology. 35, 6 (1998), 461–478.
- SCHARLAU, D. *et al.* - Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. Mutation research. 682, 1 (2009) 39–53.
- SCHÜLER, S. *et al.* - HDAC2 attenuates TRAIL-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. Molecular cancer. 9, (2010).
- SEDDON, R.; BURCHELL, B. - Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert ' s syndrome Wttest. (1995).
- SENGUPTA, S.; MUIR, J. G.; GIBSON, P. R. - Does butyrate protect from colorectal cancer? Journal of gastroenterology and hepatology. 21, 1 (2006) 209–18.
- SEO, M.-D. *et al.* - Irinotecan combined with 5-fluorouracil and leucovorin as second-line chemotherapy for metastatic or relapsed gastric cancer. Japanese journal of clinical oncology. 38, 9 (2008), 589–95.
- SHANMUGAM, C. *et al.* - p53 Nuclear accumulation and Bcl-2 expression in contiguous adenomatous components of colorectal adenocarcinomas predict aggressive tumor behavior. The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society. 56, 3 (2008), 305–12.
- SHERR, C. J. - Cancer cell cycles. Science. (1996), 1672–7.

- SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. - Cancer Statistics, 2013. 63, 1 (2013).
- SIGAL, A; ROTTER, V. - Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. Cancer research. 60, 24 (2000), 6788–93.
- SOORYAKUMAR, D. *et al.* - Molecular and cellular pharmacology of the novel noncamptothecin topoisomerase I inhibitor Genz-644282. Molecular cancer therapeutics. 10, 8 (2011), 1490–9.
- STIBOROVÁ, M. *et al.* - The synergistic effects of DNA-targeted chemotherapeutics and histone deacetylase inhibitors as therapeutic strategies for cancer treatment. Current medicinal chemistry. 19, 25 (2012) 4218–38.
- TAKASHI, N. *et al.* - Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide Polymorphisms Takashi Nozawa , Hironobu Minami , Shigeki Su. Drug Metabolism and Disposition. 33, 3 (2005) 434–439.
- TAVARES, A. A.; TAVARES, J. M. - Princípios Gerais de Culturas de Células e Citometria de Fluxo para Avaliação dos Efeitos da Radiação Ionizante. (2009).
- TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. - Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. Physiological reviews. 81, 3 (2001), 1031–64.
- VELÁZQUEZ, O. C.; LEDERER, H. M.; ROMBEAU, J. L. - Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia. Digestive diseases and sciences. 41, 4 (1996), 727–39.
- VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, D. R. VAN; BERNEMAN, Z. N. - The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell proliferation. 36, 3 (2003), 131–49.
- VETERANS, B. *et al.* - Histone Deacetylase Inhibition by Sodium Butyrate Chemotherapy Ameliorates the Neurodegenerative Phenotype in Huntington ' s Disease Mice. (2003).
- VIERHEILIG, H.; SCHWEIGER, P.; BRUNDRETT, M. - An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots+. Physiologia Plantarum. (2005).
- WANG, Z.; EHINGER, M.; GRANT, S. - Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid ( SAHA ) proceeds through pathways that are regulated by. (1999).
- WITT, O. *et al.* - HDAC family: What are the cancer relevant targets? Cancer letters. 277, 1 (2009) 8–21.
- XU, Y. - Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. Annals of Oncology. 13, 12 (2002) 1841–1851.

YAMAGUCHI, M. *et al.* - Histone deacetylase I regulates retinal neurogenesis in zebrafish by suppressing Wnt and Notch signaling pathways. Development (Cambridge, England). 132, 13 (2005) 3027–43.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. - The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature reviews. Molecular cell biology. 9, 1 (2008), 47–59.

YU, D. C. W. *et al.* - Butyrate suppresses expression of neuropilin I in colorectal cell lines through inhibition of Sp1 transactivation. Molecular cancer. 9, 1 (2010), 276.

