



Gonçalo Filipe Moura Ferreira

# BUTIRATO E RADIOTERAPIA NO CANCRO COLORRETAL

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pela Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e pelo Professor Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Gonçalo Filipe Moura Ferreira

# BUTIRATO E RADIOTERAPIA NO CANCRO COLORRETAL

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pela Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e pelo Professor Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Capa

Adaptado de *The Hungry Microbiome: why resistant starch is good for you*  
(<https://www.youtube.com/watch?v=NI3KtR3LoqM>)

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta conhece 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.

O espectrómetro de RMN 600 Hz usado nas experiências integra a rede Nacional de RMN e foi adquirido no quadro do Programa Nacional para o Reequipamento Científico, contrato REDE/1517/RMN/2005 com financiamento do POCI 2010 (FEDER) e da Fundação para a Ciência e Tecnologia.

*One swears by whole meal bread, one by sour milk;  
vegetarianism is the only road to salvation of some,  
others insist not only on vegetables alone,  
but on eating those raw.*

*At one time the only thing that matters is calories;  
at another time they are crazy about vitamins and roughage.*

*The scientific truth may be put quite briefly;  
eat moderately, have an ordinary mixed diet and don't worry.*

**Sir Robert Hutchinson**, in *Newcastle Medical Journal* 1932, Vol 12



# Agradecimentos

Com o culminar desta última etapa da minha vida académica, deixo o meu sincero agradecimento, expresso em breves mas profundas palavras, a todos os que me acompanharam e incentivaram durante este percurso ambicioso, contribuindo para o meu sucesso.

Começo por manifestar a minha gratidão à Professora Doutora Maria Filomena Botelho, diretora do Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, não só por ter aceitado ser a orientadora desta dissertação, mas também por ter proporcionado o seu conhecimento e experiência na realização deste projeto, pelo seu apoio no rigor científico e pela sua simpatia nos momentos de partilha do grupo.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira, Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, orientador interno desta dissertação, por ter promovido um espírito crítico e criativo na abordagem científica, pela sua boa vontade e pela partilha de conhecimentos.

À Professora Doutora Margarida Abrantes, pela sua disponibilidade, pela sua preocupação e acompanhamento constantes ao longo deste projeto e pela sua amizade nos momentos de partilha, bem como pela sua seriedade e confiança nos momentos de discussão do trabalho.

À Mestre Salomé Pires, pela sua prontidão, pela sua paciência e compreensão no decorrer de várias dificuldades que o projeto enfrentou e pela sua boa disposição, amizade e carinho. O meu obrigado pelos conselhos e boa metodologia de trabalho com os diversos equipamentos, que contribuiu para a minha experiência laboratorial.

Ao Serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, pela autorização da realização dos estudos com radioterapia; ao Mestre João Casalta-Lopes, a todos os Especialistas em Física Médica e aos restantes profissionais de saúde do Serviço, pela boa disposição e simpatia, pelo apoio na execução dos tratamentos e também por todo o esclarecimento de procedimentos e dúvidas.



À Doutora Clara Rocha, pela disponibilidade para a análise estatística, e à Mestre Cristina Gonçalves, pelo apoio na colaboração dos estudos de citometria de fluxo e auxílio na interpretação dos resultados.

Aos Doutores Ana Brito, Mafalda Laranjo, Maria João Carvalho e Fernando Mendes, e à Mestre Ana Catarina Mamede, pela dedicação e apoio valiosos, pela partilha de conhecimentos e experiência nos laboratórios e pelos bons momentos de diversão com o grupo.

Ao Mestre Telmo Gonçalves, por todo o acompanhamento teórico e prático na realização deste projeto, pela ajuda incansável no laboratório e nas várias idas à radioterapia, bem como todo o seu espírito crítico na discussão deste trabalho. Aos Mestres João Encarnação e Ricardo Teixeira, por toda a ajuda e conhecimentos partilhados e por serem como dois braços direitos no nosso grupo. Aos três, o meu obrigado pela constante presença, amizade e boa disposição.

À Sra. D. Cláudia Caridade pelo seu contributo e pela disponibilidade e simpatia constantes.

À Adriana, à Ana Moço, à Andreia, à Beatriz, ao Gonçalo, à Inês Marques, à Jéssica Estrela, à Jéssica Lisboa, ao Nuno, ao Pedro, ao Rafael, à Renata, ao Sales, à Stéphanie, ao Spyros, à Tânia e a outros colegas do serviço de Biofísica com quem me cruzei, um obrigado pelo apoio, amizade e partilha nos momentos de trabalho e nos momentos de descontração.

À Cristina, à Inês, ao João, à Rita, ao Luís, ao Crespo, ao Diogo e ao Rodrigo, pela força, amizade e confiança. Agradeço em especial a vossa companhia em tantas aventuras e bons momentos que irei sempre relembrar.

Aos meus pais, ao meu irmão e à minha família, pelo apoio e amor incondicionais, pela preocupação, compreensão e todos os valores transmitidos.

# Índice

I.	INTRODUÇÃO.....	1
I.1.	Cancro do cólon.....	3
I.1.1.	Incidência do CCR e a dieta.....	4
I.1.2.	Carcinogénese e Eventos Moleculares.....	6
I.1.3.	Diagnóstico, Estadiamento e Tratamento.....	7
I.2.	Radioterapia.....	8
I.2.1.	Fundamentos da Radiação Ionizante e Resposta Celular.....	10
I.2.2.	Resposta dos Tecidos à Radiação.....	11
I.2.3.	Radorresistência no CCR.....	13
I.2.4.	Terapias Combinadas.....	16
I.3.	Fibra Dietética e o Butirato.....	17
I.3.1.	Butirato no CCR.....	19
I.3.2.	Transporte e Metabolismo do Butirato.....	20
I.3.3.	Butirato na Inibição das HDAC.....	22
I.4.	Butirato como Radiossensibilizador no Tratamento do CCR.....	24
II.	OBJETIVOS.....	27
III.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1.	Cultura Celular.....	33
3.2.	Indução de Resistência à Radioterapia.....	34
3.2.1.	Avaliação da Sobrevivência Celular.....	36
3.2.2.	Avaliação da Atividade Metabólica.....	38
3.2.3.	Avaliação do Efeito do Butirato no Metabolismo.....	39
3.3.	Avaliação do Efeito do Butirato em Combinação com a Radioterapia.....	46
3.3.1.	Avaliação da Atividade Metabólica.....	46
3.3.2.	Avaliação da Sobrevivência Celular.....	47
3.3.3.	Avaliação da Morte Celular.....	48
3.3.3.1.	Avaliação da Viabilidade Celular e dos Tipos de Morte Induzidos.....	48
3.3.3.2.	Avaliação da Expressão de BAX e de BCL-2.....	50
3.3.3.3.	Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial.....	51
3.3.3.4.	Avaliação do Ciclo Celular.....	52
3.3.4.	Avaliação do Stresse Oxidativo e das Defesas Antioxidantes.....	53

3.3.4.1.	Avaliação da Produção Intracelular de Peróxidos.....	53
3.3.4.2.	Avaliação da Produção Intracelular do Anião Superóxido.....	54
3.3.4.3.	Avaliação da Expressão da Glutathiona Reduzida.....	54
3.4.	Análise Estatística.....	55
IV.	RESULTADOS.....	57
4.1.	Indução de Resistência à Radioterapia.....	59
4.1.1.	Avaliação da Sobrevivência Celular.....	59
4.1.2.	Avaliação da Atividade Metabólica.....	59
4.1.3.	Avaliação do Efeito do Butirato no Metabolismo.....	61
4.2.	Avaliação do Efeito da Combinação do Butirato com Radioterapia.....	64
4.2.1.	Avaliação da Atividade Metabólica.....	64
4.2.2.	Avaliação da Sobrevivência Celular.....	68
4.2.3.	Avaliação da Morte Celular.....	70
4.2.3.1.	Avaliação da Viabilidade Celular e Tipos de Morte Induzidos.....	70
4.2.3.2.	Avaliação da Expressão de BAX/BCL-2.....	74
4.2.3.3.	Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial.....	76
4.2.3.4.	Avaliação do Ciclo Celular.....	77
4.2.4.	Avaliação do Stresse Oxidativo e das Defesas Antioxidantes.....	80
4.2.4.1.	Avaliação da Produção Intracelular de Peróxidos.....	80
4.2.4.2.	Avaliação da Produção Intracelular do Anião Superóxido.....	81
4.2.4.3.	Avaliação da Expressão de Glutathiona Reduzida.....	83
V.	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	85
VI.	BIBLIOGRAFIA.....	105

# Resumo

O cancro colorretal é uma das maiores causas de morte no mundo. As elevadas taxas de incidência têm sido associadas ao aumento da adoção de dietas tipicamente ocidentais, caracterizadas por elevadas quantidades de proteína e de gorduras de origem animal. Por outro lado, uma dieta rica em frutos e vegetais resulta no aumento da ingestão de fibras dietéticas relacionadas com um baixo risco de desenvolvimento desta neoplasia. A fermentação bacteriana das fibras dietéticas no cólon produz ácidos gordos de cadeia curta, nomeadamente o butirato, o qual tem uma função essencial no metabolismo celular e na manutenção da homeostasia do epitélio do cólon.

Uma das opções terapêuticas disponíveis para o tratamento do cancro colorretal é a radioterapia, sendo utilizada principalmente quando os tumores se localizam no reto. A radioterapia consiste na utilização da radiação ionizante para a indução de morte celular nas células tumorais. Contudo, um dos problemas principais é a resistência aos efeitos da radiação, não só devido ao facto de se tratar dum cancro sólido mas também devido à radiorresistência adquirida por uma percentagem de células do tumor, que impossibilita a previsão da resposta tumoral à radioterapia.

Por esta razão, a utilização de agentes químicos radiosensibilizadores, nomeadamente os inibidores das histona deacetilases, constitui uma estratégia que potencia os efeitos da radioterapia. A inibição das histona deacetilases promove a relaxação da cromatina e a exposição das cadeias de DNA, com alteração da estabilidade da dupla hélice durante um período de tempo mais longo, o que contribui para uma maior sensibilização das células tumorais a terapias que induzam danos no DNA. O butirato é considerado um inibidor das histona deacetilases e tem a capacidade de induzir a apoptose e a diferenciação seletiva nas células tumorais, ao contrário da promoção de um efeito protetivo que se verifica nas células normais.

O butirato tem assim as características ideais para ser utilizado na radiosensibilização de cancros colorretais e, deste modo, aumentar a eficácia da radioterapia. Assim, pretendeu-se neste trabalho avaliar não só a interferência do butirato em alterações no metabolismo glicolítico de uma linha celular radiorresistente, como o seu efeito na radiosensibilização de duas linhas celulares humanas de cancro colorretal.

Primeiramente, verificou-se que o butirato interferiu com o metabolismo da linha celular radiorresistente WiDr/10x, com indução de uma diminuição ligeira na produção de lactato. Na segunda parte do trabalho, os resultados demonstraram que, quando a linha celular

WiDr/I0x é tratada com butirato e posteriormente irradiada, a proliferação celular diminuiu de forma dependente da dose de radiação. Este efeito foi mais evidente na linha celular nativa WiDr e provou que o butirato sensibiliza as células aos efeitos da radiação. Os efeitos da radiação podem promover a morte celular ou também a senescência das células. A radiosensibilização com o butirato induziu a diminuição da viabilidade da linha celular WiDr às 72 horas, bem como o aumento da apoptose, interferindo na razão BAX/BCL-2. Na linha celular WiDr/I0x a radiosensibilização resultou na diminuição da sobrevivência celular a longo prazo, com diminuição do  $DL_{50}$ , e observou-se uma tendência para o aumento da apoptose às 72 horas. Por esta razão, as células radorresistentes aparentaram tornar-se senescentes após a indução de danos no DNA, resultando numa morte celular tardia. Além disso, às 72 horas, a radiosensibilização com o butirato induziu um bloqueio do ciclo celular na fase G2/M mais acentuado relativamente ao tratamento de radioterapia isoladamente, bem como um aumento do stresse oxidativo às 24 horas, interferindo com a produção de espécies oxidativas em ambas as linhas celulares em estudo. Estes efeitos estão correlacionados com a diminuição da proliferação e da viabilidade celulares, sendo maiores com o aumento do tempo de incubação, e estão relacionados com a senescência das células. A reversão da radorresistência induzida na linha celular WiDr/I0x demonstra o potencial do butirato na sensibilização de células com uma natureza radorresistente.

Podemos concluir com este trabalho que o butirato foi capaz de influenciar a radorresistência tumoral, aumentando a sensibilidade das células aos efeitos da radiação ionizante. Uma dieta rica em fibra dietética poderá sensibilizar os tumores colorretais aos efeitos da radiação, melhorando assim a eficácia da radioterapia.

# Abstract

Colorectal cancer is a major cause of death worldwide. Its high incidence has been associated with the adoption of Western diets, rich in animal protein and fat. On the other hand, a diet rich in fruit and vegetables increases the intake of dietary fiber, which is associated with a low risk of developing this carcinoma. Bacterial fermentation of dietary fiber in colon produces short-chain fatty acids, particularly butyrate, which has an essential function in cell metabolism and in the maintenance of the colon epithelium homeostasis.

One of the most common therapies currently used for the treatment of colorectal cancer is radiotherapy, mainly used when tumors are located in the rectum. Radiotherapy involves the use of ionizing radiation to induce cell death in tumor cells. However, one of the main problems is the radioresistance acquired by a percentage of tumor cells, making it difficult to predict tumor response in patients.

For this reason, the use of radiosensitizers, in particular inhibitors of histone deacetylases, constitutes a strategy to enhance the effects of radiotherapy. The inhibition of histone deacetylases promotes the relaxation of chromatin and the exposure of DNA strands, altering the double-helix stability over a longer period of time and contributing to a higher sensitization of tumor cells to DNA damaging agents. Butyrate is stated as an inhibitor of histone deacetylases and it has the ability to induce apoptosis and differentiation selectively in tumor cells, plus stimulating a protective effect in normal cells.

Thus, butyrate has ideal characteristics that make it useful to radiosensitize colorectal tumors to the effects of radiation, increasing radiotherapy efficacy. In this work, it was intended to evaluate the interference of butyrate in glycolytic metabolism of a radioresistant cell line and its capability to radiosensitize two human colorectal cancer cell lines.

Firstly, it was found that butyrate interferes with the metabolism of the radioresistant cell line WiDr/I0x, inducing a slight decrease on lactate production. In the second part, the results showed that, when the radioresistant cell line WiDr/I0x is treated with butyrate and after irradiated with increasing radiation doses, cell proliferation decreases in a dose-dependent way. This effect is marked in the native cell line WiDr and proves that butyrate can sensitize cells to the radiation effects. Radiation effects can promote cell death or induce senescence. After 72 hours, the irradiation effects in the presence of butyrate had also promoted the reduction of cell viability in WiDr cell line, and the increase of apoptosis by interfering with BAX and BCL-2 expression. In WiDr/I0x cell line, radiotherapy combined with butyrate resulted in the decrease of cell survival on long term, allowing the reduction of

DL<sub>50</sub>, and also showing a tendency to the increase of apoptosis after 72 hours. Radioresistant cells appear to become senescent after DNA damage, which results in a late cell death. Furthermore, after 72 hours, radiation treatment in combination with butyrate lead to a marked blockage of cell cycle at G2/M phase relative to the radiotherapy alone, and increased oxidative stress after 24 hours, by interfering with the production of oxidative species, for both cell lines. These effects correlate the decrease of cell proliferation and viability, becoming marked after 96 hours. These effects are also related with cell senescence. The regression of the radioresistance induced phenotype in WiDr/10x cell line, demonstrates butyrate's potential in sensitizing radioresistant cells.

With this work, we conclude that butyrate can influence tumor radioresistance, increasing the sensitivity of cells to the effects of ionizing radiation. A diet rich in dietary fiber could sensitize colorectal tumors to radiation effects, thereby improving the effectiveness of radiotherapy.

# Lista de Abreviaturas e Símbolos

- $\Delta\Psi_m$  – Potencial de membrana mitocondrial
- 4D-ART – *4D adaptive radiotherapy*
- 5-FU – 5-fluorouracilo
- ALDH – Aldehyde dehydrogenase
- ALT – Aminotransferase
- APC – *Adenomatous polyposis coli*
- AnV – Anexina V
- ASR – *Age-standardised rate*
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- ATM – Ataxia telangiectasia cinase mutada
- BCL-2 – *B-cell lymphoma 2*
- BCRP – *Brest cancer resistant protein*
- C-MYC – *Myelocytomatosis cell oncogene*
- CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio
- CCR – Cancro colorretal
- CDKN1A – *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*
- CET – Células estaminais tumorais
- CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono
- D<sub>2</sub>O – Óxido de deutério
- DCFH<sub>2</sub>-DA – 2'-7'-Diclorodihidrofluoresceína acetilada
- DHE – Dihidroetídio
- DISC – *Death-inducing signaling complex*
- DL<sub>50</sub> – Dose letal média
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – *Ácido desoxirribonucleico*
- DPC4 – *Deleted in pancreatic cancer locus 4*
- DR4 – *Death receptor 4*
- DR5 – *Death receptor 5*
- DSB – *Double-stranded breaks*



EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EGFR – *Epidermal growth factor receptor*

EPIC – *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*

FAP – *Familial adenomatous polyposis*

FBS – *Fetal bovine serum*

FDA – *Food and Drug Administration*

FITC – Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína

GPRI09A – *G protein-coupled receptor*

GSH – Glutathiona reduzida

H<sup>+</sup> – Ião hidrogénio

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogénio

H3ac – *Acetylated histone 3*

HAT – Histona acetiltransferase

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Ião bicarbonato

HDAC – Histona deacetilase

HG – *High glucose*

hMLH1 – *Human mutL homolog 1*

HNPPC – *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*

HR – *Homologous recombination*

Hz – Hertz

IC<sub>50</sub> – Concentração inibitória média

HDACi – Inibidor de histona deacetilase

JC-1 – Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,18,3,3-tetraetil-benzimidazol-carbocianina

IP – Iodeto de propídeo

KCl – Cloreto de potássio

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato de potássio monobásico

K<sub>m</sub> – Constante de Michaelis-Menten

LDH – Lactato desidrogenase

LG – *Low glucose*

LV – Leucoverina

MAPK – *Mitogen-activated protein kinase*

MCT1 – *Monocarboxylate transporter 1*

mM – Milimolar  
μM – Micromolar  
MIF – Média de intensidade de fluorescência  
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio  
mV – Milivolt  
MV – Megavolt  
NaCl – Cloreto de sódio  
NADH – *Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form*  
NADPH – *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form*  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato monossódico  
NHEJ – *Non-homologous end-joining*  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – Anião superóxido  
PBS – *Phosphate buffer saline*  
PC – *Pyruvate carboxylase*  
PDH – *Pyruvate dehydrogenase*  
PE – *Plate efficiency*  
PI3K/Akt/mTOR – *Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin*  
RASSF1 – *Ras association domain-containing protein 1*  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
RNase – Ribonuclease  
RNS – *Reactive nitrogen species*  
ROS – *Reactive oxygen species*  
SCFA – *Short-chain fatty acid*  
SF – *Survival factor*  
SLC5A8 – *Solute carrier family 5 member 8*  
SMCT1 – *Sodium-coupled monocarboxylate transporter*  
SSB – *Single-stranded breaks*  
STAT3 – *Signal transducer and activator of transcription 3*  
Tcf – *T-cell factor*  
TNF – *Tumor necrosis factor*  
TRAIL – *TNF-related apoptosis-inducing ligand*  
VEGF – *Vascular endothelial growth factor*

VMAT – *Volumetric modulated arc therapy*

UM – Unidades de monitor

# I. INTRODUÇÃO



## **I.1. Cancro do cólon**

O cancro colorretal (CCR) é atualmente uma das maiores causas de morte no mundo. Prevê-se que a incidência desta neoplasia continue a aumentar com o crescimento e o envelhecimento da população, devido ao aumento da adoção de hábitos de vida conhecidos por aumentar o seu risco, tais como o tabagismo, o excesso de peso, a inatividade física e as dietas pobres em frutos e em vegetais (Torre *et al.*, 2015).

No mundo, o CCR representa 9% da incidência geral de cancro. Todavia observa-se uma enorme diferença na distribuição geográfica global. O CCR afeta principalmente os países desenvolvidos com uma dieta ocidental, rica em carnes vermelhas e em gorduras (Haggar & Boushey, 2009). Na última década, registou-se uma diminuição da mortalidade atribuída ao diagnóstico precoce e aos avanços terapêuticos verificando-se em ensaios clínicos uma melhoria da sobrevivência mediana de 6 meses para 2 anos em doentes com CCR metastático (Van Cutsem *et al.*, 2010). Esta melhoria pode ser atribuída à introdução de novos fármacos citotóxicos e biológicos, bem como ao desenvolvimento e à melhoria de novas técnicas de remoção dos tumores pré-invasivos com o auxílio de técnicas de imagem (Van Cutsem *et al.*, 2010).

Em Portugal e na maioria dos países da Europa, é o segundo tipo de cancro mais incidente sendo registados no território português mais de 7 mil (7129) novos casos e perto de 4 mil (3797) mortes por ano. Verifica-se ainda que o CCR é mais comum em homens do que em mulheres e fatal em quase metade dos casos (Sant *et al.*, 2008; Ferlay *et al.*, 2013).

A maior parte dos casos de desenvolvimento de CCR é esporádica; contudo cerca de 30% surge em agregados familiares, e 5 a 10% tem origem hereditária (Kaz & Brentnall, 2006). A progressão da doença envolve várias alterações moleculares e genéticas na mucosa normal do cólon até ao desenvolvimento de cancro. Este processo ocorre ao longo dos anos e causa o aparecimento de pólipos que podem evoluir para carcinomas (Chorost *et al.*, 2004).

Os pólipos são tumores benignos com um potencial maligno variável, considerando-se que mais de 95% dos cancros de CCR surge a partir de pólipos. Segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 87% dos pólipos são tubulares, 8% tubular-vilosos e 5% vilosos. A probabilidade de haver displasia de alto grau e de transformação em carcinoma aumenta com o tamanho do pólipo. Este considera-se em fase avançada quando atinge um diâmetro superior a 1 cm, apresenta uma componente vilosa e displasia de alto grau (Bujanda *et al.*, 2010).

O cólon e o reto compõem quase a totalidade do intestino grosso que é dividido em várias porções: o cego, o cólon ascendente, o cólon transversal, o cólon descendente, o cólon



**Figura 1.** Representação da anatomia do cólon (Seeley *et al.*, 1997).

sigmoide, o reto e o ânus (Figura 1) (Seeley *et al.*, 1997). Os tumores de CCR e pólipos avançados podem desenvolver-se em qualquer região entre o ceco e o reto, e surgem de acordo com a seguinte distribuição: 25% no ceco e cólon ascendente, 20% no cólon transverso e descendente e 55% no cólon sigmoide e no reto (Eisenberg, 2003, Kumar *et al.*, 2005).

### **1.1.1. Incidência do CCR e a dieta**

A incidência de CCR é mais prevalente na América do Norte, Argentina, Austrália, Nova Zelândia, regiões da Europa, Japão e Israel, sendo considerada uma doença ocidental derivada de hábitos de vida. Vários fatores de risco são comumente encontrados nas dietas ocidentais, como elevadas quantidades de proteína animal e de gorduras e reduzidas quantidades de fibras, de frutos e de vegetais. O consumo de carnes vermelhas e processadas está também associado a maior risco de desenvolvimento de CCR (Ganesh *et al.*, 2009).

Em 2009, foi descrito o primeiro estudo caso-controlo de CCR num hospital da Índia, comparando a incidência do CCR na população indiana com os fatores de risco associados a esta neoplasia. É importante salientar que em termos nutricionais a Índia se caracteriza pela dieta vegetariana ao contrário dos países ocidentais. Na Tabela I encontram-se registadas as taxas de incidência de CCR de cidades de vários países e de diferentes regiões do mundo, expressas em ASR (do inglês *age-standardised rate*) por cada 100.000 indivíduos. Observa-se que as taxas variam entre os diferentes países e de local para local dentro do mesmo país, onde as cidades da Índia se destacam com uma taxa de incidência de CCR dez vezes menor, comparativamente com grande parte das cidades de países ocidentais. Curiosamente, neste estudo registaram-se resultados significativos em relação aos hábitos de dieta, indicando uma

redução do risco de CCR para metade em indivíduos com uma alimentação rica em vegetais aquando da comparação com indivíduos com uma dieta não-vegetariana (Ganesh *et al.*, 2009).

**Tabela I.** Taxas de incidência de CCR em cidades de diferentes países (expressas em ASR). As diferenças entre homens e mulheres devem-se à variação do tamanho da amostra entre os dois géneros.

País	Cidade	ASR (por 10 <sup>5</sup> )	
		Homens	Mulheres
França	Bas-Rhin	31,3	16,9
EUA	Nova Jérsei	31,3	23,1
Japão	Hiroshima	59,7	28,0
China	Xangai	11,5	12,0
Índia	Mumbai	3,3	3,0
Índia	Deli	2,5	2,0
Índia	Bangalore	2,4	2,0

Nos Estados Unidos da América, embora as taxas globais de incidência e de mortalidade por CCR estejam a diminuir, tem havido um aumento da taxa de incidência em americanos não-hispânicos (sem origens latinas ou hispânicas) com idades entre os 20 e os 29 anos. Esta tendência parece estar mais relacionada com fatores de risco ambientais e comportamentais, em particular com a difusão de hábitos alimentares pouco saudáveis que podem levar à obesidade precoce. Esta conclusão é também suportada pela descoberta de que o elevado consumo de dietas ocidentais durante o ensino superior está associado a um aumento do risco de adenomas no cólon, precursores do CCR (Nimptsch *et al.*, 2014). Além disso, um vasto estudo epidemiológico da população americana encontrou uma relação inversa entre o consumo de frutos e de vegetais e o risco de CCR (Nomura *et al.*, 2008), verificando-se as mesmas conclusões, mais recentemente, num estudo sobre a população chinesa (Vogtmann *et al.*, 2013).

Ao contrário da dieta ocidental, a dieta mediterrânica é tradicionalmente considerada como um modelo cultural para uma alimentação saudável, que inclui a ingestão diária de frutos e de vegetais frescos, fornecendo uma larga variedade de fibras e de micronutrientes (Fazio & Ricciardiello, 2014). Alguns estudos da *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (EPIC) em diversos países europeus têm indicado que a adesão à dieta mediterrânica



e à maior ingestão de fibras dietéticas tem efeitos protetivos contra o CCR, o que relaciona a incidência de CCR de forma dependente dos componentes da dieta e independente dos fatores populacionais (Murphy *et al.*, 2012). Vários compostos ingeridos através da adoção da dieta mediterrânica têm mostrado potenciais efeitos anticancerígeno, antioxidante e anti-inflamatório, dos quais se destacam vários polifenóis, ácidos gordos ómega-3, fibras dietéticas e vitamina D (Barbaresko *et al.*, 2013; Lucas *et al.*, 2011). A confirmar estes dados, destaca-se um estudo com modelos animais em ratinhos que utilizou dois grupos de animais, um grupo formado por animais sujeitos a uma dieta normal e um grupo formado por animais sujeitos a uma dieta ocidental, caracterizada pelo baixo consumo de fibras, de cálcio e de vitamina D, e pelo alto consumo de gorduras. Os autores testaram um extrato de maçã, rico em polifenóis, e verificaram redução da incidência e dimensão dos tumores em mais de 40%, tanto nos animais controlo como nos animais sujeitos a uma dieta ocidental (Fini *et al.*, 2011; Fazio & Ricciardiello, 2014).

### **1.1.2. Carcinogénese e Eventos Moleculares**

Como foi referido, o desenvolvimento de CCR deve-se à ocorrência, ao longo de muito tempo, de vários eventos moleculares que transformam o epitélio normal em carcinoma.

O aparecimento esporádico do CCR resulta de uma série de mutações somáticas. As alterações genéticas mais comuns envolvem a inativação de genes supressores tumorais e de genes reparadores do DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*) como por exemplo os genes *APC* (do inglês *adenomatous polyposis coli*), *DPC4* (do inglês *deleted in pancreatic cancer locus 4*) e *TP53* e/ou a ativação de oncogenes, dos quais a família *RAS* é a mais descrita (Hope *et al.*, 2005). O facto de alguns pólipos não evoluírem para cancro torna clara a existência de outros fatores que influenciam a sua transformação em pólipos malignos. A crescente evidência do papel da inflamação tem mostrado a importância da microflora do cólon na patogénese (Hope *et al.*, 2005). Este efeito observa-se aquando da inflamação crónica do intestino, que ocorre em algumas doenças intestinais, como é o caso da colite ulcerosa ou da doença de Crohn (Itzkowitz & Yio, 2004). Os tumores podem surgir em qualquer parte do epitélio do cólon. A grande maioria dos casos de CCR esporádico ocorre sobretudo no cólon descendente, incluindo o ângulo esplénico, a sigmoide e o reto (Hope *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de CCR com origem hereditária ocorre essencialmente em indivíduos com a síndrome de *Lynch*, conhecida como cancro hereditário não-polipoide do cólon (HNPCC, do inglês *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) e caracterizada pela presença

de mutações em genes reparadores do DNA, ou em indivíduos com polipose adenomatosa familiar (FAP, do inglês *familial adenomatous polyposis*), caracterizada pelo aparecimento de pólipos devido à mutação do gene *APC* (Lynch & La Chapelle, 2003). Os indivíduos com FAP desenvolvem um grande número de adenomas numa idade relativamente jovem e, se deixados sem tratamento, a maioria desenvolve CCR ao atingir os 40 anos de idade (Weitz *et al.*, 2005).

A nível molecular podem considerar-se duas vias principais interligadas no desenvolvimento do CCR: a via *gatekeeper* e a *caretaker*. A via *gatekeeper* envolve a disrupção de genes que regulam o crescimento, como o gene supressor tumoral *APC*, e abrange cerca de 85% dos CCR esporádicos. Por sua vez, a via *caretaker* envolve a disrupção de genes que mantêm a estabilidade genómica, como no caso da síndrome de *Lynch*, e abrange cerca de 15% dos CCR esporádicos (Weitz *et al.*, 2005). A maioria dos casos de CCR é caracterizada por uma desregulação funcional na via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, devido a uma mutação no gene *APC*. A proteína *APC* não-funcional deixa de participar na formação de um complexo que regula os níveis da  $\beta$ -catenina no citoplasma, levando a que esta se acumule no núcleo da célula. Uma vez no núcleo, a  $\beta$ -catenina serve como coativadora para a família de fatores de transcrição Tcf (do inglês *T-cell factor*) que, por sua vez, ativam a promoção de genes específicos, causando a expressão de algumas metaloproteinases, responsáveis pela degradação da matriz extracelular e a ativação de oncogenes, como o *C-MYC* (do inglês *myelocytomatosis cell oncogene*) (Fanali *et al.*, 2014). Além disso, a proteína *APC* está envolvida na regulação da migração celular, no bloqueio do ciclo celular e na adesão celular, através do complexo E-caderina/ $\beta$ -catenina. Estas funções ficam comprometidas aquando da mutação do gene *APC*, promovendo a formação de pólipos nas criptas do epitélio do cólon. Os mesmos eventos são induzidos com mutações no gene que codifica a  $\beta$ -catenina, um caso também frequente (El-Bahrawy *et al.*, 2004).

### **1.1.3. Diagnóstico, Estadiamento e Tratamento**

Atualmente, o CCR é detetado através de rastreio ou quando o doente apresenta sintomas que podem incluir hemorragia retal, alteração dos hábitos intestinais e dores abdominais (Smith *et al.*, 2006). A deteção precoce melhora a taxa de sobrevivência dos doentes, pois pólipos pré-malignos ou pequenos tumores podem ser removidos e tratados, o que torna o diagnóstico uma medida preventiva. Como é evidente, indivíduos com alto risco de desenvolver CCR, isto é, doentes com história familiar de CCR ou doentes com doenças inflamatórias intestinais, devem ter um acompanhamento clínico frequente (Chorost *et al.*, 2004). A melhoria da probabilidade de sobrevivência dos doentes depende do estágio do

cancro aquando do diagnóstico. Em Portugal, o estadiamento é normalmente feito de acordo com a classificação TNM da *American Joint Committee on Cancer (AJCC/TNM)* (Norma da Direção-Geral da Saúde, 2013), que avalia a dimensão tumoral, o número de metástases em gânglios linfáticos e a presença de metástases proximais e à distância. No estágio 0, os pólipos pré-malignos encontram-se na mucosa do cólon, sendo o estágio 1, o que marca o aparecimento do tumor na mucosa e na submucosa. No estágio 2, ocorre um alastramento para a camada muscular podendo haver uma invasão da serosa e dos tecidos proximais. O estágio 3 caracteriza-se pela invasão de gânglios linfáticos e, por último, o estágio 4 pela ocorrência de metástases à distância. Infelizmente, apenas 25 a 35% dos doentes de CCR são diagnosticados em estágio 1 e 2, sendo as taxas de sobrevivência 5 anos após o diagnóstico de 90% e 75%, respetivamente, o que revela a importância da deteção precoce (National Cancer Institute, 2015).

O tratamento do CCR depende da localização do tumor e do estágio da doença. Usualmente, um doente é submetido a uma combinação de tratamentos, sendo a cirurgia de ressecção o tratamento padrão nos estádios iniciais. Outras estratégias utilizam a quimioterapia neoadjuvante e/ou adjuvante quando o diagnóstico é feito num estágio tardio da doença. No tratamento de quimioterapia de primeira linha são administradas fluoropirimidinas por via intravenosa ou oral. Esta administração ocorre usualmente com a combinação de 5-fluorouracilo (5-FU), de leucovorina (LV) e de oxaliplatina, ou uma combinação entre 5-FU, LV e irinotecano. No tratamento do CCR metastático é utilizado o cetuximab, um anticorpo monoclonal dirigido ao EGFR (do inglês *epidermal growth factor receptor*). A quimioterapia é um tratamento também combinado com a radioterapia, sendo esta última utilizada principalmente quando o tumor se localiza no reto (Chorost *et al.*, 2004).

## **1.2. Radioterapia**

A radioterapia é uma abordagem terapêutica altamente eficaz no tratamento do cancro e tem vindo a tornar-se significativamente mais sofisticada na última década. Estima-se que 4 em cada 10 doentes com taxas de sucesso na irradiação da doença tiveram sessões de radioterapia durante o seu tratamento e que 16% de todas as curas podem ser totalmente atribuídas a este tipo de tratamento (Cancer Research UK, 2015).

A estratégia desta terapêutica consiste na utilização de radiação ionizante para destruir as células tumorais e diminuir as dimensões dos tumores. A radiação pode ser administrada através de uma fonte externa ao corpo do doente (radioterapia externa ou telerradioterapia) ou através da implantação de fontes radioativas seladas numa zona próxima da região a ser

tratada (radioterapia interna ou braquiterapia) (National Cancer Institute, 2015; Cancer Research UK, 2015).

A radioterapia visa a eliminação de todas as células tumorais inclusivamente as células estaminais tumorais (CET). Este resultado seria mais fácil de alcançar se os tecidos saudáveis junto à zona irradiada não limitassem a dose de radiação que pode ser administrada. A eficácia da radioterapia é, por isso, determinada pela razão entre os danos nos tecidos tumorais e os danos nos tecidos saudáveis envolventes. Aquando da irradiação dos tecidos há vários fatores que influenciam a resposta das células tumorais e das células normais à radiação, tais como o tempo de duplicação celular, o estado de oxidação do tumor, o número de células estaminais e a radiosensibilidade intrínseca ao tipo de tecido (Tabarestani & Ghafouri-Fard, 2012).

A constante evolução da radioterapia tem levado ao desenvolvimento de novas tecnologias que permitem irradiar os tumores com maior precisão, reduzindo a irradiação dos tecidos saudáveis, o que melhora os resultados terapêuticos e reduz os eventuais efeitos adversos para o doente (Cancer Research UK, 2015). Recentemente, tem-se vulgarizado o conceito de radioterapia avançada, que define a utilização de tecnologias que permitem não só visualizar e monitorizar o tumor e os tecidos adjacentes em tempo real, mas também adaptar e modular as doses de radiação administradas tendo em conta o volume e a forma tridimensional do tumor assim como as deformações que ocorrem durante o tratamento, devidas à respiração e ao movimento normal dos órgãos internos (Cancer Research UK, 2015). Algumas destas tecnologias são a VMAT (do inglês *volumetric modulated arc therapy*), a qual permite distribuições circunscritas da dose melhorando a cobertura do volume alvo e preservando os tecidos normais num intervalo de tratamento menor (Teoh *et al.*, 2011), e a 4D-ART (do inglês *4D adaptive radiotherapy*), que tem em conta as três dimensões físicas mais a quarta dimensão, o tempo, a qual determina mudanças na forma durante a administração da dose, sincronizando o movimento do alvo com o feixe de radiação em tempo-real (Li *et al.*, 2008). Apesar dos vários avanços na radioterapia, o ritmo de adoção das novas inovações nos centros clínicos é bastante inconsistente levando a que o acesso destes serviços pelos doentes seja desigual. Não obstante, os doentes devem ser aconselhados na escolha do tratamento mais apropriado, pois certas técnicas são mais adequadas a determinados tipos de tumores e condições do que outras (Meyer *et al.*, 2007; Cancer Research UK, 2015).

A radioterapia no CCR começou por ser aplicada como uma terapia neoadjuvante devido à sua capacidade de regredir o estágio e permitir uma resseção cirúrgica mais fácil (Mohiuddin *et al.*, 2000). O tratamento de tumores com radiação nas regiões proximal e distal do cólon não é comum, mas é bastante frequente nos tumores das regiões da sigmoide e do reto (Cancer Research UK, 2015). Atualmente, a combinação de quimioterapia com

radioterapia é um procedimento comum, podendo ser ainda necessária uma excisão total do mesorreto em doentes com CCR avançado. Este procedimento consiste na disseção precisa do reto e de todos os gânglios linfáticos pararretais e resulta nas menores taxas de recorrência local, especialmente quando combinado com radioterapia neoadjuvante. Um segundo benefício é o facto de poder haver preservação do esfíncter anal e diminuição dos casos de ostomia permanente (Phang *et al.*, 2004).

A radioterapia pode causar efeitos adversos agudos durante o tratamento e efeitos adversos crónicos que surgem alguns meses após o tratamento ter terminado. Os efeitos adversos que se desenvolvem dependem da zona do corpo que é tratada, da dose de radiação administrada e de outros tratamentos recebidos pelo doente ao mesmo tempo (Cancer Research UK, 2015). No CCR, a maioria dos efeitos adversos agudos prolongam-se por uma ou duas semanas após o tratamento terminar. Os mais comuns são astenia, náuseas, vómitos, diarreia, sangue nas fezes e alteração da mobilidade intestinal, disúria e polaquiúria (Stephens *et al.*, 2010). Os efeitos adversos crónicos da radioterapia no CCR englobam as cistites e as enterites rádicas (Dietz, 2013). Outros incluem a disfunção sexual e urinária. De modo a diminuir o impacto destes efeitos nos doentes é classificado o estadiamento para a aplicação da terapia neoadjuvante (Bensignor *et al.*, 2015).

### **1.2.1. Fundamentos da Radiação Ionizante e Resposta Celular**

No tratamento do cancro são utilizados vários tipos de radiação ionizante que incluem raios-X, raios gama ou partículas carregadas. O principal alvo biológico da radiação é o DNA como resultado de efeitos diretos ou indiretos. Os efeitos diretos referem-se às interações diretas da radiação com macromoléculas como o DNA, o RNA, proteínas e outros. Os efeitos indiretos dizem respeito à ionização ou à excitação da molécula de água nas células levando à formação de radicais livres que provocam indiretamente dano no DNA (Baskar *et al.*, 2012). Estes radicais poderão ser ROS (do inglês *reactive oxygen species*) ou RNS (do inglês *reactive nitrogen species*) que danificam o DNA pela formação de quebras únicas numa das cadeias de DNA (SSB, do inglês *single-stranded breaks*) ou quebras nas duas cadeias de DNA (DSB, do inglês *double-stranded breaks*). Algumas enzimas celulares têm a capacidade de reparar eficientemente as SSB. Contudo, a reparação de DSB é menos comum ou mesmo impossível, ativando-se assim a morte celular. A interação direta da radiação com as bases do DNA pode também causar danos nas próprias bases contribuindo para a complexidade na reparação (Smith *et al.*, 2009). O efeito direto da radiação ocorre por duas vias. A primeira é pela ionização direta do DNA. A segunda é pela ionização dos átomos fortemente ligados ao DNA

e pela transferência rápida desse dano para o DNA. Apesar do último ser fisicamente um efeito indireto, as lesões provocadas no DNA são indistinguíveis das lesões diretas (Swarts *et al.*, 2007).

Além destes efeitos, a radiação pode também induzir o efeito *bystander* e a resposta adaptativa que parecem coordenar a resposta das populações celulares para que as células não expostas à radiação também respondam aos seus efeitos. Estes efeitos parecem saturar em doses baixas e levam à rutura da relação dose-resposta que domina em doses elevadas (Mothersill & Seymour, 2004). O efeito *bystander* consiste na transmissão dos efeitos da radiação a células não expostas através de sinais celulares libertados pelas células vizinhas irradiadas (Hei *et al.*, 2015). A resposta adaptativa é um efeito normalmente observado depois da exposição de células a doses baixas de radiação. Após uma primeira dose de radiação, a administração de uma segunda dose, mesmo mais elevada, resulta num efeito biológico reduzido (Bonner, 2003). As respostas adaptativas podem também estimular sistemas de proteção celular contra a acumulação de danos no DNA (Mullenders *et al.*, 2009). Ambos os fenómenos podem ser vistos como potenciais modificadores dos efeitos da irradiação com doses baixas. Contudo, são necessários mais estudos para a compreensão dos mecanismos envolvidos nestes processos (Mullenders *et al.*, 2009).

### **1.2.2. Resposta dos Tecidos à Radiação**

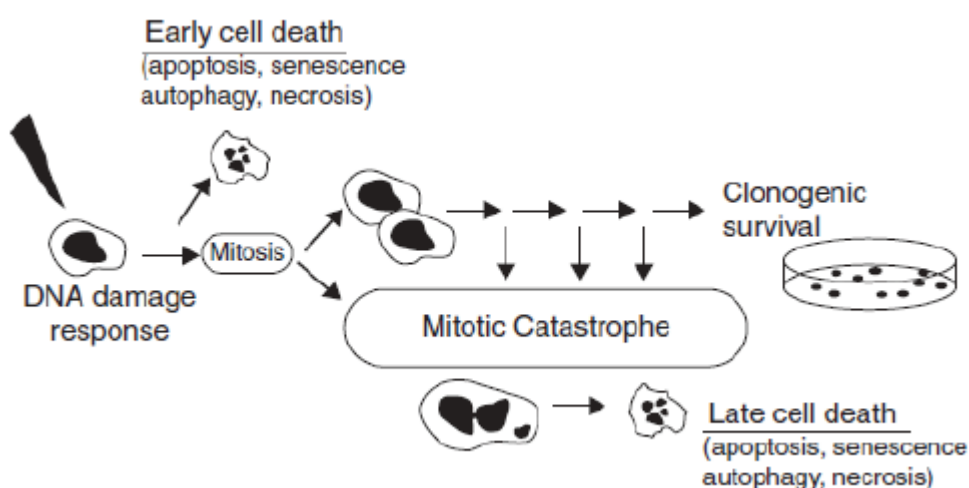
Os efeitos da radiação ionizante podem levar a danos potencialmente letais ou subletais em estruturas vasculares e perivasculares, em tecidos normais e nas células. Os tumores bem vascularizados são mais sensíveis à radiação, enquanto estruturas tumorais com uma fraca oxigenação mostram-se mais resistentes à radiação (Vaupel & Mayer, 2007).

A exposição a radiação ionizante provoca a regressão do tumor mas, posteriormente, pode ocorrer recorrência tumoral. Nas células, a resposta ao dano no DNA está relacionada com a radiosensibilidade, o tipo de morte induzido e o momento em que esta ocorre. Esta resposta manifesta-se de maneiras distintas nas células normais e nas células tumorais. Após a irradiação, desencadeiam-se vários processos de morte celular que podem tornar as células incapazes de formar colónias (Joiner & Kogel *et al.*, 2009). Contudo, alguns estudos descreveram que a repopulação celular nos tecidos normais é acompanhada pela repopulação de células tumorais sobreviventes. Esta repopulação das células tumorais sobreviventes consiste na proliferação de células tumorais capazes de formar colónias (Kim & Tannock, 2005).

A morte celular pode classificar-se como precoce ou tardia, dependendo do momento em que a célula morre. A morte celular precoce resulta principalmente da ativação de vias induzidas pelos danos da radiação, como a ativação da apoptose em poucos minutos. A morte celular tardia ocorre quando a célula tenta iniciar um processo mitótico. Neste caso, os danos no DNA são incapazes de induzir apoptose, ainda que esteja presente a proteína P53 e sejam ativadas outras vias pro-apoptóticas (Joiner & Kogel *et al.*, 2009).

A nível molecular, a resposta ao dano no DNA envolve várias vias de sinalização interligadas que controlam e determinam o futuro da célula, dependendo do dano causado. As moléculas sensíveis que identificam o dano no DNA emitem um sinal que ativa a morte celular, a reparação do DNA ou o bloqueio temporário do ciclo celular (Joiner & Kogel *et al.*, 2009). A proteína P53 desempenha uma função protetora do genoma da célula pois está envolvida na reparação do DNA, na apoptose e na regulação do ciclo celular, prevenindo a proliferação de células com o gene da proteína mutado. Um dos efeitos principais após a sensibilização ao dano é a ativação do gene *TP53* que regula outros genes que, por sua vez, controlam os *checkpoints* da divisão celular e a morte celular programada por apoptose. Deste modo, a ativação da P53 leva à interrupção do ciclo celular com consequente promoção da apoptose (Joiner & Kogel *et al.*, 2009). Quando ocorre a perda da função da P53, a ativação do *checkpoint* na fase G1 e a indução da apoptose são anuladas, o que se reflete por uma acumulação de mutações e maior agressividade tumoral (Balça-Silva *et al.*, 2012). A ativação da P53 induz também a expressão da proteína P21, que impede as células de entrarem na fase S do ciclo celular, pelo que estas duas proteínas estão diretamente envolvidas no controlo do *checkpoint* G1/S em resposta à radiação ionizante (Chang-Claude *et al.*, 2009). A apoptose é um tipo de morte celular determinante que resulta na destruição programada da célula após a ocorrência de danos no DNA, aumento do stresse oxidativo ou como defesa contra a carcinogénese (Joiner & Kogel *et al.*, 2009). Os efeitos da radiação levam também à indução da apoptose pela ativação das vias intrínseca e extrínseca. A ativação da via intrínseca resulta sobretudo da ativação da proteína ataxia telangiectasia cinase mutada (ATM), que estabiliza a P53, desregulando o balanço entre proteínas pró e anti-apoptóticas. Esta desregulação induz a ativação da caspase 9, uma molécula sensibilizadora que promove a morte celular por apoptose (Sluyser, 2005; Fridman & Lowe, 2003). A via extrínseca pode ser ativada pelo *clustering* dos recetores de morte DR4 (do inglês *death receptor 4*) e DR5 do ligando TRAIL (do inglês *TNF-related apoptosis-inducing ligand*), membro da família TNF (do inglês *tumor necrosis factor*), resultando na formação do complexo sinalizador de morte induzida (DISC, do inglês *death-inducing signaling complex*). Consequentemente ocorre a ativação da caspase 8 que também promove a morte celular por apoptose (Sluyser, 2005).

Além da apoptose, há outras consequências da ação da radiação que podem contribuir para a perda da capacidade clonogênica: a autofagia, a senescência e a necrose. A autofagia consiste na digestão de alguns componentes celulares pelas células e a sua ocorrência tem sido descrita após o tratamento com radiação (Joiner & Kogel *et al.*, 2009). A senescência ocorre quando a radiação torna as células incapazes de realizar a divisão celular, sendo uma barreira à proliferação tumoral. A necrose é um processo de morte desordenada e irreversível que ocorre devido a alterações extremas de pH, perda de energia e desequilíbrio iônico. Ademais, quando os danos no DNA não são corrigidos eficientemente, as células irradiadas sofrem outros fenômenos, como a catástrofe mitótica que se caracteriza pela incapacidade de terminar corretamente a mitose após a exposição à radiação, impedindo assim a proliferação. A catástrofe mitótica pode ainda provocar danos no DNA ativando, conseqüentemente, outros tipos de morte celular (Joiner & Kogel *et al.*, 2009). A Figura 2 ilustra os diferentes tipos de morte celular causados pela radiação.



**Figura 2.** Esquema representativo da morte celular após exposição a radiação (Joiner & Kogel *et al.*, 2009).

### 1.2.3. Radiorresistência no CCR

A resistência à radioterapia é um dos problemas principais que afeta a eficácia do tratamento do cancro. Como foi referido, a resposta das células normais e das células tumorais à radiação é influenciada por vários fatores. Quando a dose total de radiação é administrada em séries de pequenas frações, as células sobreviventes podem ter tempo de proliferar entre as várias exposições (Meyn *et al.*, 1996). O grau de hipoxia dos tecidos é importante pois a pressão parcial de oxigênio afeta diretamente a radiosensibilidade das células. A existência de um grande número de células estaminais pode também ser responsável pela sobrevivência do



tecido. Além disso, há características genéticas intrínsecas das células que influenciam a sua resposta à radiação como a suscetibilidade das células aos danos no DNA e a capacidade de reparar esses danos. Por isso, a eficácia terapêutica deve depender das diferenças entre os vários parâmetros nos dois tipos de tecido (Meyn *et al.*, 1996). Ainda assim, a resposta dos tumores de CCR é favorável pois pode observar-se uma regressão parcial ou mesmo completa na altura da cirurgia (Chen *et al.*, 2010).

A modificação pós-translacional das histonas é um dos mecanismos de alteração da expressão de genes e do fenótipo celular sem ocorrerem modificações a nível da sequência de DNA. Estas modificações incluem a acetilação, a metilação, a ubiquitinação e a fosforilação de histonas e, além de serem importantes na formação e progressão tumoral, podem levar à resistência das células ao tratamento (Jones *et al.*, 2007). Mais especificamente, a acetilação de histonas é regulada por ações opostas das histona acetiltransferases (HAT) e das histona deacetilases (HDAC). A atividade das HAT relaxa a cromatina e permite que vários fatores de transcrição interajam com o DNA, promovendo a transcrição. Em contraste, a atividade das HDAC condensa a cromatina, prevenindo o acesso dos fatores de transcrição, o que resulta numa repressão da transcrição. Além disso, a inatividade das HAT e a elevada atividade das HDAC tem sido associada ao processo de carcinogénese e à resistência tumoral (Marks *et al.*, 2004).

Atualmente já se conhecem muitas moléculas e vias de sinalização que influenciam a sensibilidade e a resistência das células à radiação, embora a maior parte dos mecanismos inerentes à radiorresistência das células tumorais continuem desconhecidos. A pesquisa e a identificação de novos alvos moleculares que possam sensibilizar o CCR tem sido crescente e é de extrema importância para melhorar a eficácia do tratamento (Spitzner *et al.*, 2010).

Recentemente, um estudo colocou a hipótese de doentes com cancro na região retal, cujo tumor regrediu totalmente após a radioterapia, não necessitarem de ser submetidos a cirurgia. Este estudo reforça a relevância da identificação de características tumorais mais preditivas da resposta tumoral à radiação (Qiu *et al.*, 2000). Outro estudo identificou genes que influenciam a sensibilidade da quimiorradioterapia. A análise de perfis de expressão de genes confirmou a relevância da via de sinalização intracelular MAPK (do inglês *mitogen-activated protein kinase*), bem como da insulina e da Wnt, associada à proliferação celular, no processo de carcinogénese. Além disso, alguns genes são referidos como potenciais alvos para sensibilizar células tumorais resistentes, como o gene *STAT3* (do inglês *signal transducer and activator of transcription 3*) que regula a expressão de genes mediadores da proliferação e da sobrevivência celulares, incluindo a survivina e a ciclina D1, e o gene *RASSF1* (do inglês *Ras association domain-containing protein 1*) que se correlaciona negativamente com a

quimiorradioresistência pela perda da função da proteína RASSF1 que diminui a resposta das células ao dano no DNA (Spitzner *et al.*, 2010).

Outros autores referem que proteínas relacionadas com a apoptose podem ser marcadores preditivos da regressão tumoral e da sobrevivência do doente após o tratamento de quimiorradioterapia no cancro retal (Rödel *et al.*, 2005). A família de proteínas BCL-2 tem um papel importante na capacidade da célula entrar em apoptose após irradiação, tendo sido verificado que a expressão de fatores anti-apoptóticos está muito associada a tumores radorresistentes (Nix *et al.*, 2005). Consequentemente, a inibição da BCL-2 e a restauração da via de sinalização da P53 representam uma estratégia promissora para superar a radorresistência das células tumorais (Balça-Silva *et al.*, 2012).

A existência de desequilíbrios entre as ROS e os mecanismos de defesa antioxidantes é outra condicionante da resposta tumoral ao tratamento. Outros autores mostram que a peroxirredoxina I aumenta a resistência ao stresse oxidativo e está sobreexpressa em cancros retais. Porém, o silenciamento desta enzima conduz a um aumento da sensibilidade à radiação ionizante (Chen *et al.*, 2010).

Como foi referido anteriormente, a capacidade de reparação de danos no DNA pode influenciar a resposta à radioterapia (Lamas *et al.*, 2012). A hipoxia tumoral pode desencadear resistência ao privar as células de oxigénio, o qual é essencial para levar a cabo os efeitos indiretos da radiação ionizante. Deste modo, ocorre a estimulação de fatores de sobrevivência angiogénicos e tumorais com aumento da proliferação, da radorresistência e da angiogénese (Smith *et al.*, 2006).

A desregulação da sinalização do EGFR é outro mecanismo comum de resistência a agentes citotóxicos pois esta proteína é importante no crescimento tumoral regulando a proliferação celular, a angiogénese, a invasão e a metastização. Outro estudo associou os níveis elevados de EGFR com uma diminuição da capacidade de regressão tumoral pela radioterapia (Milas *et al.*, 2004).

Nas células tumorais do CCR pode ser comum a ocorrência de alterações genéticas do gene *TP53*, o que também contribui para a resistência ao tratamento. A P21 também é um marcador de radiosensibilidade tumoral em doentes com cancro retal pois está diminuída nas células tumorais que resistem à radioterapia (Qiu *et al.*, 2000).

Recentemente surgiu uma nova explicação da radorresistência tumoral que consiste no facto de existir uma subpopulação de células estaminais tumorais, ou CET, intrinsecamente mais resistentes a múltiplas terapias. Além disso, os tratamentos podem causar a expansão de mutações genéticas e alterações epigenéticas adicionais adquirindo resistência à terapia (Rycaj & Tang, 2014). Esta hipótese postula a existência de uma pequena população de células

tumorais que gera e mantém uma hierarquia celular intra-tumoral. Esta pequena população de células tumorais tem a capacidade de se auto-renovar e de proliferar em massa, levando à diferenciação em células tumorais maduras (Reya *et al.*, 2001). Uma implicação direta desta hipótese é a coexistência de diferentes populações celulares com propriedades distintas no mesmo tumor, sendo as CET responsáveis por essa heterogeneidade comumente observada nos tumores na clínica. Um aspeto importante das CET é a resistência a agentes quimioterapêuticos bem como ao tratamento com radiação (Jordan *et al.*, 2006). O mecanismo de radiorresistência das CET, em comparação com as restantes células tumorais, parece estar relacionado com uma melhor capacidade de reparação do DNA e defesa das ROS e ainda com o potencial de auto-renovação. Certamente, as CET mostram ser mais radiorresistentes do que as restantes células tumorais e, por isso, acredita-se que sejam responsáveis por tratamentos sem sucesso e pela recorrência tumoral (Hittelman *et al.*, 2010; Rycaj & Tang, 2014).

#### **1.2.4. Terapias Combinadas**

A quimioterapia associada à radioterapia no CCR tem como principal objetivo tornar as células mais sensíveis à radiação ionizante (Cancer Research UK, 2015). Nos últimos anos, têm sido publicados muitos estudos sobre o uso de substâncias químicas que possam modificar a resposta das células à radiação, denominadas como radiosensibilizadores e/ou radioprotetores. Os radiosensibilizadores são fármacos que podem tornar as células tumorais mais sensíveis aos efeitos da radiação, por exemplo o 5-FU ou a cisplatina (Cancer Research UK, 2015). Estes compostos aparentemente promovem a fixação de radicais livres produzidos pela radiação ionizante, impedindo a reparação de danos celulares (Raviraj, 2014). Os radioprotetores são fármacos que protegem os tecidos normais dos danos causados pela radiação. Estes fármacos promovem também a reparação das células normais expostas à radiação. Os fármacos radiosensibilizadores mais utilizados são o 5-FU e a capecitabina, um pró-fármaco convertido enzimaticamente em 5-FU no corpo humano (Cancer Research UK, 2015).

Por outro lado, como referido, a radiorresistência tumoral tem sido associada à sobreexpressão de HDAC em certos tipos de cancro, incluindo o CCR (Brown *et al.*, 2003). A sobreexpressão de HDAC leva à inativação da transcrição da cromatina, que pode resultar na desregulação de genes supressores tumorais e de genes reparadores do DNA. Contudo, este processo é reversível e, por essa razão, as HDAC são um potencial alvo terapêutico. Os inibidores das HDAC (HDACi) são uma nova terapêutica epigenética emergente que tem

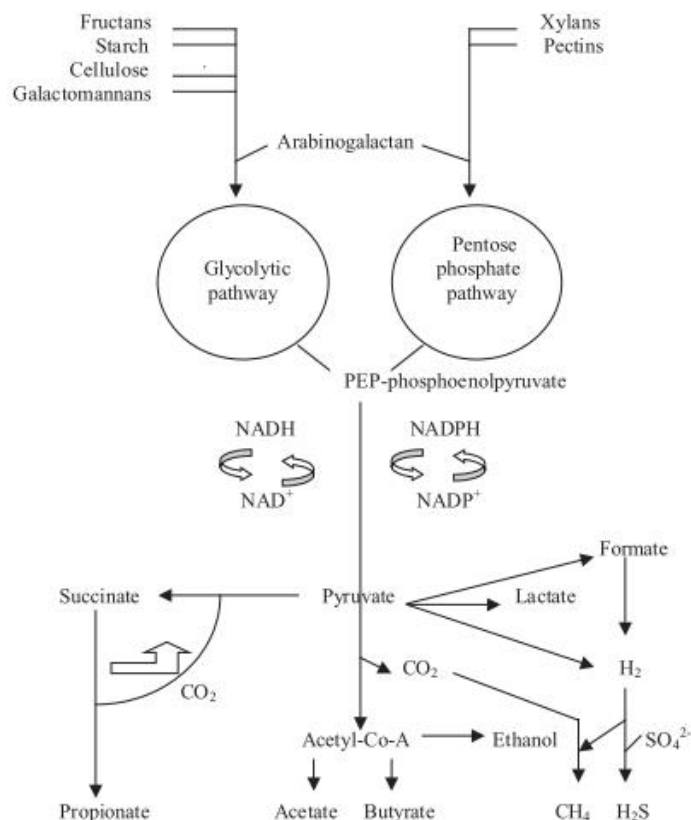
demonstrado efeitos anticancerígenos promissores, em particular pelo efeito radiosensibilizador quando administrados em combinação com radioterapia (Groselj *et al.*, 2013). O mecanismo exato pelo qual um HDACi induz radiosensibilização dos tumores continua por determinar e pensa-se que possa estar ligado à prevenção do processo de reparação dos danos no DNA. Além disso, o melhor conhecimento do mecanismo de ação vai permitir uma utilização mais efetiva e segura dos HDACi em combinação com a radiação e ajudar a determinar o tempo ideal para a administração do fármaco relativamente ao tratamento com radiação, de forma a maximizar o efeito terapêutico da combinação (Shabason *et al.*, 2011).

### 1.3. Fibra Dietética e o Butirato

Como foi referido anteriormente, as fibras dietéticas são encontradas nos vegetais e nos frutos e são compostas por polissacarídeos resistentes à hidrólise pelas enzimas digestivas humanas, podendo ser classificadas como fibras solúveis ou insolúveis. Durante o processo digestivo estas fibras vão originar substratos que são fermentados pelas bactérias do cólon, com produção de ácidos gordos de cadeia curta (SCFA, do inglês *short-chain fatty acids*). Este processo é essencial para a manutenção da microflora do cólon e para a estimulação do sistema imunitário (Saura-Calixto, 2011; Kunzmann *et al.*, 2015).

Os SCFA apresentam uma cauda alifática constituída por dois a seis átomos de carbono (Cummings & Macfarlane, 1991). Os principais SCFA formados são o acetado, o propionato e o butirato. Estes compostos têm mostrado potenciais propriedades anticancerígenas e vários estudos clínicos mostram que estão associados à melhoria e ao tratamento da diabetes, da hipercolesterolemia, de doenças cardiovasculares e de doenças gastrointestinais (Saura-Calixto, 2011; Hijova & Chmelarova, 2007; Floch & Hong-Curtiss, 2001). Além disso, o aumento do consumo de fibras dietéticas que levam à formação de SCFA está associado à diminuição do risco de CCR, à redução do tempo de trânsito gastrointestinal e ao equilíbrio do pH, o que pode conduzir à diluição de agentes carcinogêneos e, deste modo, minimizar a exposição do epitélio do cólon (Kunzmann *et al.*, 2015).

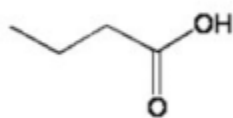
Os SCFA são produzidos principalmente através da fermentação de polissacarídeos, oligosacarídeos, proteínas, péptidos e glicoproteínas por bactérias sacarolíticas no cólon. A fermentação bacteriana envolve duas vias metabólicas que levam à produção de SCFA, de gases e de energia. Tanto a via glicolítica como a via das pentoses conduzem à formação de piruvato e, dependendo da bactéria, originam um dos SCFA (Figura 3) (Hijova & Chmelarova,



**Figura 3.** Vias básicas da produção de metabolitos de SCFA pela fermentação de bactérias do cólon (Hijova *et al.*, 2007).

2007). Este processo de fermentação ocorre principalmente no cólon proximal onde os níveis de produção e a absorção de SCFA são também mais elevados. Ao longo do intestino, a fermentação vai decrescendo devido à redução de substrato levando a uma diminuição da absorção de SCFA pelas células do cólon distal (Besten *et al.*, 2013). Dependendo da dieta, a concentração total dos SCFA pode variar entre os 70 e os 140 mM no cólon proximal, com redução para valores entre os 20 e os 70 mM no cólon distal (Cummings *et al.*, 1987; Velazquez *et al.*, 1997; Saemann *et al.*, 2002). No entanto, as razões molares de acetato, de propionato e de butirato ao longo do cólon são em média 60:20:20. É interessante verificar que a absorção de SCFA é menor na zona terminal do cólon, onde também é registada uma maior incidência de tumores. É de realçar que menos de 5% dos SCFA, obtidos pela dieta, aparecem nas fezes, o que demonstra a importância destes bioproductos na manutenção do microambiente do cólon (Topping & Clifton, 2001). O acetato e o propionato são menos necessários às células do cólon, pelo que são depois transportados em parte para o fígado através da veia porta (Cook & Sellin, 1998; Cummings *et al.*, 1987).

Dos três SCFA principais, o butirato destaca-se por ter uma função essencial no metabolismo celular e na manutenção da homeostasia do epitélio do cólon, sendo também a principal fonte de energia destas células (Hamer *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Estrutura química da molécula de butirato (Dashwood *et al.*, 2006).

O butirato é constituído por uma cauda hidrofílica com 4 átomos de carbono (Figura 4) (Hamer *et al.*, 2008). Este SCFA tem vários papéis reguladores no cólon dos quais se destacam a promoção do crescimento do tecido epitelial normal, a inibição da carcinogénese, a inibição da inflamação e do stresse oxidativo e ainda a estimulação do aumento do fluxo sanguíneo e da motilidade, reduzindo o desconforto e as dores intestinais (Hamer *et al.*, 2008; Guilloteau *et al.*, 2010). Este efeito inibitório do crescimento tumoral tem sido atribuído à capacidade do butirato inibir a atividade das HDAC, alterando a expressão de vários genes (Davie, 2003; Encarnação *et al.*, 2015).

A taxa e a quantidade de butirato a ser produzida ao longo do lúmen do cólon depende da estrutura química da fibra dietética, principalmente da solubilidade e do grau de polimerização. As fibras mais solúveis são altamente fermentáveis e as que produzem maiores quantidades de butirato (Hamer *et al.*, 2008; Sengupta *et al.*, 2006).

### **1.3.1. Butirato no CCR**

O butirato influencia vários processos importantes envolvidos na carcinogénese. A maior parte dos casos de CCR são diagnosticados no cólon distal. É nesta região onde a concentração de butirato é menor tendo em conta o seu gradiente decrescente ao longo do cólon (Comalada *et al.*, 2006). Esta constatação, aliada ao facto de dietas pobres em fibra dietética serem um fator de risco, leva a supor que o butirato tem um papel relevante a nível da prevenção e do tratamento do CCR. Além disso, vários estudos confirmaram o efeito anti-tumoral do butirato em células tumorais do cólon pela inibição da proliferação, pela indução da apoptose e pela promoção de um fenótipo mais diferenciado (Comalada *et al.*, 2006; Encarnação *et al.*, 2015).

No CCR, o butirato inibe a proliferação celular principalmente através do bloqueio do ciclo celular na fase G1/S, induzindo uma diminuição da expressão de proto-oncogenes como o *C-MYC*, e na fase G2/M (Abramova *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 1999). Para além disso, o butirato induz a apoptose celular interferindo com várias vias metabólicas ligadas à família de proteínas BCL-2, nomeadamente com o aumento da expressão de BAX e de BAK, proteínas pró-apoptóticas (Pajak *et al.*, 2008; Encarnação *et al.*, 2015). Este SCFA intervém ainda na

angiogénese, um processo fundamental para o crescimento, invasão e metastização dos tumores através da diminuição dos níveis de VEGF (do inglês *vascular endothelial growth factor*). Por esta razão, tem sido sugerido como inibidor da angiogénese tumoral (Gonçalves & Martel, 2013). Além disso, o butirato diminui o potencial metastático e invasivo das células tumorais, diminuindo a atividade de metaloproteinases e outros genes associados à metastização (Encarnação *et al.*, 2015).

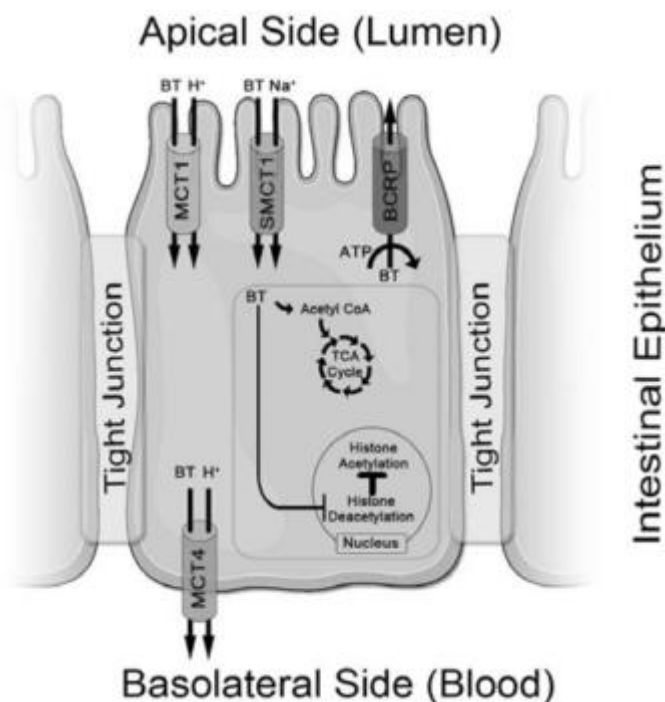
O stresse oxidativo tem o potencial de afetar várias vias de carcinogénese e está envolvido no processo de transformação maligna nas células normais e na proliferação das células tumorais iniciais. Curiosamente, o butirato inibe o stresse oxidativo pelo aumento da defesa antioxidante glutationa (GSH) e pela produção de glutationa-S-transferase, enzima responsável por processos de desintoxicação celular (Ebert *et al.*, 2003). Outro aspeto interessante é o facto de o butirato reduzir a metilação da região promotora do gene *hMLH1* (do inglês *human mutL homolog 1*), ligado à reparação de erros no DNA (Dronamraju *et al.*, 2008), e de aumentar a acessibilidade do DNA a enzimas de reparação da cromatina (Rosignoli *et al.*, 2001).

Este efeito aparentemente oposto do butirato entre a promoção da proliferação das células normais e a inibição da proliferação das células tumorais tem sido referido como o *paradoxo do butirato* e é pouco entendido (Comalada *et al.*, 2006). Contudo, as diferenças no transporte e no metabolismo do butirato entre as células normais e as células tumorais podem contribuir para este paradoxo (Hofmanová *et al.*, 2009).

### **1.3.2. Transporte e Metabolismo do Butirato**

O butirato é preferencialmente absorvido na região proximal do cólon, onde ocorre também a maior concentração luminal. Em condições fisiológicas (pH entre 5,5 e 6,7), mais de 90% deste SCFA existe sob a forma ionizada necessitando de uma proteína transportadora para ser absorvido. Este transporte pode ocorrer também pela troca com um ião bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). Por outro lado, a forma protonada, não dissociada, atravessa a membrana celular por difusão simples. Os transportadores mais referidos para a absorção de butirato são o MCT1 (do inglês *monocarboxylate transporter 1*) e o SMCT1 (do inglês *sodium-coupled monocarboxylate transporter 1*) (Figura 5) (Gonçalves & Martel, 2013) bem como alguns recetores acoplados à proteína G, como o recetor de niacina GPR109A (do inglês *G protein-coupled receptor*) (Thangaraju *et al.*, 2009). O MCT1 é um transportador pouco comum no intestino delgado, mas bastante expresso no cólon com níveis máximos na região distal, estando presente na área superior das criptas e na membrana apical das células epiteliais. O

mecanismo de ação resume-se à ligação de  $H^+$  ao transportador, seguida da ligação do butirato ao transportador protonado. Fisiologicamente, é possível que a atividade do MCT1 ( $K_m$  para o butirato entre 2,4 e 2,8 mM) seja maior na região proximal do cólon, onde há também uma maior concentração de butirato e onde o pH do lúmen é menor. Contudo, há inúmeros nutrientes e fármacos que podem modelar a atividade do MCT1 e, por isso, a competição do butirato com estes xenobióticos pelo mesmo transportador pode causar uma alteração significativa na absorção de butirato (Clausen *et al.*, 1991; Hadjiagapiou *et al.*, 2000). O SMCT1 é um transportador com níveis de expressão elevados principalmente na região distal do cólon, seguindo-se a região proximal e o íleo. Neste caso, o butirato atravessa após o acoplamento de um íão  $Na^+$  ao transportador. Este transportador tem uma afinidade elevada para o butirato ( $K_m$  de 50  $\mu M$ ) e está mais expresso na região distal do cólon, onde as concentrações de butirato são menores. Frequentemente os doentes de CCR apresentam alterações a nível do gene *SLC5A8* (do inglês *solute carrier family 5 member 8*) que codifica este transportador. Por isso, atribuiu-se uma função supressora tumoral ao transportador SMCT1, pela capacidade de mediar a entrada de butirato nas células do cólon, um potencial supressor tumoral. De facto, em condições de baixas quantidades de fibra dietética, as concentrações de butirato são inferiores e, nesta situação, o transportador de butirato mais importante é o SMCT1 (Gupta *et al.*, 2006; Gonçalves & Martel, 2013). O GRP109A é um recetor para niacina embora reconheça também o butirato apesar de, neste caso, ter baixa afinidade. Alguns autores



**Figura 5.** Modelo proposto para a expressão e função dos transportadores de butirato e os seus alvos principais nas células normais do cólon (Gonçalves & Martel, 2013).



referem que o butirato pode induzir a morte celular no CCR pela ativação deste recetor, independentemente da inibição das HDAC, embora os mecanismos de sinalização desta via continuem por identificar (Thangaraju *et al.*, 2009).

A concentração celular de butirato não é só dependente dos sistemas de captação, mas também dos transportadores de efluxo que removem este SCFA do interior das células. Estes transportadores estão muitas vezes associados à resistência a fármacos, pois acredita-se que estejam envolvidos na limitação da sua absorção, na biodisponibilidade e na toxicidade (Dietrich *et al.*, 2011). Recentemente foi demonstrado que o butirato é um substrato do transportador de efluxo BCRP (do inglês *breast cancer resistant protein*), bastante expresso na membrana apical do tecido normal do epitélio do cólon. Curiosamente, a inibição do BCRP potencia o efeito inibidor do butirato na proliferação celular (Gonçalves *et al.*, 2011). Além deste, o MCT4 foi também descrito recentemente como um transportador de efluxo com alta afinidade para o butirato e, em humanos, localiza-se na membrana basolateral do cólon. Mesmo assim, a regulação do MCT4 pode influenciar o desenvolvimento e proliferação do CCR (Gill *et al.*, 2005).

Várias evidências indicam que o butirato estimula o crescimento celular por atuar como uma fonte de energia oxidativa nas células normais. No interior das células epiteliais do cólon, o butirato é metabolizado em acetil-CoA por  $\beta$ -oxidação, entrando depois no ciclo de Krebs e convertendo-se em energia (Figura 5) (Donohoe *et al.*, 2011). Por outro lado, o butirato é metabolizado ineficientemente nas células tumorais do cólon, sendo a glicose a maior fonte de energia. Neste caso, o butirato acumula-se em concentrações superiores no núcleo, ocorrendo um aumento correspondente da inibição das HDAC, que resulta na inibição da proliferação celular. Esta diferença no metabolismo das células tumorais pode ser explicada pelo efeito de Warburg, o qual consiste na conversão de piruvato em lactato em detrimento da sua oxidação na mitocôndria, ainda que na presença de oxigénio. Assim, a glicólise excede o metabolismo oxidativo do butirato e as células tumorais convertem rapidamente a maior parte da glicose em lactato (Gonçalves & Martel, 2013; Encarnação *et al.*, 2015).

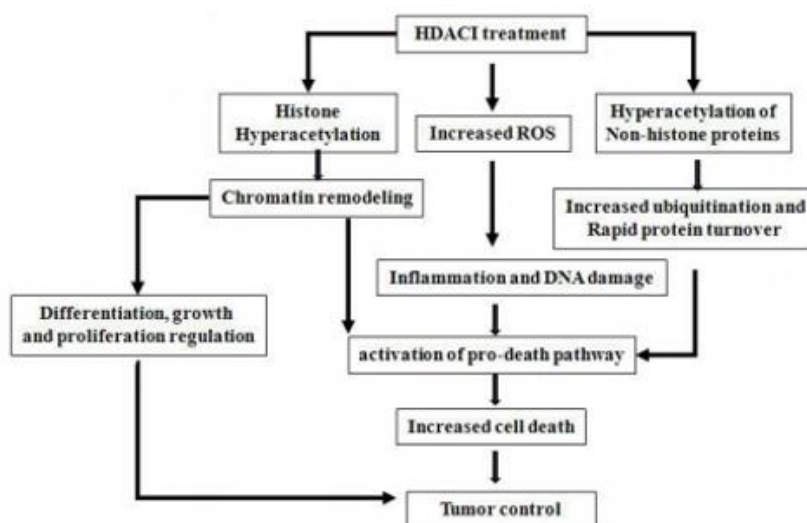
### **1.3.3. Butirato na Inibição das HDAC**

Como já citado, o butirato ao entrar nas células tem a capacidade de inibir as HDAC (HDACi) e regular a expressão de vários genes.

Os HDACi são reguladores epigenéticos importantes e considerados como uma nova classe de agentes anticancerígenos com um grande potencial clínico no tratamento do cancro (Xu *et al.*, 2007). A unidade básica da cromatina é o nucleossoma, composto por DNA

enrolado à volta de um octâmero de histonas (Groselj *et al.*, 2013). As HDAC são proteínas que regulam a expressão de vários genes pela interação direta de fatores de transcrição (Guilloteau *et al.*, 2010). Os HDACi causam a hiperacetilação das HDAC o que resulta no desenrolamento da cromatina condensada, facilitando o acesso dos fatores de transcrição à região promotora de certos genes sem causar diretamente a sua transcrição (Ito, 2007). As HDAC são uma família de 18 proteínas nos humanos, consistindo em proteínas de classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8), de classe IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 e HDAC9), de classe IIb (HDAC6 e HDAC10), de classe III (sirtuínas 1-7) e de classe IV (HDAC11). Estas enzimas removem o grupo acetil das histonas e outras proteínas. As diferentes classes de HDAC dependem da sua localização subcelular e os diferentes tipos dependem dos diferentes substratos (Falkenberg & Johnstone, 2014). Os HDACi podem ser classificados de acordo com a estrutura e a especificidade de inibição. Estes dividem-se em (1) ácidos hidroxâmicos, como o vorinostat que foi o primeiro HDACi aprovado como fármaco em 2006 pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*), específicos contra as classes I e II de HDAC; (2) SCFA, que inclui o butirato, inibidores das classes I e IIa de HDAC; (3) peptídeos cíclicos, como a romidepsina, atuando sobretudo contra a classe I de HDAC; (4) benzamidas, como o entinostat, que são ativas contra a classe I de HDAC (Wagner *et al.*, 2010; Spiegel *et al.*, 2013). Os potenciais mecanismos das propriedades quimioterapêuticas dos HDACi estão representados na figura 6.

O butirato inibe especificamente as HDAC das classes I e IIa (New *et al.*, 2012). Estas duas classes de HDAC são as mais importantes pois são componentes de grandes complexos de repressão da transcrição de genes. A inibição destas classes de HDAC altera a expressão de genes, resultando na inibição da proliferação celular, na apoptose e na diferenciação celular



**Figura 6.** Representação esquemática dos possíveis mecanismos de ação dos HDACi no controlo tumoral (quando utilizados como um único agente terapêutico) (Katoch *et al.*, 2013).

(Donohoe *et al.*, 2012). Um estudo recente mostrou que ocorre uma sobreexpressão das HDAC no CCR, em particular da expressão da HDAC2, pertencente à classe I. Estas diferenças na expressão das HDAC contribuem também para o *paradoxo do butirato* (Ashktorab *et al.*, 2009). Outro estudo mostrou que em condições reduzidas de glicose as células tumorais de CCR evitam o efeito de *Warburg* e que baixas doses de butirato (0,5 mM) não induzem efeitos na histona H3ac (do inglês *acetylated histone 3*), aumentando a proliferação celular. Contudo, concentrações de butirato mais elevadas (2 e 5 mM) levam à acetilação da H3ac, inibindo a proliferação celular (Donohoe *et al.*, 2012). Outro grupo observou que a capacidade oxidativa destas células verifica-se com concentrações entre 1 e 2 mM. Desta forma, concentrações de butirato superiores a 2 mM levam a que este se acumule no núcleo e funcione como HDACi tanto nas células normais como nas células do CCR. Este facto leva à postulação de um modelo em que o butirato promove a proliferação do tecido normal do cólon na base das criptas, onde a concentração de butirato é mais baixa, enquanto nas células do lúmen induz a apoptose devido às concentrações serem mais altas. Contudo, no tecido normal do cólon não se verifica a inibição da proliferação celular pelo butirato. Assim, é possível inferir que o butirato, sendo a maior fonte de energia das células do cólon, entra nas células através dos transportadores MCT1 e SMCT1, localizados na membrana apical, onde será metabolizado. O butirato não metabolizado é extrusado pelo transportador de efluxo BCRP, diminuindo a concentração intracelular e, por isso, o butirato não exibe efeitos a nível das HDAC nas células normais (Donohoe *et al.*, 2012; Gonçalves & Martel, 2013).

Muito recentemente, um estudo mostrou a capacidade do butirato afetar a expressão de proteínas reparadoras de DSB, reduzindo a acessibilidade destas ao núcleo e aos locais lesados. O butirato aumentou a sensibilidade das células do cancro da mama ao efeito citotóxico de fármacos danificadores do DNA (Li *et al.*, 2015).

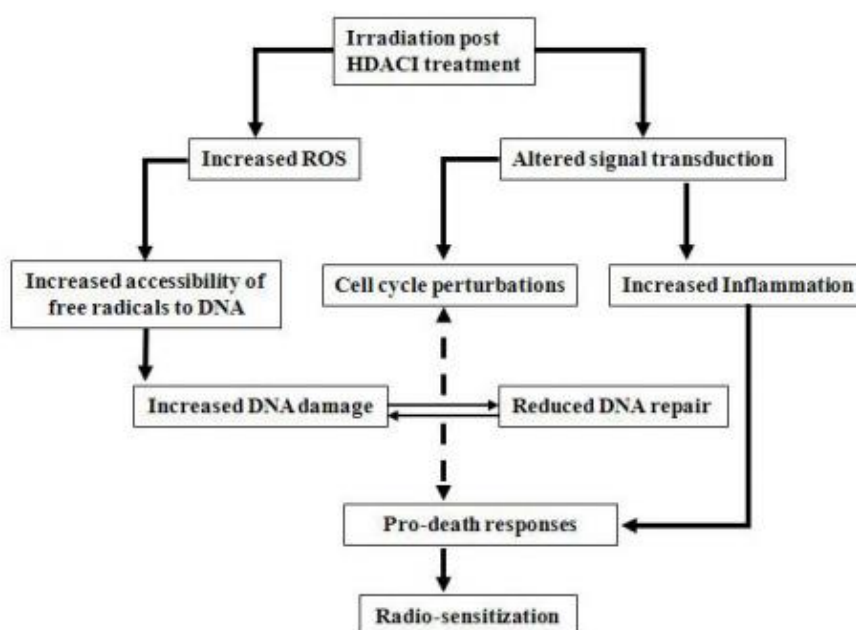
#### **1.4. Butirato como Radiossensibilizador no Tratamento do CCR**

Muitos cancros mostram um aumento da expressão das HDAC e, por isso, uma inativação da transcrição da cromatina resulta na desregulação de genes supressores tumorais e de genes reparadores do DNA. Como foi referido, os HDACi mostram ter um efeito radiossensibilizador especialmente quando administrados em combinação com a radioterapia. Existem evidências crescentes de que os HDACi diminuem a capacidade de diferentes linhas celulares repararem os danos do DNA induzidos pela radiação ionizante, afetando tanto as vias de sinalização ativadas pelas DSB nas cadeias de DNA bem como as vias de reparação do DNA. Os potenciais mecanismos das propriedades quimioterapêuticas dos HDACi em

combinação com a radioterapia estão representadas na figura 7. As células tratadas com HDACi prolongam os danos induzidos no DNA, devido ao recrutamento de menores quantidades de proteínas reparadoras (Groselj *et al.*, 2013). Desta forma, podemos pensar que os HDACi prolongam o tempo de desenrolamento da cromatina, ficando esta mais exposta e tornando as cadeias de DNA mais suscetíveis à indução de danos pela radiação ionizante. Contudo, são necessários mais estudos que elucidem os mecanismos e os alvos pelos quais os vários HDACi têm efeitos radiosensibilizadores nas células tumorais e potenciais efeitos radioprotetores nas células normais (Groselj *et al.*, 2013).

As DSB são causadas principalmente pela radiação ionizante. Quando este tipo de danos é detetado pode ser reparado através de dois mecanismos principais, a junção de extremidades não-homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end-joining*) ou a recombinação homóloga (HR, do inglês *homologous recombination*). A modulação da sinalização e a reparação dos danos no DNA pelos HDACi pode ser um mecanismo subjacente aos efeitos radiosensibilizadores nas linhas celulares tumorais (Groselj *et al.*, 2013).

Como já foi citado, o butirato leva a um diferente nível de relaxamento da cromatina entre células normais e células tumorais, o que resulta numa sensibilidade diferente aos efeitos citotóxicos de fármacos danificadores do DNA ou da radiação ionizante (Li *et al.*, 2015; Oike *et al.*, 2014). Outro estudo com pro-fármacos derivados do butirato revelou o mesmo efeito de radiosensibilização no tratamento de gliomas tanto *in vitro* como *in vivo* (Entin-Meer, 2005; Entin-Meer *et al.*, 2007).



**Figura 7.** Representação esquemática dos possíveis mecanismos de ação dos HDACi na combinação com a radioterapia (Katoch *et al.*, 2013).

O butirato mostra-se assim um bom candidato no tratamento e na prevenção do CCR pela inibição seletiva da proliferação das células tumorais. Além disso, ao ser um HDACi com a capacidade de modelar a radiosensibilidade destas mesmas células, coloca-se a hipótese de potenciar os danos causados pela radiação ionizante e melhorar significativamente a eficácia do tratamento de radioterapia.

## **II. OBJETIVOS**



O cancro colorretal é uma das maiores causas de morte a nível mundial. A incidência desta neoplasia tem sido relacionada com a alteração de hábitos de vida, nomeadamente a adoção de dietas ocidentais. As dietas ricas em fibra dietética têm demonstrado efeitos protetivos derivados da produção de butirato pelas bactérias do cólon. Este composto tem a capacidade de inibir as histona deacetilases e de induzir apoptose e diferenciação nas células tumorais, ao contrário do que se verifica em células normais. Como inibidor das histona deacetilases, o butirato diminui a estabilidade do DNA, tornando as células tumorais mais sensíveis a terapias que induzam danos no DNA. A radioterapia pode produzir efeitos diretos e indiretos no DNA das células. O recurso a esta terapia para tratamentos oncológicos, nomeadamente no cancro colorretal, tem aumentado nos últimos anos em Portugal. Contudo, nem sempre é eficaz. Um dos problemas associados à radioterapia é a radiorresistência adquirida por uma percentagem de células do tumor, levando ao reaparecimento do mesmo após o tratamento.

Com esta dissertação pretendeu-se avaliar o efeito da combinação do butirato com a radioterapia numa linha celular de cancro colorretal e numa linha celular de cancro colorretal radiorresistente obtida a partir da linha celular nativa, com o intuito de perceber se o butirato é capaz de sensibilizar o tumor e de melhorar a eficácia da radioterapia no tratamento do cancro colorretal.





### III. MATERIAIS E MÉTODOS



### 3.1. Cultura Celular

As células foram cultivadas e propagadas recorrendo a técnicas de manipulação correta do material biológico e laboratorial, no sentido de manter as condições de assepsia e de esterilização em que as culturas se devem manter.

Neste estudo foi utilizada a linha celular de CCR WiDr adquirida na *American Type Culture Collection* (ATCC®). A linha celular WiDr é derivada da linha celular HT-29 (Chen et al., 1987) e foi estabelecida a partir de uma porção de um adenocarcinoma primário do cólon reto-sigmoide de uma doente de 78 anos em 1971 (Noguchi et al., 1979). Uma das características desta linha celular é apresentar o gene que codifica a proteína P53 mutado, levando à troca de uma arginina com uma histidina na posição 273. Além disso, apresenta também uma mutação no gene APC (Ilyas et al., 1997).

A manutenção das linhas celulares seguiu as instruções do fornecedor. Assim, as células foram propagadas em cultura aderente em frascos (430641, Corning®) com o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, D5648, Sigma®), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *fetal bovine serum*, F7524, Sigma®), 1% de antibiótico (A5955, Sigma®) e 0,25 mM de piruvato de sódio (11360, Gibco®), a 37°C numa incubadora (Binder®) com atmosfera humedecida, com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. O pH dos meios de cultura foi acertado a 7,4 (pH fisiológico) sendo estes posteriormente filtrados em unidades de filtração autoclaváveis (Thermo Scientific Nalgene™) e mantidos em frascos autoclaváveis (Schott DURAN®) à temperatura de 4°C até à sua utilização.

Na realização dos estudos utilizaram-se duas variantes deste meio que diferiam quanto ao teor de glicose: meios com elevada concentração de glicose (25 mM), designados por *high glucose* (HG), e meios com baixa concentração de glicose (5 mM), designados por *low glucose* (LG). As concentrações de glicose presentes no FBS não foram tidos em conta para os referidos valores visto que a percentagem de FBS foi igual para todas as condições.

A linha celular WiDr propaga-se em cultura aderente formando monocamadas. Por esta razão, para a realização dos estudos *in vitro* foi necessário destacar as células dos frascos de cultura e obter suspensões celulares. Para isso, aspirou-se o meio de cultura dos frascos e lavaram-se as células com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*, constituído por 137 mM de NaCl (S7653, Sigma®), 2,7 mM de KCl (P9333, Sigma®), 10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (S5011, Sigma®) e 1,8 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (P0662, Sigma®) a pH 7,4), sendo depois incubadas a 37°C durante aproximadamente 5 minutos com uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (T4049, Sigma®). De seguida, inibiu-se a ação proteolítica da tripsina (quebra as ligações intercelulares e entre as células e a base aderente dos frascos de cultura) com, no

mínimo, o dobro do volume de meio de cultura comparativamente ao volume de tripsina adicionada.

Para determinar a concentração da suspensão celular, recorreu-se ao método de exclusão do azul tripano para o que se prepararam alíquotas com azul tripano e suspensão celular na proporção de 1:1, colocando-as posteriormente numa câmara *Neubauer* (8100203, Hirshmann®) após o que se procedeu à contagem num microscópio invertido (AE31, Motic®) com ampliação de 10x. Depois de determinada a concentração celular prosseguiu-se com a distribuição da suspensão celular em placas ou frascos de cultura conforme o pretendido.

### **3.2. Indução de Resistência à Radioterapia**

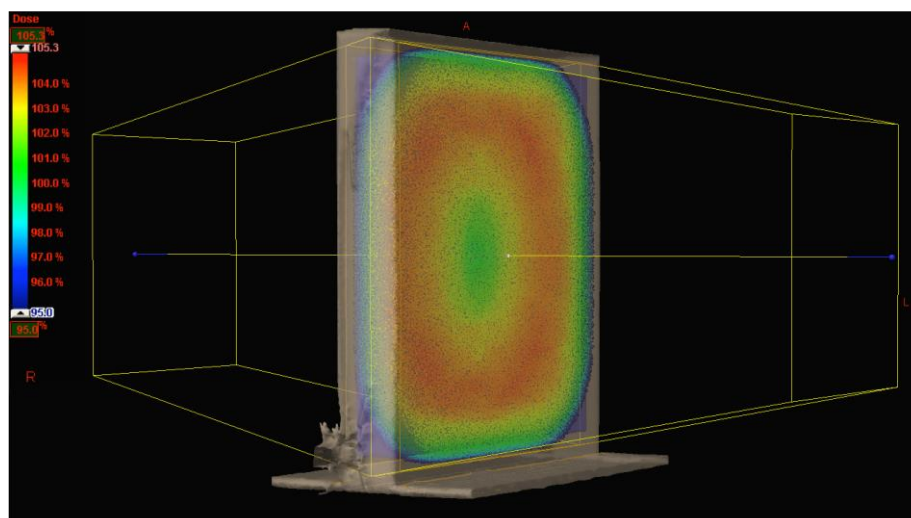
Para a obtenção de uma linha celular radiorresistente derivada da linha celular nativa WiDr, foi necessário proceder à irradiação desta com raios-X. Para isso, adaptou-se o método descrito por Smith *et al.* e administraram-se doses cumulativas de 2 Gy por semana, ao longo de um período de 10 semanas. Este protocolo tem por princípio a irradiação fracionada aplicada a doentes oncológicos submetidos à radioterapia. A linha celular resultante foi designada como WiDr/10x (Ferreira, 2014; Smith *et al.*, 2009).

A irradiação decorreu no Serviço de Radioterapia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra por especialistas em física médica num acelerador linear *Varian Clinac I2D10* (LINAC®) com um feixe de fótons de 4 MV, utilizado na rotina clínica para o tratamento oncológico.

Os frascos foram totalmente preenchidos com meio de cultura de maneira a evitar a presença de ar nos mesmos aquando da irradiação pois a presença de bolhas de ar pode alterar a distribuição de dose à superfície (Ferreira, 2014; Khan *et al.*, 2013). Foi igualmente necessário acondicionar os frascos num dispositivo em acrílico com a forma de caixa, especialmente desenhado para o efeito. O dispositivo foi construído no Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra com o objetivo de estudar os efeitos da radiação ionizante em culturas celulares. As dimensões da caixa e as referências de posicionamento garantem a homogeneidade da dose de radiação administrada (Ferreira, 2014). A figura 8 demonstra o planeamento tridimensional descrito assim como o perfil da dose administrada na irradiação celular.

O dispositivo foi colocado na mesa de tratamento e posicionado com recurso a um sistema ortogonal de *lasers* presente na sala. Os frascos foram inseridos no interior da caixa e o espaço restante foi preenchido com água destilada previamente aquecida a 37°C. A administração da dose pretendida foi feita com recurso a dois campos laterais, posicionando-se a *gantry* a 90° e a 270°, de modo a garantir uma distribuição homogénea da dose de radiação

(Ferreira, 2014). A tabela 2 apresenta as unidades de monitor (UM, do inglês *monitor units*) necessárias para administrar a dose de 2 Gy às culturas celulares.



**Figura 8.** Representação tridimensional do dispositivo utilizado para a irradiação das células. A distribuição de dose encontra-se representada por esquema de cor, variando de um mínimo de 95% (azul) a um máximo de 105,3% (vermelho).

**Tabela 2.** Esquema representativo da administração da dose de 2 Gy às células, tendo em conta o posicionamento da *gantry* do acelerador linear.

Dose administrada	Posicionamento da <i>gantry</i>	
2 Gy	90°	270°
	93UM	92UM

Após a irradiação, o meio foi mudado e prosseguiu-se com os procedimentos comuns de manutenção celular até à irradiação seguinte. Com este processo, obtiveram-se populações de células com frações crescentes de dose de radiação que foram designadas conforme ilustrado na Tabela 3. Por fim, obteve-se a linha celular designada por WiDr/10x, com a qual se prosseguiram os estudos.

**Tabela 3.** Esquema representativo das linhas celulares mantidas em cultura com doses de radiação cumulativas, após irradiações sucessivas com 2 Gy.

Designação da população celular	Nº de frações cumulativas	Dose cumulativa (Gy)
WiDr/1x	1	2
WiDr/2x	2	4
WiDr/3x	3	6
...	...	...
WiDr/10x	10	20

### 3.2.1. Avaliação da Sobrevivência Celular

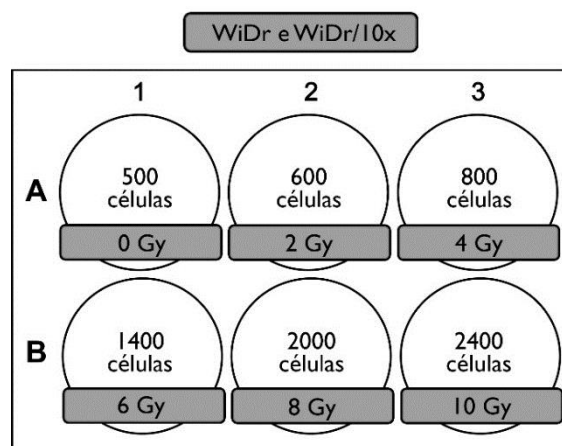
De forma a avaliar e a comparar a resposta da linha celular nativa WiDr e da linha celular radiorresistente WiDr/10x ao tratamento com radioterapia, foi efetuado o ensaio clonogénico. Este ensaio analisa a capacidade das células formarem colónias, sendo essencial para avaliar a citotoxicidade induzida pela radiação ionizante. Consideram-se colónias grupos com 50 ou mais células no ambiente propício ao seu crescimento (Joiner & Kogel *et al.*, 2009).

Neste contexto, prepararam-se suspensões celulares de cada linha celular, WiDr e WiDr/10x, com uma concentração de 500.000 células/mL (como descrito em 3.1) e colocaram-se em *eppendorfs* e *falcons* devidamente identificados com o nome da linha celular e com a dose de radiação a administrar. Esta concentração tem por base a otimização previamente realizada com a mesma linha celular e de forma a manter a homogeneidade. Posteriormente as células foram irradiadas com doses de 2, 4, 6, 8 e 10 Gy, exceto os *eppendorfs* e *falcons* de controlo. Os controlos foram submetidos exatamente às mesmas condições, como o transporte para o local da irradiação e o tempo de hipoxia nos *eppendorfs* fechados. As doses foram administradas em frações cumulativas, diretamente proporcionais às UM, de acordo com o esquema ilustrado na tabela 4.

**Tabela 4.** Esquema representativo da administração das doses de 2 a 10 Gy tendo em conta o posicionamento da *gantry* do acelerador linear.

Dose a administrar	Posicionamento da <i>gantry</i>	
	90°	270°
2 Gy	93 UM	92 UM
4 Gy (2+2)	185 UM	185 UM
6 Gy (4+2)	278 UM	277 UM
8 Gy (6+2)	370 UM	370 UM
10 Gy (8+2)	463 UM	462 UM

Em seguida, distribuiu-se em triplicado um volume conhecido de cada suspensão celular por placas de 6 poços, de forma a estar de acordo com o número de células semeadas em cada poço como ilustrado na figura 9. Depois, adicionaram-se 3 mL de meio de cultura a cada poço e incubaram-se as placas a 37°C. Ao quinto dia, o meio de cultura foi trocado por meio de cultura novo, e ao décimo segundo dia, retiraram-se as placas e procedeu-se à coloração com violeta de cristal e contagem das colónias de células. Para tal, o meio foi removido de todos os poços, lavando-se de seguida cada poço com uma solução de PBS. Para fixar as células, adicionaram-se 2 mL de metanol a 100% (20847.360, VWRProlabo®) durante 5



**Figura 9.** Esquema representativo da preparação das placas de 6 poços para o ensaio clonogénico com as linhas celulares WiDr e WiDr/10x.

minutos à temperatura ambiente. Por fim, retirou-se o metanol, deixou-se secar, e repetiu-se o procedimento (Neuhaus *et al.*, 1998). Seguidamente, removeu-se o metanol e adicionaram-se 2 mL de solução de violeta de cristal (C3886, Sigma-Aldrich®) a 0,5% em metanol, durante 10 minutos à temperatura ambiente, de modo a corar as colónias de células presentes nos poços. O corante foi removido e as placas foram lavadas com água tépida para remover o excesso de corante, deixando-se a secar à temperatura ambiente para posterior contagem das colónias.

Após a contagem das colónias em cada poço, determinou-se a eficiência da placa (PE, do inglês *plate efficiency*) e o fator de sobrevivência (SF, do inglês *survival factor*) para cada condição em estudo, de acordo com a equação 1 e a equação 2, respetivamente (BUCH *et al.*, 2012).

$$PE(\%) = \frac{\text{Número de colónias contadas}}{\text{Número de células semeadas}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$SF(\%) = \frac{PE \text{ da placa com tratamento}}{PE \text{ da placa controlo}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Os resultados foram ajustados a um modelo linear quadrático, de acordo com a equação 3, onde D é a dose administrada,  $\alpha$  é a componente linear que corresponde à morte num evento único e  $\beta$  é a componente quadrática que corresponde à morte em eventos múltiplos. Desta forma, foi possível construir uma curva de sobrevivência celular que relaciona o fator de sobrevivência com a dose de radiação (Joiner & Kogel *et al.*, 2009).

$$SF = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad (\text{Eq. 3})$$



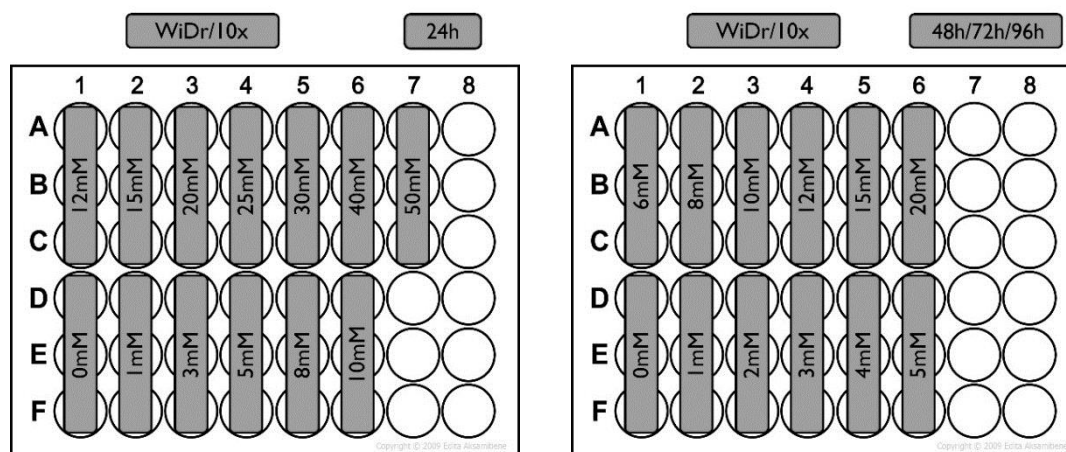
Com os resultados obtidos, foi possível estabelecer uma curva de sobrevivência celular que relaciona o fator de sobrevivência com a dose de radiação. Dessa forma, é possível avaliar a longo prazo a resposta das linhas celulares a diferentes doses de radiação e determinar as respectivas doses letais médias ( $DL_{50}$ ) que representam a dose de radiação que inibe em 50% a proliferação celular.

### 3.2.2. Avaliação da Atividade Metabólica

O ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é um método utilizado para avaliar a atividade metabólica das células viáveis pela quantificação da redução metabólica do sal de tetrazólio, solúvel em água, por desidrogenases presentes nas células metabolicamente ativas e associadas à redução de NADH (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*) e de NADPH (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*). Desta reação resulta a produção de cristais de formazano de cor púrpura, insolúveis em água, no interior das células. Deste modo, não há a formação de cristais de formazano pelas células metabolicamente inativas o que significa que a quantidade destes cristais é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas, sendo esta uma medida da proliferação celular (Langdon *et al.*, 2004; Abe & Matsuki, 2000; Buch *et al.*, 2012).

Este protocolo teve como objetivo avaliar a atividade metabólica da linha celular WiDr/10x após a administração de butirato em diferentes concentrações. Para isso, procedeu-se como descrito em 3.1 e distribuiu-se a suspensão celular por 4 placas de 48 poços de modo a obter uma concentração final de 50.000 células/mL em cada poço. Após 24 horas, as células foram tratadas com concentrações crescentes de butirato, tal como ilustrado na figura 10. A avaliação da proliferação celular pelo ensaio de MTT foi feita após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação com butirato. As concentrações testadas para as primeiras 24 horas de incubação variaram entre 1 e 50 mM e, para os restantes tempos de incubação, as concentrações testadas variaram entre 1 e 20 mM. As concentrações testadas diferem às 24 horas devido a não haver um efeito notório e não ter sido possível determinar o  $IC_{50}$ , como verificado em trabalhos prévios com esta linha celular (Encarnação, 2014; Gonçalves, 2014).

Assim, após o tempo de incubação estabelecido, removeu-se o meio de cultura e adicionaram-se 500  $\mu$ L de PBS em cada poço para lavagem das células e eliminação de vestígios de meio. De seguida, adicionaram-se 200  $\mu$ L de solução de MTT (0,5 mg/mL, M2128, Sigma<sup>®</sup>) por poço e colocou-se a placa na incubadora a 37°C durante 3 h até à formação dos cristais. Posteriormente, adicionaram-se 200  $\mu$ L de isopropanol (278475, Sigma<sup>®</sup>), com 0,04 M de ácido



**Figura 10.** Esquema representativo da preparação das placas de 48 poços para o ensaio de MTT após exposição da linha celular WiDr/10x a concentrações crescentes de butirato. A primeira placa corresponde ao desenho experimental utilizado para as 24 horas e a segunda placa corresponde ao desenho experimental utilizado para as 48, 72 e 96 horas.

clorídrico a 37% (258148, Sigma®) para a dissolução dos cristais. As placas foram colocadas em agitação durante o tempo suficiente para a dissolução dos cristais no solvente orgânico. Por fim, transferiram-se 200  $\mu$ L do conteúdo de cada poço para uma placa de 96 poços e mediu-se a absorvância a 570 nm, com filtro de referência a 620 nm, com o auxílio do espectrofotômetro ELISA (Biotek® Synergy HT).

Os resultados da proliferação celular foram determinados em percentagem relativamente aos respetivos controlos o que permitiu traçar as curvas de concentração-resposta com o auxílio do programa Origin® Pro 8.0. Assim, foi possível determinar as concentrações de butirato necessárias para inibir a proliferação celular em 50% ( $IC_{50}$ ) para cada tempo de incubação. Além disso, através dos valores de absorvância obtidos nas condições controlo de cada tempo de incubação foi possível medir e determinar os tempos de duplicação médios para cada uma das linhas celulares.

### 3.2.3. Avaliação do Efeito do Butirato no Metabolismo

Para determinar se o butirato promove alterações no metabolismo da linha celular radorresistente (WiDr/10x), utilizou-se a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Esta técnica é geralmente utilizada em estudos metabólicos *in vivo* e *in vitro* e baseia-se nas propriedades magnéticas dos núcleos atômicos de determinados elementos químicos. Apresenta ainda um caráter não destrutivo e permite estudar vias metabólicas específicas pelo recurso a substratos enriquecidos com isótopos estáveis (Malloy *et al.*, 1988).

Neste trabalho em particular utilizou-se glicose uniformemente marcada com carbono-13 ( $[U-^{13}C]$ glicose) (389374, Sigma®). Assim, prepararam-se frascos com cerca de 80% de confluência da linha celular WiDr/10x e preparou-se meio DMEM (11966-025, Gibco®), cuja

formulação diferiu no tipo de glicose utilizado para a cultura celular. A esta preparação foi adicionada [U-<sup>13</sup>C]glicose na concentração de 5 mM. Antes da adição do meio com [U-<sup>13</sup>C]glicose aos frascos preparados, aspirou-se o meio existente e lavaram-se as células com 5 mL de PBS por 3 vezes de forma a garantir a remoção dos seus vestígios. Depois, adicionaram-se 14 mL do novo meio e incubaram-se os frascos de cultura na ausência (controlos) e na presença do butirato na concentração de 5 mM. As amostras de 200 µL de meio foram recolhidas às 0, à 1, às 3, às 4, às 6 e às 8 horas para *ependorfs* devidamente identificados, que foram depois conservados a -80°C. A extração celular foi efetuada após 24 horas de incubação. Para tal, o meio de cultura foi decantado e lavaram-se os frascos 3 vezes com 5 mL de PBS. Seguidamente, adicionaram-se 750 µL de MeOH/H<sub>2</sub>O 80% (v/v) frio por duas vezes e utilizando um raspador de células, transferiu-se cada suspensão celular para um *ependorf* identificado. Cada *ependorf* foi centrifugado a 5725 xG durante 5 minutos e à temperatura de 4°C com o objetivo de separar a fase aquosa (que contém metabolitos solúveis) do *pellet* e conservaram-se as duas frações a -80°C. Por fim, a evaporação da fração aquosa foi feita na estufa de secagem.

A análise das amostras de meio recolhidas nos tempos enunciados foi efetuada a 14.1 Tesla por <sup>1</sup>H-RMN recorrendo a um espectrómetro Bruker de 600 Hz equipado com uma sonda de banda larga de 3 mm. Para a preparação das amostras para análise adicionaram-se 40 µL de uma solução de fumarato de sódio na concentração de 10 mM de D<sub>2</sub>O (99,9%), utilizada como padrão interno para o processo de quantificação, a 160 µL de meio das amostras.

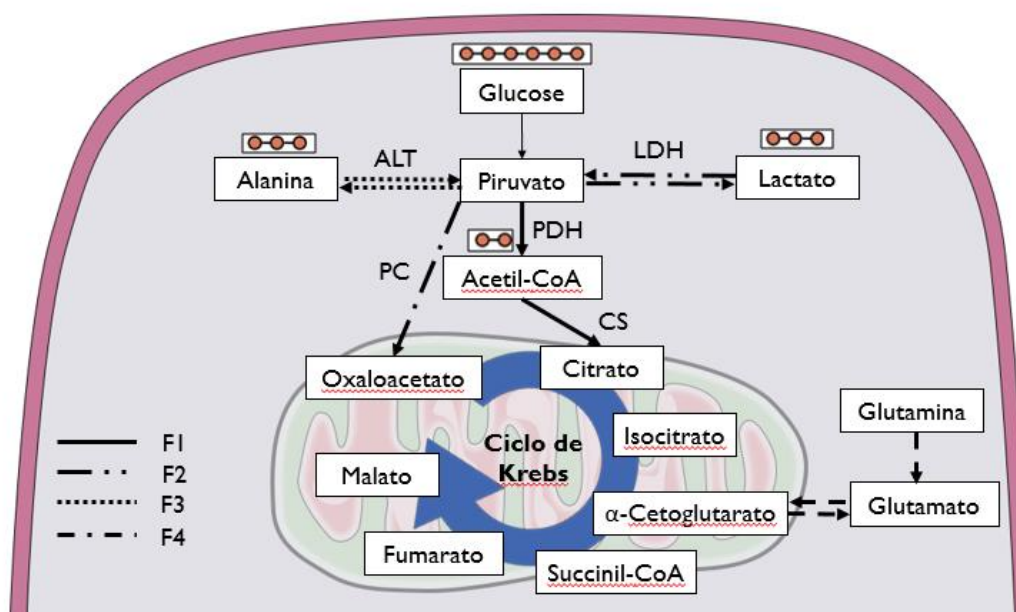
Os espectros de <sup>1</sup>H-RMN apresentam uma largura espectral de 7200 Hz definida por 64 k pontos. Para uma análise quantitativa com uma razão sinal/ruído adequada foram obtidos um total de 16 transientes (*scans*). Os transientes foram adquiridos com um pulso de radiofrequências equivalente a 45°. A repetição interpulsos durou um tempo total de 10 segundos, de forma a ocorrer uma relaxação nuclear completa dos vários protões dos metabolitos presentes nas amostras recolhidas. Estes parâmetros foram necessários para ocorrer uma relaxação nuclear completa dos protões de todos os metabolitos presentes nas amostras.

A fração composta pelos metabolitos que resultaram da extração celular foi dissolvida em D<sub>2</sub>O (99,9%) e analisada por <sup>1</sup>H- e <sup>13</sup>C-RMN. Os espectros de <sup>1</sup>H-RMN foram determinados no mesmo espectrómetro e com sonda acima referidos utilizando parâmetros de aquisição idênticos aos descritos para os espectros das amostras de meio, mas recorrendo a um maior número de transientes (nt=128) para atingir razões sinal/ruído adequadas à deteção de metabolitos menos abundantes. Os espectros de <sup>13</sup>C-RMN foram adquiridos utilizando uma sonda de 3 mm e desacoplamento de banda larga de protão. Adquiriram-se um

total de 128 k pontos definindo uma região espectral de 35 kHz. Para a obtenção de uma razão sinal/ruído compatível com a análise metabólica foram adquiridos entre 15.000 a 20.000 transientes, utilizando um pulso de radiofrequências de 45° e um tempo de repetição de interpulsos de 3 segundos. Este período de tempo foi suficiente para permitir uma relaxação total dos carbonos alifáticos, essenciais para este estudo. Os espectros obtidos foram analisados recorrendo ao *software* NUTSpro™ (Acorn NMR Inc., Livermore, CA).

Os metabolitos resultantes da transformação da [U-<sup>13</sup>C]glicose nas células são analisados por RMN e permitem obter informações sobre a atividade da via glicolítica e do ciclo de Krebs, bem como da interação destas duas vias metabólicas de acordo com o esquema apresentado na figura 11.

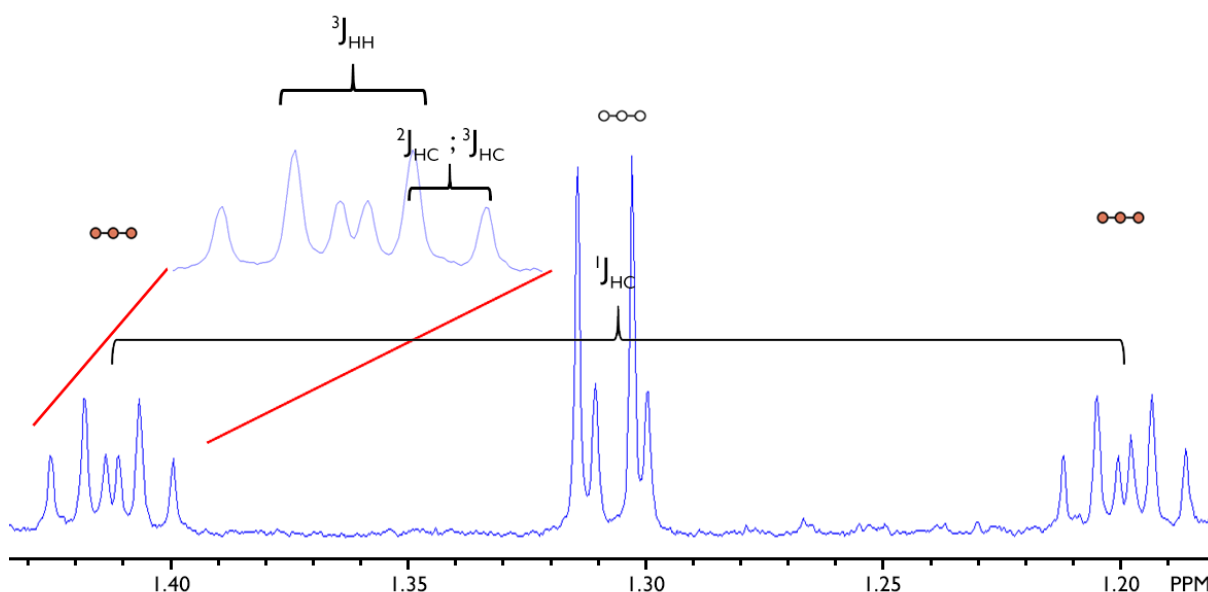
A [U-<sup>13</sup>C]glicose é metabolizada nas células e convertida pela glicólise em duas moléculas de piruvato, marcadas uniformemente com carbono-13 ([U-<sup>13</sup>C]piruvato). Por sua vez, este metabolito pode ser metabolizado por quatro vias metabólicas principais dando origem a intermediários também uniformemente marcados. Uma das vias ocorre na mitocôndria, onde é convertido por ação da enzima piruvato desidrogenase (PDH, do inglês *pyruvate dehydrogenase*) em acetil-CoA que, posteriormente, sofre oxidação no ciclo de Krebs, resultando na produção de CO<sub>2</sub> e outras moléculas redutoras que alimentam a cadeia transportadora de elétrons. Outra via, converte o [U-<sup>13</sup>C]piruvato em [U-<sup>13</sup>C]lactato através da enzima lactato desidrogenase (LDH, do inglês *lactate dehydrogenase*). Quanto maiores os níveis citosólicos de dinucleótido de nicotinamida e de adenina (NADH, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*), mais intensa é a atividade da LDH e, conseqüentemente, maior a



**Figura 11.** Esquema representativo das vias metabólicas do piruvato resultante do processo glicolítico com recurso à [U-<sup>13</sup>C]glicose. São representadas 4 vias: F1 – oxidação no ciclo de Krebs; F2 – fermentação láctica; F3 – transaminação; F4 – carboxilação (adaptado de Gonçalves, 2014).

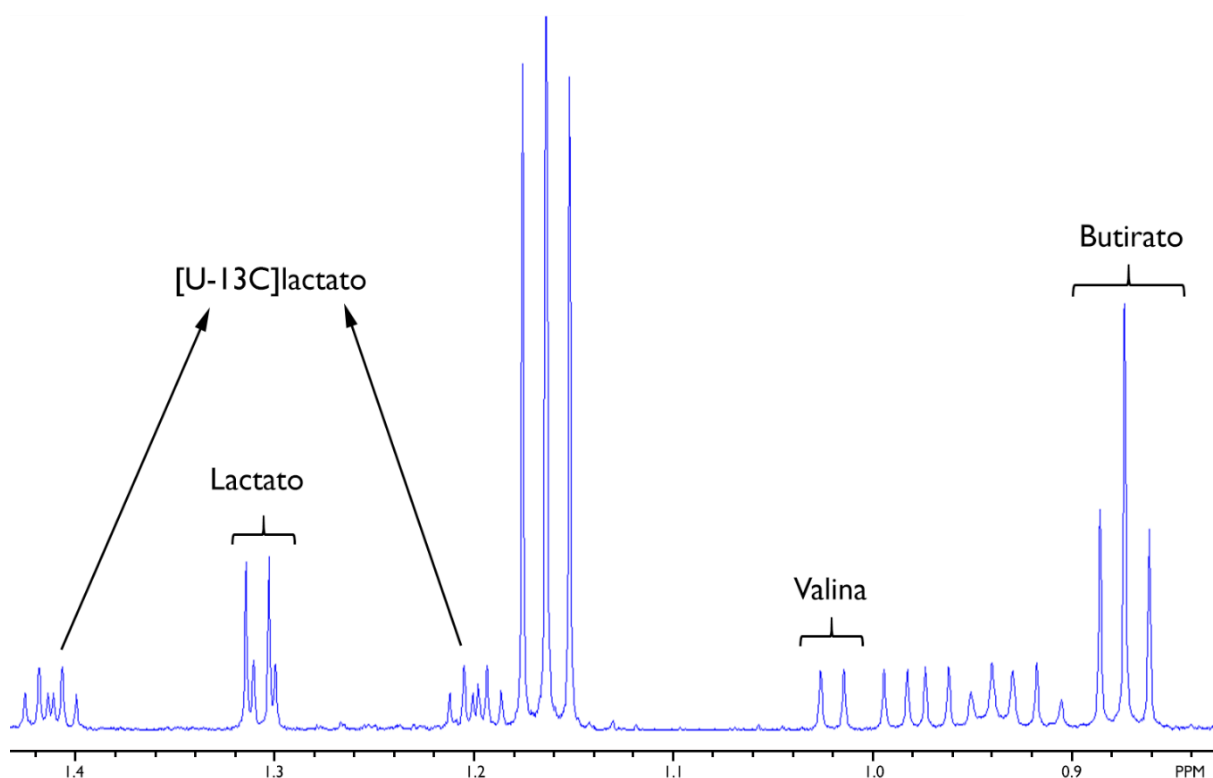
conversão de piruvato em lactato. No caso dos níveis de NADH serem reduzidos, o piruvato pode ser convertido por outra via em alanina pela enzima alanina aminotransferase (ALT). Uma via alternativa ainda converte o piruvato em oxaloacetato, um intermediário do ciclo de Krebs, através da enzima piruvato carboxilase (PC). A atividade das diferentes vias de metabolização pode ser caracterizada com base na incorporação da marcação da glicose nos intermediários do ciclo de Krebs e nos produtos resultantes.

Como referido, pela ação da LDH, o piruvato uniformemente marcado é convertido em  $[U-^{13}C]$ lactato e libertado para o meio de cultura. Através da identificação e da quantificação deste metabolito no espectro de RMN de próton torna-se possível determinar o consumo de  $[U-^{13}C]$ glicose por via indireta nas células em estudo. Assim, podemos caracterizar a intensidade da via glicolítica, seguida de fermentação láctica, e o efeito do butirato no recurso a esta via (Figura 11). Contudo, a glicose não é o único substrato utilizado pelas células para a glicólise e para a produção de lactato, produzindo-se, por conseguinte, lactato sem qualquer tipo de marcação. O lactato não enriquecido com carbono-13 é caracterizado pelo aparecimento de um duplete a 1.31 ppm no espectro de  $^1H$ -RMN e distingue-se facilmente do  $[U-^{13}C]$ lactato, que surge representado por dois satélites, em que cada um deles é um duplete de tripletos (multiplete), como é possível verificar na figura 12. Esta diferença deve-se ao acoplamento adicional que o carbono-13 promove por ter um *spin* diferente de 0, sendo que o *spin* do carbono-12 é 0. Os multipletos do  $[U-^{13}C]$ lactato resultam da junção de três constantes de acoplamento: uma homonuclear ( $^3J_{HH} = 7,0$  Hz) e duas heteronucleares ( $^2J_{HC}$  e  $^3J_{HC}$ , de magnitudes semelhantes,  $\sim 4,2$  Hz). Assim, pela análise dos



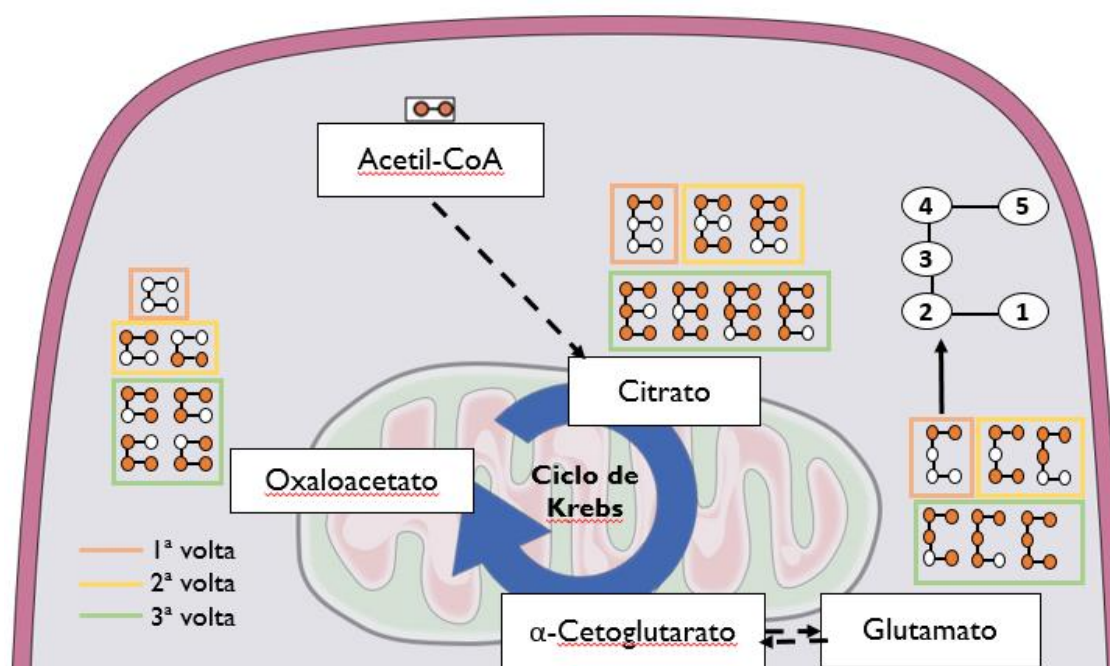
**Figura 12.** Expansão da região do espectro  $^1H$ -RMN relativa ao grupo metilo ( $-CH_3$ ) do lactato. Os dois satélites (multipletos) são referentes ao lactato produzido a partir da  $[U-^{13}C]$ glicose. O duplete central é referente ao lactato sem qualquer marcação presente no meio e ao próprio lactato produzido por outros substratos não enriquecidos (adaptado de Gonçalves, 2014).

espectros de  $^1\text{H}$ -RMN do meio de cultura pode-se determinar o efeito do butirato, de forma indireta, na via da glicólise. O butirato não apresenta nenhum tipo de marcação, ou seja, a molécula de butirato é constituída por 4 átomos de carbono-12, salvo uma pequena contribuição de cerca de 1,1% da abundância isotópica natural do carbono-13). No espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, o pico do butirato surge representado por dois tripletos, cada um deles relativo ao grupo metilo. Para determinar a concentração de lactato, de  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{lactato}$  e de butirato foi necessário recorrer à valina, um aminoácido de concentração conhecida presente nos meios de cultura. Este aminoácido apresenta um pico no espectro  $^1\text{H}$ -RMN relativamente constante ao longo do tempo, o que sugere que não é praticamente consumido, podendo assim extrapolar-se a concentração dos outros compostos a partir da deste. Resumidamente, os picos quantificados nos espectros  $^1\text{H}$ -RMN das amostras de meio foram os do  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{lactato}$ , do lactato, da valina e, quando presente, do butirato, como representado na figura 13.



**Figura 13.** Expansão do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de uma amostra de meio da linha celular WiDr/10x incubada com butirato. São visíveis as ressonâncias referentes ao  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{lactato}$ , ao lactato não marcado, à valina e ao grupo metilo do butirato.

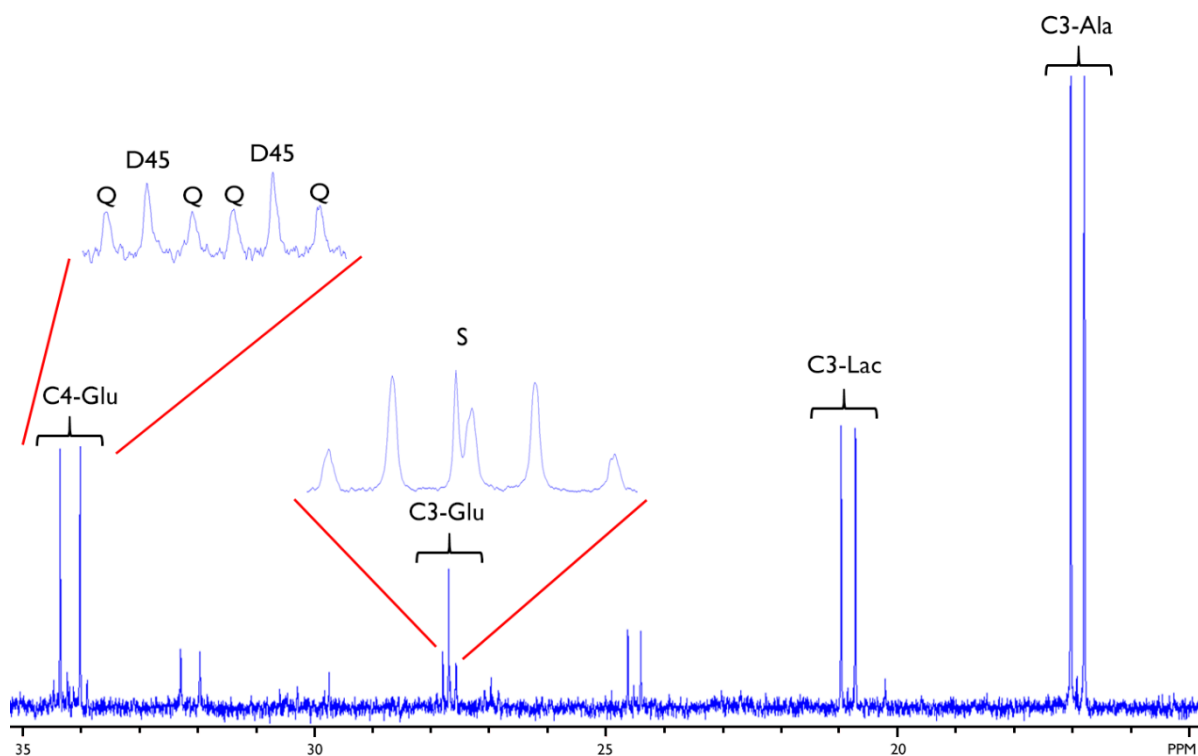
A caracterização da utilização da acetil-CoA no ciclo de Krebs foi medida recorrendo à avaliação do perfil de enriquecimento em carbono-13 no glutamato. Este aminoácido não faz parte do ciclo de Krebs, mas encontra-se em equilíbrio com o  $\alpha$ -cetogluturato, um intermediário do ciclo, e tem uma concentração celular elevada, o que facilita a quantificação por RMN. Quanto maior for o número de voltas do ciclo, maior será a incorporação de



**Figura 14.** Esquema representativo das diferentes marcações com carbono-13 em intermediários do ciclo de Krebs e no glutamato durante três voltas e respectivas posições da marcação no glutamato (adaptado de Gonçalves, 2014).

carbono-13 nos vários intermediários e, por conseguinte, no glutamato (Figura 14). Desta forma, pelo cálculo da taxa de incorporação no glutamato podemos inferir acerca da velocidade do ciclo. Isto deve-se à formação de intermediários com dupla marcação na primeira volta do ciclo. Após a entrada de  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetil-CoA no ciclo de Krebs, os carbonos do  $\alpha$ -cetoglutarato são marcados nas posições 4 e 5, o que conduz à alteração do equilíbrio com o glutamato, levando a que este seja marcado nas mesmas posições. A contínua entrada de  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetil-CoA no ciclo origina mais marcações com o aparecimento de intermediários triplamente marcados e de intermediários multi-enriquecidos. A medição da razão entre os intermediários multi-enriquecidos e os duplamente enriquecidos permite avaliar a velocidade do ciclo.

Quando ocorrem pelo menos duas voltas no ciclo, o glutamato apresenta os carbonos das posições 3, 4 e 5 enriquecidos. A partir do espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN dos extratos de metanol das células é possível quantificar a abundância destas marcações no glutamato. A ressonância do carbono 4 do glutamato, possui um duplete (D45) que reflete moléculas com marcação simultânea nos carbonos 4 e 5, e um quarteto/pseudoquarteto (Q) que reflete a marcação simultânea nos carbonos 3, 4 e 5 de acordo com o representado na figura 15 (Pereira *et al.*, 2011). Assim, quanto maior a razão Q/D45 dos multipletos, maior a velocidade do ciclo, maior a oxidação da  $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glicose nas células e maior o recurso ao ciclo de Krebs. Através das marcações no glutamato é possível ainda determinar a maior ou menor envolvimento de fluxos biossintéticos nas células, ou seja, o maior ou menor recurso à anaplerose. A conversão de



**Figura 15.** Expansão do espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do extrato de metanol da linha celular WiDr/10x incubada com butirato. Estão representadas as ressonâncias referentes ao carbono 3 do lactato (C3-Lac), ao carbono 3 da alanina (C3-Ala) e aos carbonos 3 (C3-Glu) e 4 (C4-Glu) do glutamato. Nas expansões está representado o multipletos referente ao C4-Glu com a designação dos respectivos multipletos (Q – quarteto; D45 – duplete) e está representado o multipletos referente ao C3-Glu com o destaque para o pico singlete (S) que incorpora a componente devida à abundância natural (adaptado de Gonçalves, 2014).

piruvato uniformemente marcado em oxaloacetato resulta numa marcação no glutamato mais intensa nos carbonos 2 e 3 por ação do *turnover* do ciclo de *Krebs*. Assim, o aumento da razão C3-Glu/C4-Glu indica o aumento deste fluxo anaplerótico e, por conseguinte, uma contribuição maior nos fluxos biossintéticos.

Para caracterizar o acoplamento entre a glicólise e o ciclo de *Krebs* recorreu-se também aos espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN dos extratos de metanol para a determinação da razão entre a marcação do carbono 3 do lactato e do carbono 4 do glutamato. Esta razão é tanto menor quanto maior for o acoplamento e menos dependente estiver a célula do processo glicolítico para a obtenção de energia. Avaliou-se ainda a razão entre a marcação do carbono 3 do lactato e do carbono 3 da alanina para caracterizar os diferentes estados *redox* no citosol.

O efeito do butirato na atividade metabólica das células foi avaliado a partir da comparação das razões determinadas nas células controlo com as razões das células incubadas com butirato. Para determinar a captação do butirato pelas células quantificou-se a área referente ao grupo metilo do butirato no espectro  $^1\text{H}$ -RMN dos extratos celulares.



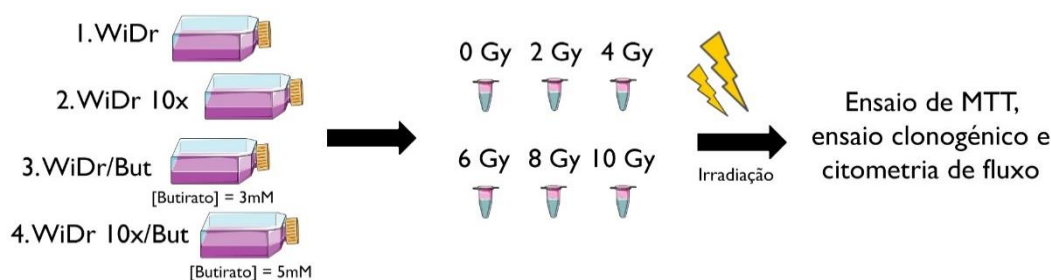
### 3.3. Avaliação do Efeito do Butirato em Combinação com Radioterapia

Para a realização dos vários ensaios para avaliação da combinação do efeito do butirato com a radioterapia foi necessário incubar as culturas celulares com o butirato.

Inicialmente, prepararam-se dois frascos de cada linha celular, a linha celular WiDr e a linha celular WiDr/10x, com o número de células pretendido para cada ensaio (como descrito em 3.1). No dia seguinte, aspirou-se o meio de cultura e os frascos foram lavados uma vez com 3 mL de PBS para remover completamente o meio de cultura e as células mortas e, depois, adicionaram-se 10 mL de meio de cultura. Seguidamente, administrou-se butirato a um dos frascos da linha celular WiDr e a outro dos frascos com a linha celular WiDr/10x por forma a obter as concentrações de 3 mM e de 5 mM, respetivamente. Estas concentrações de butirato são as correspondentes ao IC<sub>50</sub> de cada linha celular, previamente obtido tendo em conta a incubação durante 48 horas. Por esta razão, as células foram incubadas com butirato durante 24 horas com o objetivo de promover a sensibilização destas aos efeitos da radiação, sem a indução de um efeito citotóxico por parte do butirato.

Após 24 horas prepararam-se então as suspensões celulares com uma concentração de 500.000 células/mL a partir de cada um dos 4 frascos e colocaram-se em *eppendorfs* e em *falcons* procedendo-se à irradiação com doses crescentes de radiação, de acordo com o esquema da tabela 4 (tal como descrito em 3.2.1).

Após a irradiação, procedeu-se à distribuição das suspensões celulares de acordo com o ensaio experimental pretendido. A figura 16 representa um esquema do procedimento geral descrito acima.



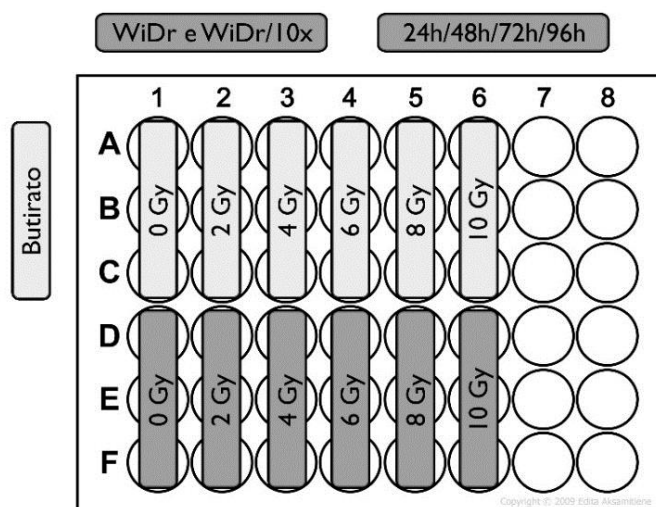
**Figura 16.** Esquema representativo das 4 condições avaliadas. As condições 1 e 2 representam as linhas celulares WiDr e WiDr/10x na ausência de butirato e as condições 3 e 4 na presença do butirato nas concentrações de 3 mM e de 5 mM, respetivamente.

#### 3.3.1. Avaliação da Atividade Metabólica

Este ensaio teve como finalidade a avaliação da atividade metabólica das células em estudo em resposta à combinação do efeito do butirato e posterior tratamento com radioterapia.

Assim, depois da terapia combinada anteriormente descrita, colocaram-se 25.000 células de cada suspensão celular em cada poço de placas de 48 poços. A distribuição das suspensões celulares foi realizada em triplicado para cada condição, tal como representado na figura 17.

A atividade metabólica foi medida 24, 48, 72 e 96 horas depois da irradiação das suspensões celulares, através do ensaio de MTT, de acordo com o método anteriormente descrito. Os resultados da proliferação celular foram determinados em percentagem relativamente aos controlos permitindo comparar a relação de dose-resposta entre a radioterapia e a terapia combinada nas duas linhas celulares.



**Figura 17.** Esquema representativo da preparação das placas de 48 poços para o ensaio de MTT com as linhas celulares WiDr e WiDr/10x. As linhas A, B e C da placa correspondem às suspensões com administração de butirato e posterior irradiação. As linhas D, E e F, correspondem às suspensões apenas irradiadas.

### 3.3.2. Avaliação da Sobrevivência Celular

Para avaliar a resposta das linhas celulares ao efeito da combinação do butirato com o tratamento com radioterapia efetuou-se o ensaio clonogénico. Para este ensaio, procedeu-se com a terapia combinada tal como descrito em 3.3 e prosseguiu-se com a distribuição das 4 populações celulares por placas de 6 poços, como previamente descrito em 3.2.1.

Com os resultados obtidos, foi possível estabelecer as curvas de sobrevivência celular para as linhas celulares WiDr e WiDr/10x. Determinaram-se também os respetivos  $DL_{50}$  e avaliou-se a resposta das linhas celulares à irradiação combinada com o butirato comparativamente à irradiação isoladamente.

### 3.3.3. Avaliação da Morte Celular

#### 3.3.3.1. Avaliação da Viabilidade Celular e dos Tipos de Morte Induzidos

Para determinar até que ponto a inibição da proliferação celular induzida pela combinação de butirato e pela radiação ionizante se traduz numa diminuição da viabilidade celular utilizou-se a técnica de citometria de fluxo. Esta tecnologia permite analisar e avaliar partículas suspensas num meio líquido que atravessam em fluxo rapidamente e individualmente um feixe de radiação laser (Davey & Kell, 1996).

O citómetro de fluxo divide-se em três sistemas: o fluídico que faz o transporte das suspensões em fluxo, o ótico que consiste na irradiação das células com um laser resultando na dispersão de feixes de luz que são redirecionados para fotodetetores através de filtros óticos e, por último, o eletrónico que converte os sinais de luz detetados em sinais eletrónicos processados num computador (Davey & Kell, 1996).

A análise da dispersão da luz que incide nas células é feita por *software* (Paint-a-Gate<sup>®</sup> 3.02, Machintosh Software) e permite determinar o tamanho e a complexidade das partículas. A absorção de luz, com um determinado comprimento de onda, permite que haja reemissão por fluorescência num comprimento de onda diferente, caso a célula possua um composto naturalmente fluorescente ou um ou mais anticorpos marcados com fluorocromos na sua estrutura. O isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) e a ficoeritrina são os corantes fluorescentes mais comumente usados.

Deste modo, podemos obter uma análise quantitativa da viabilidade celular e avaliar os tipos de morte induzidos pela radiação ionizante nas células tratadas previamente com o butirato através da dupla marcação com anexina V (AnV) acoplada ao fluorocromo FITC (do inglês *fluorescein isothiocyanate*) e iodeto de propídeo (IP).

A proteína anticoagulante AnV liga-se com alta afinidade a fosfolípidos aniónicos como a fosfatidilserina. Nas células viáveis, a distribuição dos fosfolípidos na bicamada da membrana celular é assimétrica, estando a fosfatidilcolina e a esfingomiéline no folheto externo da membrana celular e a fosfatidilserina no folheto interno. Nas células em apoptose, a fosfatidilserina sofre uma translocação para a camada externa que é identificada através da incubação das células com AnV-FITC. A translocação da fosfatidilserina é identificada por recetores específicos que sinalizam as células apoptóticas para a sua remoção do tecido. Este mecanismo é característico de uma apoptose inicial pois ocorre enquanto ainda existe integridade da membrana celular (Van Heerde *et al.*, 2000). O IP é um corante fluorescente com afinidade para o DNA. Contudo, por não atravessar a bicamada lipídica, apenas marca

células em apoptose tardia ou em necrose, pois têm a membrana celular comprometida (Darzynkiewicz *et al.*, 1992).

A aplicação do método da dupla marcação com AnV-FITC e IP permite agrupar e classificar as populações celulares em quatro grupos distintos, de acordo com o evidenciado na tabela 5. O grupo I é caracterizado por células viáveis as quais apresentam marcações negativas para ambas as sondas. O grupo II é caracterizado por células em apoptose inicial, com marcação positiva para a AnV-FITC e negativa para o IP. O grupo III inclui as células em apoptose tardia/necrose, com marcação positiva para ambas as sondas. Por fim, o grupo IV contabiliza as células em necrose, com marcação negativa para a AnV-FITC e positiva para o IP (Bedner *et al.*, 1999).

**Tabela 5.** Padrões de marcação com anexina V e iodeto de propídeo para os diferentes grupos de células.

Grupos	Descrição	AnV	IP
I	Células viáveis	-	-
II	Células em apoptose inicial	+	-
III	Células em apoptose tardia/necrose	+	+
IV	Células em necrose	-	+

Este ensaio foi avaliado 72 horas após a irradiação das células pois o efeito de certas vias de morte é mais notório. Assim, prepararam-se suspensões com um milhão de células e procedeu-se à centrifugação a 1300 xG durante 5 minutos. O meio foi decantado e ressuspendeu-se o *pellet* em PBS, efetuando-se uma nova centrifugação. Posteriormente, ressuspendeu-se o *pellet* em 100 µL de tampão de ligação, constituído por 0,01 M de HEPES (H7523, Sigma-Aldrich®), 0,14 M de NaCl (S7653, Sigma-Aldrich®) e 0,25 mM de CaCl<sub>2</sub> (Sigma, C4901, Sigma-Aldrich®) e incubou-se a suspensão celular com 1 µL de AnV-FITC (ANXVF, Immunotech®) e com 1 µL de iodeto de propídeo (KIT Immunotech®) durante 15 minutos, na ausência de luz e à temperatura ambiente. Depois, adicionaram-se 400 µL de tampão de ligação frio e realizou-se a análise no citómetro, utilizando os comprimentos de onda de excitação de 525 nm para a AnV-FITC e de 640 nm para o IP. Os resultados são apresentados em percentagem de células analisadas em cada grupo com base nas marcações das sondas AnV-FITC e IP.

### 3.3.3.2. Avaliação da Expressão de BAX e de BCL-2

O controlo das vias de ativação da apoptose está relacionado com as diversas moléculas envolvidas nas vias extrínseca ou intrínseca deste tipo de morte. A via extrínseca é caracterizada pela ativação de uma cascata de caspases. A via intrínseca é ativada pelo stresse intracelular ou extracelular, como a hipoxia, danos no DNA ou ativação de oncogenes, e desencadeia o aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas como a BAX, a BID e a BAK. Por outro lado, a expressão de BCL-2 e de BCL-XL inibe a apoptose porque previne a libertação do citocromo-c (Hengartner, 2000).

As proteínas mais estudadas são a BAX e a BCL-2 e encontram-se sobreexpressas no CCR, podendo constituir um potencial marcador molecular (Khodapasand *et al.*, 2015). Estas proteínas são capazes de formar homodímeros (BAX-BAX e BCL-2-BCL-2) e heterodímeros (BAX-BCL-2). O equilíbrio entre homodímeros e heterodímeros pode definir o balanço pró-apoptótico ou anti-apoptótico nas células. Depois de um estímulo de morte, a proteína BCL-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, ao silenciar a BAX ou competir com os locais de ligação da BAX à membrana externa mitocondrial. Assim, a BAX promove a apoptose pela interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas anti-apoptóticas (Murphy *et al.*, 2000). Deste modo, quanto maior a razão BAX/BCL-2, maior a tendência para as células entrarem em apoptose.

Neste ensaio, pretendeu-se avaliar o efeito do butirato e da radiação ionizante na expressão da razão entre as proteínas BAX e BCL-2 recorrendo à técnica de citometria de fluxo.

Para esta avaliação, 72 horas após a irradiação, prepararam-se suspensões com um milhão de células e centrifugaram-se a 1300 xG durante 5 minutos. O meio foi decantado e ressuspenderam-se os *pellets* em PBS, procedendo-se a uma nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 100 µL de solução de fixação (Immunostep<sup>®</sup>, Intracell<sup>™</sup>). De seguida, colocaram-se as suspensões a repousar no escuro e à temperatura ambiente durante 15 minutos. Depois, adicionaram-se 2 mL de PBS para lavar as células e centrifugaram-se novamente. Depois de decantado o sobrenadante, incubaram-se as células com 100 µL de solução de permeabilização (Immunostep<sup>®</sup>, Intracell<sup>™</sup>), 2,5 µL do anticorpo anti-BAX-PE (Santa Cruz, sc-20067 PE) e 2,5 µL de anti-BCL-2-FITC (Santa Cruz, sc-509 FITC), durante 15 minutos no escuro e à temperatura ambiente. Seguidamente, realizou-se uma nova lavagem com 2 mL de PBS e centrifugaram-se nas mesmas condições. Após a ressuspensão dos *pellets* com 400 µL de PBS, as suspensões celulares foram guardadas a 4°C até à leitura no citómetro. 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 e normalizados os resultados ao controlo.

### 3.3.3.3. Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial

O transporte de eletrões na cadeia respiratória mitocondrial durante a fosforilação oxidativa liberta energia que é armazenada na forma de um gradiente protónico. Além disso, forma-se também um gradiente eletroquímico, denominado por potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Nas células viáveis, o  $\Delta\Psi_m$  assume valores negativos entre 180 e 200 mV no interior da membrana mitocondrial interna (Bedner *et al.*, 1999). Pelo estudo do potencial de membrana mitocondrial, podemos avaliar também a morte celular, pois uma diminuição nos valores de  $\Delta\Psi_m$  é um dos eventos iniciais da apoptose. O controlo do  $\Delta\Psi_m$  parece estar também relacionado com as interações entre os membros da família de proteínas BCL-2 que estão localizados na membrana mitocondrial e com a formação de homo ou de heterodímeros (Bedner *et al.*, 1999).

A sonda JC-1 (do inglês *5,5',6,6'-tetrachloro-1,18,3,3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide*) é uma sonda fluorescente capaz de medir especificamente alterações no  $\Delta\Psi_m$  (Bortner *et al.*, 1999). O JC-1 é um catião lipofílico com a capacidade de formar agregados (A) ou monómeros (M), dependendo do estado do potencial da membrana mitocondrial (polarizado versus despolarizado). As duas formas de JC-1 emitem fluorescência em comprimentos de onda diferentes. Nas células viáveis, o  $\Delta\Psi_m$  elevado permite a formação de agregados (A) de JC-1, que são detetáveis através de emissão de fluorescência ao comprimento de onda de 585 nm (fluorescência vermelha). Quando há uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial, ou despolarização da célula, o JC-1 é expulso da mitocôndria na forma de monómeros (M), podendo ser identificado por emissão de fluorescência com o comprimento de onda de 525 nm (fluorescência verde). Assim, a razão entre a fluorescência emitida pelo JC-1 na forma de monómeros e a fluorescência emitida na forma de agregados (M/A), é determinada por citometria de fluxo e permite ter uma estimativa do potencial de membrana mitocondrial (Salvioli *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 2003).

Para este procedimento, 72 horas após a irradiação, as suspensões de um milhão de células foram centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos. O meio foi decantado e os *pellets* foram ressuspensos em tampão PBS. De seguida, as células foram incubadas com 1  $\mu$ L de JC-1 a partir de uma solução com concentração de 5 mg/mL (Molecular Probes<sup>®</sup>, Invitrogen<sup>™</sup>), na ausência de luz e à temperatura de 37°C, durante 15 minutos. A deteção foi efetuada

utilizando um comprimento de onda de excitação de 490 nm. Os resultados obtidos são apresentados como MIF, tanto para a forma de monómeros, bem como para a forma de agregados, tendo-se calculado posteriormente a razão M/A e normalizado os resultados em relação ao controlo.

#### **3.3.3.4. Avaliação do Ciclo Celular**

O ciclo celular consiste num processo sequencial através do qual a célula duplica o seu material genético e se divide em duas células-filhas idênticas. O ciclo divide-se em quatro fases principais. O material genético é replicado durante a fase S (síntese) e, posteriormente, os cromossomas duplicados são separados equitativamente pelas células-filhas na fase M (mitose). Entre estas fases, existe ainda a fase G1 (do inglês *gap-1*) antes da fase S e a fase G2 (do inglês *gap-2*) antes da mitose. As células na fase G1, antes de iniciarem a replicação do DNA, podem entrar num estado de repouso, denominado de fase G0. A fase pré-G0 corresponde ao pico apoptótico (Vermeulen *et al.*, 2003).

De forma a avaliar os efeitos da radiação ionizante no ciclo celular das células com a presença do butirato, recorreu-se a um método que utiliza uma solução de IP e ribonuclease (RNase). Como referido anteriormente, o IP é um composto com a capacidade de se intercalar no DNA e no RNA pelo que só é possível conseguir especificidade para a marcação do DNA através da remoção do RNA pelo uso de RNase. A análise do ciclo celular por citometria de fluxo é representada num histograma de intensidade de fluorescência. A quantidade de DNA presente em cada fase do ciclo celular e a intensidade da fluorescência emitida pelo IP permitem dividir as células em quatro subpopulações diferentes, correspondentes às fases G0, G1, S ou G2/M (Bryan *et al.*, 2010).

Assim, 72 horas após a irradiação, as suspensões com um milhão de células foram centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionaram-se aos *pellets* 200 µL de etanol a 70% com o tubo em agitação no vórtex e incubaram-se durante 30 minutos, no escuro e a 4°C. Seguidamente, lavaram-se as células com 2 mL de PBS e centrifugaram-se novamente. Depois de decantado o sobrenadante, adicionaram-se 200 µL de solução IP/RNase (Immunostep®) e incubaram-se os *pellets* durante 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. A deteção foi feita utilizando o comprimento de onda de excitação de 488 nm. Os resultados foram apresentados em percentagem de células existentes em cada fase do ciclo celular: pré-G0, G0/G1, S e G2/M.

### 3.3.4. Avaliação do Stresse Oxidativo e das Defesas Antioxidantes

Pretendeu-se também avaliar qual o efeito da combinação do butirato com a radioterapia a nível do stresse oxidativo de ambas as linhas celulares em estudo. Para isso, recorreu-se igualmente à citometria de fluxo para avaliar a produção intracelular de várias espécies reativas de oxigénio como os peróxidos e o anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), e ainda as defesas antioxidantes. Estes ensaios foram medidos 24 horas após a irradiação das células porque as espécies reativas de oxigénio têm um tempo de vida curto.

#### 3.3.4.1. Avaliação da Produção Intracelular de Peróxidos

A produção intracelular de peróxidos após o tratamento com radiação ionizante foi determinada através da quantificação da oxidação intracelular da sonda 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH<sub>2</sub>-DA, Sigma®). O DCFH<sub>2</sub>-DA é uma sonda lipossolúvel não-fluorescente que atravessa a membrana celular devido à presença de grupos acetatos. No interior das células, estes grupos são removidos por esterases, o que determina a acumulação de DCFH<sub>2</sub> no citoplasma. Por sua vez, o DCFH<sub>2</sub> é oxidado por peróxidos intracelulares em 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), uma molécula altamente fluorescente. O comprimento de onda de excitação desta sonda é de 488 nm, enquanto a fluorescência de emissão é de cor verde com um comprimento de onda de 530 nm. A intensidade de fluorescência é proporcional à concentração intracelular de peróxidos, destacando-se a importância do peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Brömme *et al.*, 2008).

Para esta avaliação, as suspensões celulares com um milhão de células foram centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos. Depois de decantar o meio, os *pellets* foram ressuspensos em PBS e realizou-se a incubação com DCFH<sub>2</sub>-DA (Molecular Probes®, Invitrogen™), numa concentração de 5 µM, dissolvida em DMSO, durante 45 minutos, na ausência de luz e à temperatura de 37°C. Seguidamente, adicionou-se PBS e centrifugaram-se as suspensões celulares. Os *pellets* foram ressuspensos em 400 µL de solução tampão PBS. A deteção por citometria de fluxo foi realizada usando um comprimento de onda de excitação de 488 nm e de emissão de 530 nm. Os resultados foram normalizados à condição controlo, para cada linha celular, e calculou-se a razão entre a medição da condição experimental e do respetivo controlo.



### **3.3.4.2. Avaliação da Produção Intracelular do Anião Superóxido**

O anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) foi avaliado através da marcação com a sonda dihidroetídeo (DHE, Sigma®). Esta sonda atravessa facilmente a bicamada de fosfolípidos das membranas celulares e é oxidada em etídeo pelo anião superóxido. Este composto consegue intercalar-se no DNA e emitir fluorescência de cor vermelha. Esta reação é específica para o anião superóxido, sendo mínima a oxidação induzida pelo peróxido de hidrogénio e pelo ácido hipocloroso (Tarpey *et al.*, 2004).

Neste ensaio, as suspensões celulares com um milhão de células foram centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos. Depois de decantar o sobrenadante, ressuspenderam-se os *pellets* em tampão PBS e incubaram-se as suspensões com DHE dissolvido em DMSO, numa concentração final de 5  $\mu$ M, durante 15 minutos, à temperatura de 37°C e na ausência de luz. Após a incubação, adicionou-se PBS e procedeu-se a uma nova centrifugação e à ressuspensão em 400  $\mu$ L de tampão PBS. A deteção foi efetuada com um comprimento de onda de excitação de 620 nm. Os resultados obtidos foram posteriormente normalizados ao controlo, como referido na secção 3.3.4.1.

### **3.3.4.3. Avaliação da Expressão da Glutathiona Reduzida**

A glutathiona reduzida (GSH) é um nucleófilo forte e confere proteção às células contra danos provocados por radicais livres, oxidantes e eletrófilos. A modulação das concentrações de GSH pode influenciar a sensibilidade das células à radioterapia, bem como o efeito citotóxico de diferentes agentes quimioterapêuticos (Rice *et al.*, 1986).

Para a avaliação e a marcação de GSH, utilizou-se um corante fluorescente denominado de alaranjado de mercúrio. Este composto tem uma cinética de ligação ao GSH superior à da sua ligação aos grupos sulfidril das proteínas. A ligação do corante ao GSH dá origem a um composto que emite fluorescência vermelha quando excitado com um laser de árgon com um comprimento de onda de 488 nm (O'Connor *et al.*, 1988).

Assim, para este ensaio, centrifugaram-se as suspensões com um milhão de células a 1300 xG durante 5 minutos. Depois de decantado o sobrenadante, os *pellets* foram ressuspensos em 1 mL de tampão PBS. Em seguida, adicionou-se o alaranjado de mercúrio (Sigma®) na concentração de 40  $\mu$ M, deixando-se a incubar durante 15 minutos na ausência de luz e à temperatura de 37°C. Após a marcação, as células foram novamente centrifugadas e os *pellets* foram ressuspensos em 400  $\mu$ L de PBS. A deteção foi efetuada com o comprimento de onda de excitação de 620 nm. O processamento dos dados foi feito da mesma forma descrita na secção 3.3.4.1.

### 3.4. Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados recorreu-se ao *software* IBM® SPSS® Statistics, versão 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, EUA). A análise descritiva das variáveis quantitativas do estudo foi calculada a partir de estimadores de tendência central, de dispersão e de localização.

Na análise inferencial, foi utilizado o teste Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade de distribuição das variáveis quantitativas.

Na análise da proliferação celular através do ensaio de MTT, os valores experimentais obtidos foram ajustados a um modelo sigmoidal de concentração-resposta utilizando o *software* OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, EUA), de acordo com a equação 4, onde  $x_0$  corresponde ao valor que inibe a proliferação a 50% ( $IC_{50}$ ).

$$Proliferação (\%) = \frac{100}{1 + 10^{p \cdot (\log x_0 - x)}} \quad (\text{Eq. 4})$$

As curvas de sobrevivência celular foram ajustadas ao modelo linear quadrático, de acordo com a equação 3, utilizando o *software* OriginPro.

A comparação entre as condições experimentais de cada linha celular, no que diz respeito aos parâmetros da viabilidade e ao ciclo celular, foi realizada segundo o teste ANOVA de um factor (em caso de distribuição normal e homogeneidade de variâncias) ou segundo o teste Krustal-Wallis (em caso contrário) e as comparações múltiplas segundo a correção de Bonferroni. Na comparação da expressão de 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.

Os valores experimentais obtidos para a produção de lactato por RMN foram ajustados a um modelo linear utilizando o *software* OriginPro, de acordo com a equação 4, onde  $m$  representa o declive da reta. Este parâmetro foi comparado entre condição controlo e tratamento segundo o teste t de Student para amostras independentes.

$$y = m \cdot x \quad (\text{Eq. 5})$$

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



## IV. RESULTADOS



Este trabalho foi elaborado com o intuito de perceber se o butirato pode constituir um radiosensibilizante para o CCR e melhorar a eficácia do tratamento de radioterapia. Inicialmente, de acordo com as metodologias descritas no capítulo III, foi estabelecida uma linha celular radiorresistente a partir de uma linha celular humana de CCR, sendo avaliada a atividade metabólica com diferentes concentrações de butirato e o efeito da sua presença no metabolismo da linha celular radiorresistente (4.1). Posteriormente, foi avaliada a resposta das linhas celulares em estudo à combinação do butirato com a radioterapia (4.2).

#### 4.1. Indução de Resistência à Radioterapia

##### 4.1.1. Avaliação da Sobrevivência Celular

A sobrevivência celular das linhas celulares em estudo foi avaliada após o ensaio clonogénico se ter desenrolado durante 12 dias. Os resultados permitiram determinar os fatores de sobrevivência das células em resposta a doses crescentes de radiação e obter as curvas de dose-resposta, as quais foram ajustadas ao modelo linear-quadrático. Este ensaio contou com dados anteriormente obtidos relativos ao tratamento das linhas celulares WiDr e WiDr/10x apenas com radioterapia, ou seja, sem a presença do butirato (Ferreira, 2014).

A tabela 6 mostra os valores de  $DL_{50}$  determinados após a radioterapia, utilizada isoladamente, nas duas linhas celulares em estudo. A linha celular WiDr/10x apresentou um valor de  $DL_{50}$  superior à linha celular WiDr, respetivamente de 4,801 Gy e de 2,482 Gy.

**Tabela 6.** Valores dos parâmetros obtidos a partir do ajuste das curvas de sobrevivência celular das linhas WiDr e WiDr/10x ao modelo linear-quadrático.

Linha celular	$DL_{50}$ (Gy)	$r^2$
WiDr	2,482	0,955
WiDr/10x	4,801	0,944

##### 4.1.2. Avaliação da Atividade Metabólica

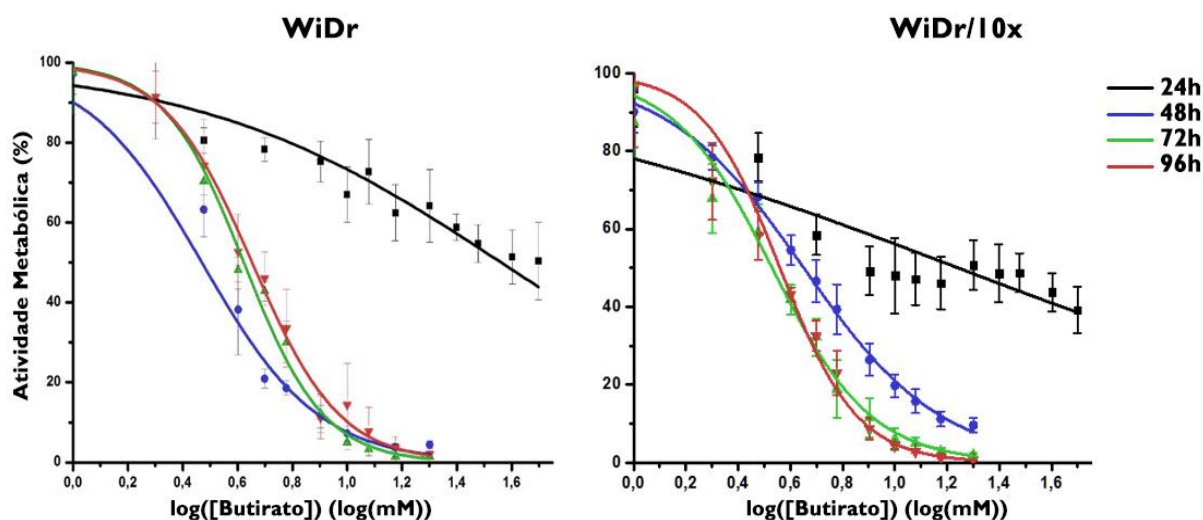
Como foi referido, o estudo da proliferação celular foi realizado pela avaliação da atividade metabólica através do ensaio de MTT. Os resultados obtidos permitiram determinar o valor da atividade metabólica das células em resposta à incubação com concentrações crescentes de butirato, sendo estes apresentados em percentagem relativamente aos controlos (culturas celulares sem butirato). Para efeitos de comparação apresentam-se

igualmente dados relativos à avaliação da atividade metabólica da linha celular nativa WiDr, anteriormente obtidos no trabalho realizado pelos mestres Telmo Gonçalves e João Encarnação. Assim, a partir dos valores de atividade metabólica foi possível traçar curvas de concentração-resposta das linhas celulares WiDr e WiDr/10x (Figura 18) e calcular os respetivos valores de  $IC_{50}$  para os quatro tempos de incubação analisados (Tabela 7).

A análise da figura 18 mostrou que a inibição da atividade metabólica das duas linhas celulares é dependente do aumento da concentração de butirato em todos os tempos de incubação. Porém, esse efeito não foi tão notório às 24 horas, o que impossibilitou o cálculo do valor de  $IC_{50}$  para a linha celular WiDr.

Pela análise da tabela 7 verifica-se que após as 48 horas de incubação a inibição da atividade metabólica não é dependente do tempo de exposição ao butirato, na medida em que às 48 horas os valores de  $IC_{50}$  obtidos foram de 2,84 mM para a linha celular WiDr e de 4,48 mM para a linha celular WiDr/10x, e às 96 horas foram de 4,44 mM para a linha celular WiDr e de 3,63 mM para a linha celular WiDr/10x. Verifica-se igualmente que não há diferenças significativas entre a linha celular radiorresistente e a linha celular nativa. Contudo, a linha celular WiDr/10x aparenta ser menos sensível às 48 horas, apresentando um valor de  $IC_{50}$  superior à linha celular WiDr.

A partir destes resultados foi escolhida a concentração de butirato para os estudos subsequentes em ambas as linhas celulares, nomeadamente para a avaliação da combinação do efeito do butirato no tratamento das células com radioterapia (capítulo 4.2), sendo essa concentração correspondente ao valor de  $IC_{50}$  obtido às 48 horas para as linhas celulares WiDr e WiDr/10x. Como referido anteriormente, as células foram sujeitas ao butirato durante 24 horas de forma a não ocorrer um efeito citotóxico por parte deste.



**Figura 18.** Atividade metabólica às 24, 48, 72 e 96 horas e respetivas curvas de concentração-resposta das linhas celulares WiDr e WiDr/10x em resposta à incubação com butirato. Os resultados representam a média e o desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes realizadas em duplicado ( $n \geq 6$ ).

**Tabela 7.** Valores de IC<sub>50</sub> e respetivos r<sup>2</sup> (coeficiente de determinação) obtidos para as linhas celulares WiDr e WiDr/10x após incubação com o butirato durante 24, 48, 72 e 96 horas.

Linha celular	Tempo de incubação (h)	IC <sub>50</sub> (mM)	r <sup>2</sup>
WiDr	24	*	*
	48	2,84	0,96
	72	4,19	0,98
	96	4,44	0,98
WiDr/10x	24	17,45	0,71
	48	4,48	0,99
	72	3,39	0,99
	96	3,63	0,99

\*não foi possível calcular

Relativamente aos tempos de duplicação celular, verificou-se que a linha celular WiDr/10x apresentou um tempo superior (30,86 horas) relativamente à linha celular nativa WiDr (26,04 horas), como podemos ver na tabela 8.

**Tabela 8.** Valores do tempo de duplicação celular obtidos para as linhas celulares WiDr e WiDr/10x.

Linha celular	Tempo de duplicação celular (h)
WiDr	26,04
WiDr/10x	30,86

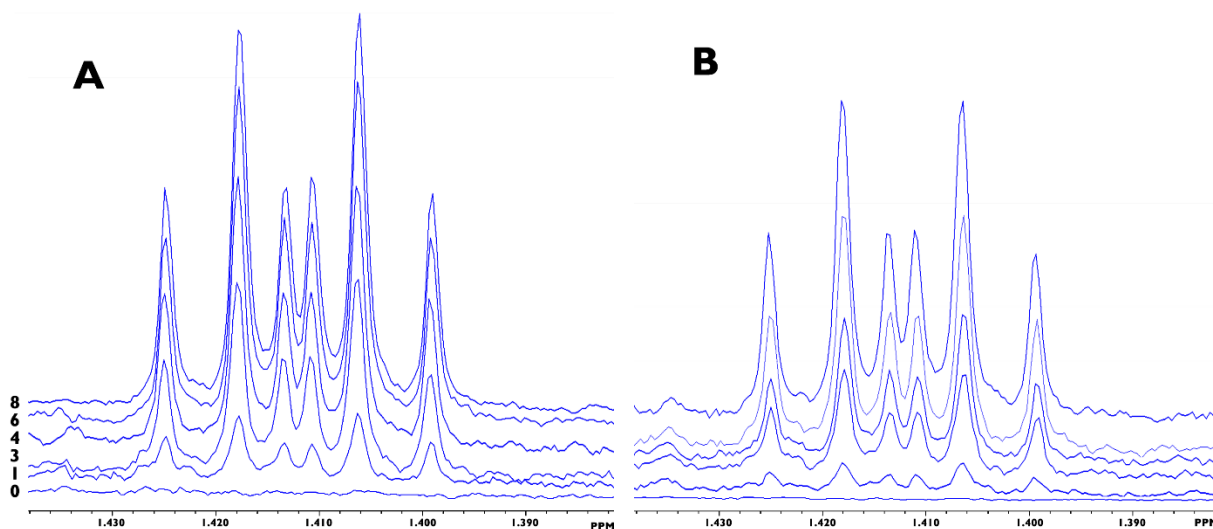
#### 4.1.3. Avaliação do Efeito do Butirato no Metabolismo

O fluxo glicolítico da linha celular radorresistente WiDr/10x foi avaliado através de espectroscopia de RMN com o objetivo de determinar alterações na atividade metabólica promovidas pelo butirato. O marcador isotópico utilizado para este ensaio foi a glicose uniformemente marcada com carbono-13 ([U-<sup>13</sup>C]glicose).

Desta forma, efetuou-se a determinação da produção de [U-<sup>13</sup>C]lactato pelas células WiDr/10x ao longo do tempo, na ausência do butirato (controlo) e na presença do butirato. As expansões de ressonância apresentadas na figura 19 referem-se ao [U-<sup>13</sup>C]lactato produzido e existente no meio de cultura ao fim de 0, de 1, de 3, de 4, de 6 e de 8 horas de incubação com o meio suplementado com [U-<sup>13</sup>C]glicose.

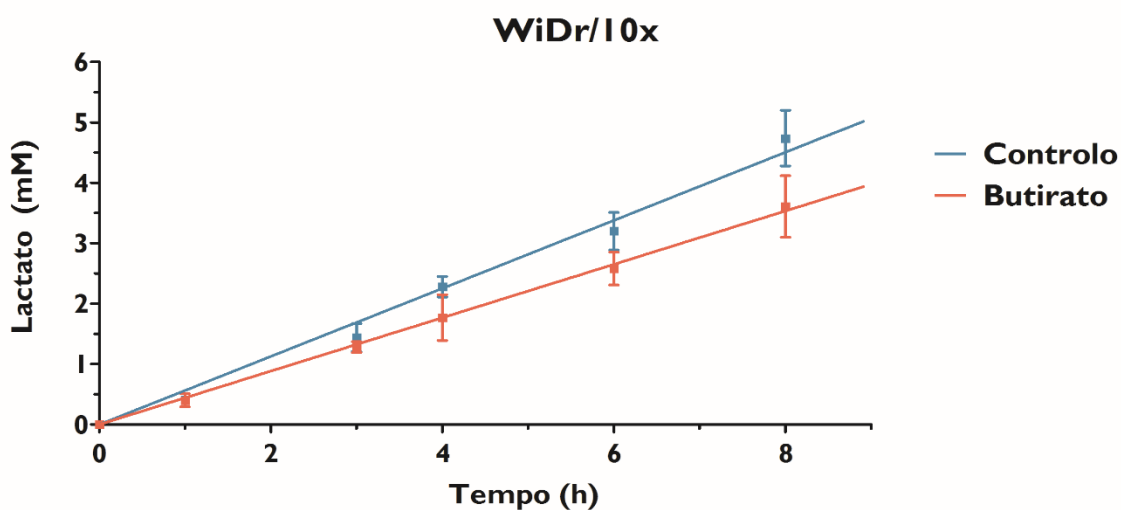


Pela análise qualitativa da figura 19 observa-se uma diminuição de tamanho nos picos de lactato marcado com a presença do butirato no meio de cultura das células.



**Figura 19.** Expansão de um dos satélites de  $[U-^{13}C]$ lactato no espectro de  $^1H$ -RMN do meio de cultura da linha celular WiDr/10x, respeitante ao conteúdo em lactato durante os diferentes tempos de incubação (0, 1, 3, 4, 6 e 8 horas) nas duas condições estudadas: controlo (A) e presença do butirato (B). A ressonância é constituída por 6 picos que resultam do acoplamento homo- ( $^3J_{HH}$ ) e heteronuclear ( $^2J_{HC}$  e  $^3J_{HC}$ ).

Na figura 20 está representada a evolução da concentração de  $[U-^{13}C]$ lactato no meio de cultura obtida através da quantificação dos picos da figura 19 e respetiva normalização ao controlo (valina). Nesta representação foi possível ajustar a uma função linear e determinar os valores do declive da reta e do erro-padrão associados, apresentados na tabela 9. Pela análise do gráfico pode notar-se uma diminuição estatisticamente significativa do valor do declive da reta de  $0,563 \pm 0,004$  para  $0,442 \pm 0,017$  da condição controlo para a condição com a presença do butirato ( $p=0,021$ ).



**Figura 20.** Concentração de  $[U-^{13}C]$ lactato no meio de cultura ao longo das 8 horas de incubação na linha celular WiDr/10x nas duas condições estudadas: controlo e incubação com butirato. Os resultados em cada tempo expressam a média e desvio padrão de 4 experiências independentes.

**Tabela 9.** Valores de declive da resposta-linear relativos à produção de lactato pelas células WiDr/10x. Os resultados são expressos como declive e erro-padrão, na condição controlo e na presença do butirato.

Condição	Declive	Erro-padrão
Controlo	0,563	0,017
Butirato	0,442	0,004

Os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN e de  $^{13}\text{C}$ -RMN dos extratos de metanol de ambas as condições foram comparados para avaliar os efeitos do butirato no estado *redox* do citosol, no acoplamento entre a glicólise e o ciclo de *Krebs*, no seu *turnover* e no processo de anaplerose. Na figura 21 encontram-se os gráficos referentes aos resultados preliminares deste ensaio.

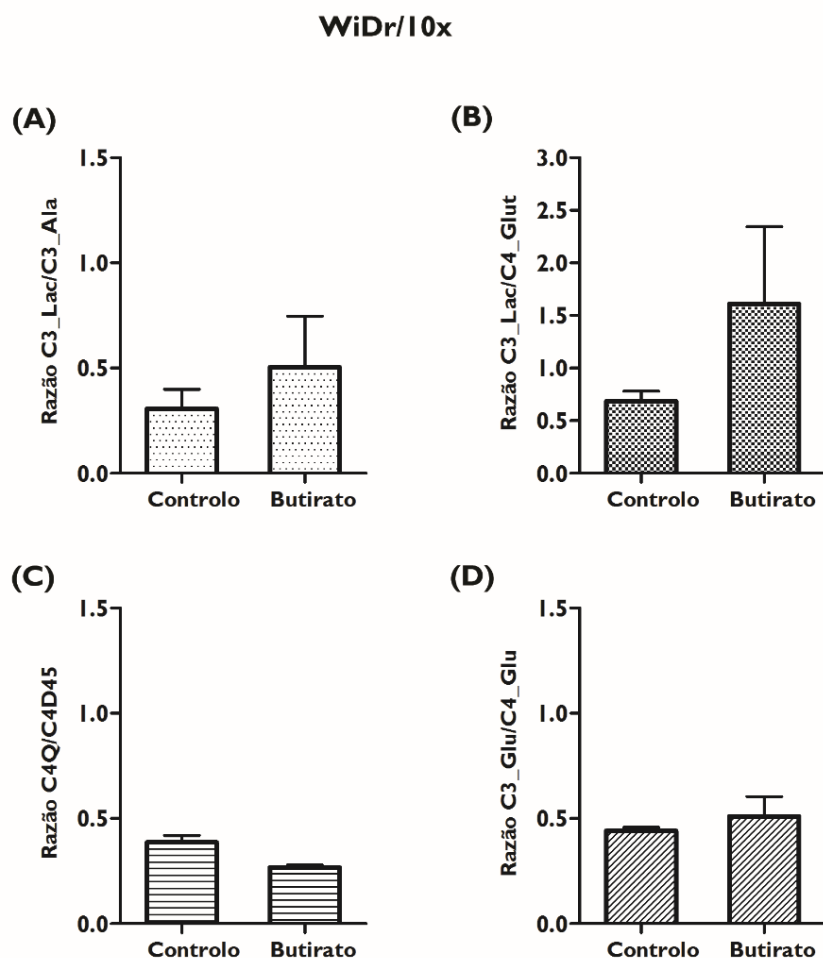
O efeito do butirato no estado *redox* do citosol foi avaliado nas duas condições em estudo através da razão entre o carbono 3 do lactato e o carbono 3 da alanina (C3\_Lac/C3\_Ala). A um valor mais elevado da razão corresponde um maior incremento do processo glicolítico na condição testada. No gráfico (A) da figura 21 estão apresentados os resultados da quantificação da razão C3\_Lac/C3\_Ala, a partir da qual se observou que a presença do butirato promoveu uma tendência para o aumento da razão C3\_Lac/C3\_Ala de  $0,307 \pm 0,092$  para  $0,505 \pm 0,242$ .

Por sua vez, a razão entre o C3\_Lac e o carbono 4 do glutamato (C4\_Glut) permitiu avaliar o efeito do butirato no acoplamento entre a glicólise e o ciclo de *Krebs*. Pela análise dos resultados representados no gráfico (B) da figura 21, verificou-se uma tendência para o aumento da razão C3\_Lac/C4\_Glut de  $0,687 \pm 0,095$  no controlo para  $1,610 \pm 0,734$  na presença do butirato.

O *turnover* do ciclo de *Krebs* foi avaliado pela quantificação da razão Q/D45 do carbono 4 do glutamato. A um valor da razão Q/D45 mais elevado corresponde um número maior de voltas do ciclo de *Krebs* e, por conseguinte, maior é a velocidade do seu *turnover*. Estes resultados estão representados no gráfico (C) da figura 21, onde se pode verificar que o butirato induziu uma tendência para a diminuição desta razão de  $0,387 \pm 0,033$  para  $0,268 \pm 0,011$ .

Por fim, o efeito do butirato na anaplerose, ou seja, no reabastecimento dos metabolitos intermédios nas vias metabólicas, foi avaliado através da razão entre o carbono 3 e o carbono 4 do glutamato. Os resultados desta quantificação estão representados no gráfico (D) da figura 21, onde se pode verificar que a presença do butirato não levou a diferenças da

razão C3\_Glu/C4\_Glu, apresentando valores de  $0,442 \pm 0,016$  para  $0,511 \pm 0,094$  para a condição controlo e para a condição com butirato, respetivamente.



**Figura 21.** Efeitos do butirato no estado *redox* do citosol (A), no acoplamento entre a glicólise e o ciclo de *Krebs* (B), no seu *turnover* (C) e no processo de anaplerose (D) na linha celular WiDr/10x nas condições controlo e com butirato. Os valores apresentados nos quatro gráficos exprimem a média e desvio padrão de pelo menos 2 experiências independentes.

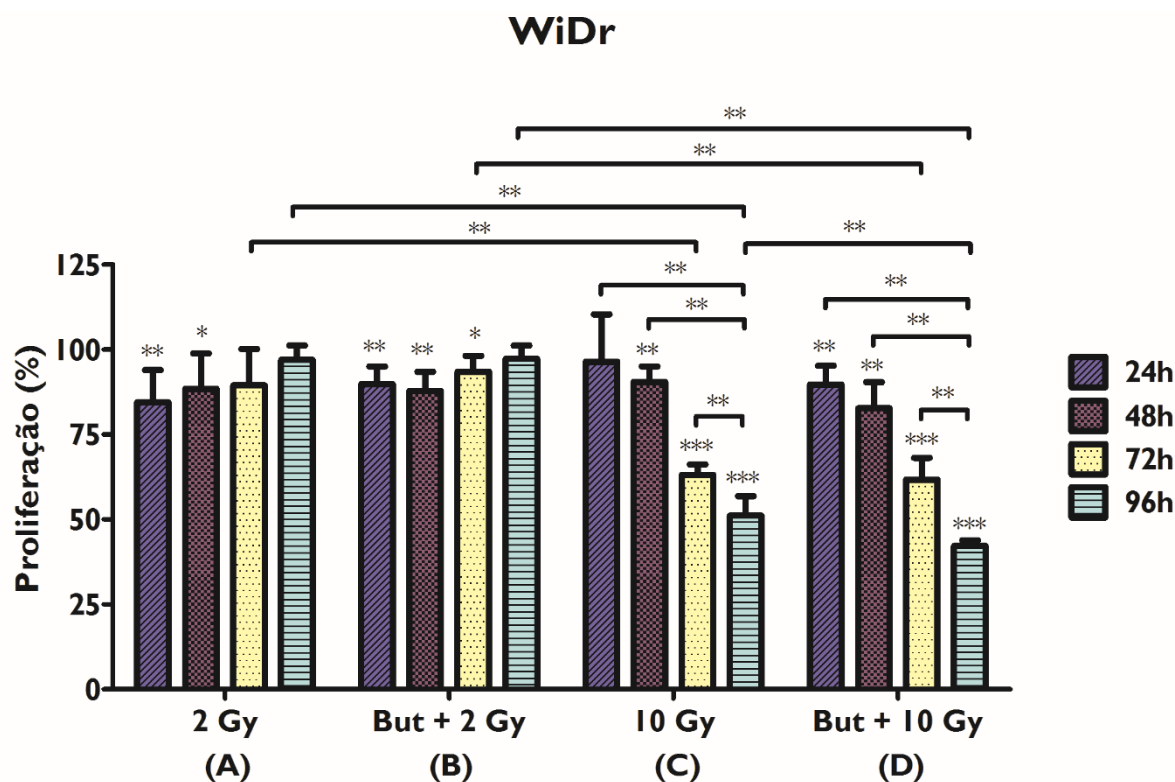
## 4.2. Avaliação do Efeito da Combinação do Butirato com Radioterapia

### 4.2.1. Avaliação da Atividade Metabólica

Prosseguiu-se com a avaliação da atividade metabólica das linhas celulares WiDr e WiDr/10x em resposta ao tratamento das células com radioterapia isoladamente ou em combinação com o butirato. Os resultados deste ensaio estão apresentados em percentagem relativamente aos respetivos controlos e encontram-se representados nos gráficos das figuras 22 e 23. Para efeitos de comparação, em todos os estudos seguintes, a condição controlo, sem butirato, foi utilizada como referência para avaliar as condições tratadas apenas com radioterapia e, de forma semelhante, a condição com butirato foi utilizada como controlo para avaliar as condições tratadas com radioterapia em combinação com o butirato.

Relativamente à linha celular nativa WiDr (Figura 22), foram observadas algumas diferenças na proliferação celular das células sujeitas a doses baixas de radiação, embora se verifiquem valores da atividade metabólica acima de 75% para todos os tempos de incubação. No tratamento sem butirato, a atividade metabólica diminuiu de forma significativa na condição de irradiação com 2 Gy às 24 h ( $p=0,005$ ) e às 48 h ( $p=0,041$ ) em relação ao controlo. Em combinação com a administração prévia do butirato verificou-se uma diminuição significativa da mesma na condição de But + 2 Gy às 24 h ( $p=0,005$ ), às 48 h ( $p=0,003$ ) e às 72 h ( $p=0,018$ ) relativamente ao controlo com a presença do butirato. Em contraste, no tratamento das células com doses de radiação mais elevadas, observou-se um maior efeito na inibição da proliferação celular. Na condição isolada de 10 Gy verificou-se que, quanto maior o tempo de incubação, maior a inibição da atividade metabólica, com diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de 24 h ( $p=0,002$ ), de 48 h ( $p=0,002$ ) e de 72 h ( $p=0,002$ ) com as 96 horas. Nesta condição obteve-se ainda significância estatística entre os valores da proliferação celular em relação ao controlo às 48 h ( $90,43\pm 4,53\%$ ;  $p=0,004$ ), às 72 h ( $63,11\pm 3,01\%$ ;  $p<0,001$ ) e às 96 h ( $51,09\pm 5,73\%$ ;  $p<0,001$ ). Na irradiação com 10 Gy combinada com butirato verificou-se a mesma dependência temporal, com diferenças estatisticamente significativas entre as 24 h ( $p=0,001$ ), as 48 h ( $p=0,001$ ) e as 72 h ( $p=0,001$ ) com as 96 horas. Neste tratamento com butirato observou-se ainda uma diminuição significativa da atividade metabólica em todos os tempos testados, comparativamente ao controlo com butirato, com os valores de  $89,61\pm 5,57\%$  às 24 h ( $p=0,003$ ), de  $82,63\pm 7,68\%$  às 48 h ( $p=0,003$ ), de  $61,71\pm 6,37\%$  às 72 h ( $p<0,001$ ) e de  $42,14\pm 1,70\%$  às 96 h ( $p<0,001$ ).

Comparando a proliferação celular entre as condições de tratamento com radioterapia isoladamente observou-se que o aumento da dose de radiação levou à inibição da atividade metabólica entre os tempos mais longos, com diminuição significativa de  $89,42\pm 10,72\%$  para  $63,11\pm 3,01\%$  às 72 h ( $p=0,002$ ) e de  $96,90\pm 4,22\%$  para  $51,09\pm 5,73\%$  às 96 h ( $p=0,002$ ), da condição de 2 Gy para a condição de 10 Gy. Esta observação foi também constatada entre as condições de combinação com butirato, verificando-se uma diminuição significativa dos valores da atividade metabólica de  $93,37\pm 4,70\%$  para  $61,71\pm 6,37\%$  às 72 h ( $p=0,002$ ) e de  $97,20\pm 3,99\%$  para  $42,14\pm 1,70\%$  às 96 h ( $p=0,001$ ), da condição de But + 2 Gy para a condição de But + 10 Gy. Além disso, estabelecendo uma comparação entre os dois tratamentos, radioterapia isolada e na combinação com o butirato, não se observaram diferenças a nível da atividade metabólica com doses baixas de radiação para nenhum dos tempos testados. No tratamento das células com as doses mais elevadas verificou-se que o efeito do butirato combinado à irradiação induziu uma diminuição da atividade metabólica face à irradiação isolada, para todos



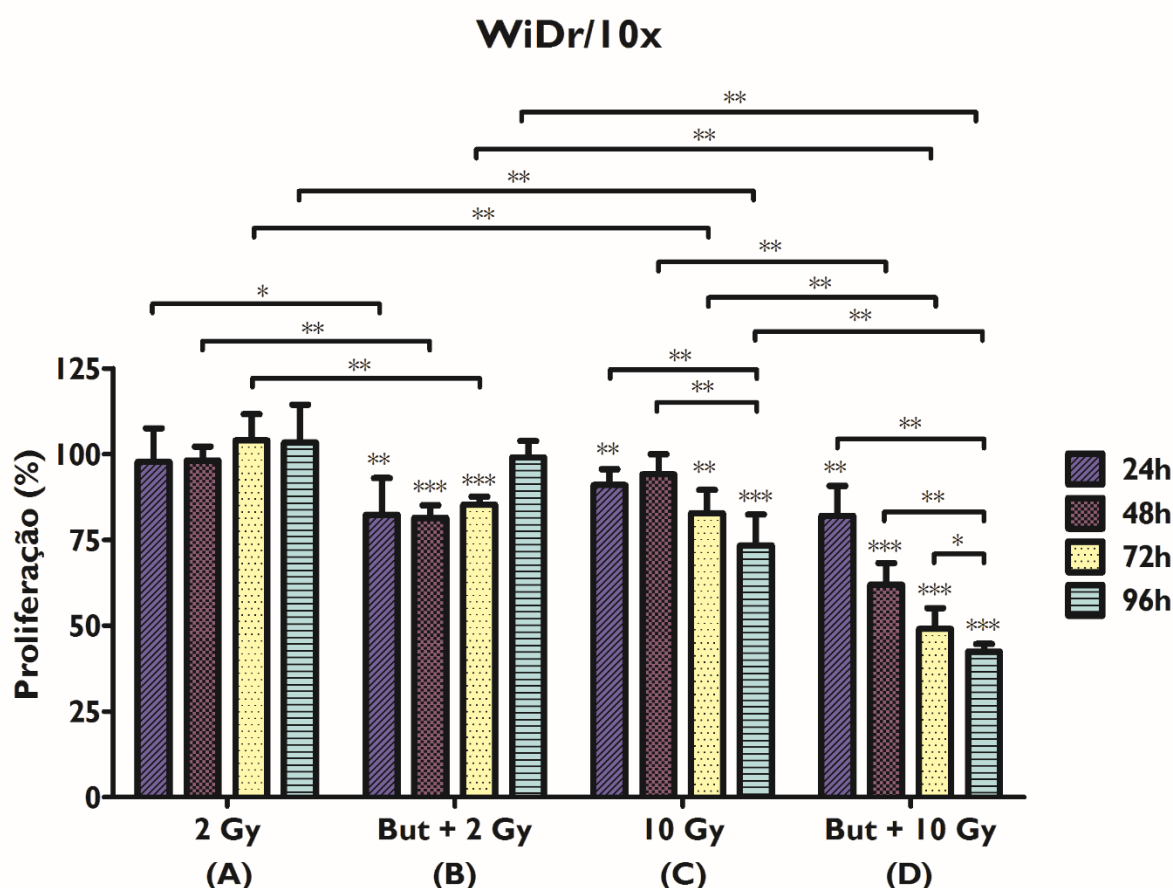
**Figura 22.** Atividade metabólica às 24, 48, 72 e 96 horas da linha celular WiDr em resposta à radioterapia isolada ou em combinação com butirato. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos 3 experiências independentes realizadas em duplicado ( $n \geq 6$ ). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com \* para  $p < 0,05$ , com \*\* para  $p < 0,01$  e com \*\*\* para  $p < 0,001$ , sendo que as significâncias assinaladas em (A) e (C) são referentes ao controlo sem butirato e em (B) e (D) referentes ao controlo na presença do butirato, para os tempos de incubação respetivos.

os tempos estudados, constatando-se diferenças estatisticamente significativas às 96 horas ( $p = 0,005$ ).

Por sua vez, a análise do gráfico referente à linha celular radorresistente WiDr/10x (Figura 23) mostrou que o tratamento com as doses de radiação baixas levou a alterações na atividade metabólica apenas com a presença do butirato nas células, apesar de ainda se verificarem proliferações acima de 75% para todos os tempos de incubação para a condição de But + 2 Gy, assim como para a condição de 2 Gy. Em combinação com o butirato, na condição de But + 2 Gy, foram verificadas diminuições significativas da atividade metabólica às 24 h ( $p = 0,005$ ), às 48 h ( $p < 0,001$ ) e às 72 h ( $p < 0,001$ ) relativamente ao controlo com butirato. No tratamento com as doses de radiação mais elevadas observou-se um maior efeito na inibição da proliferação celular. Na condição de 10 Gy observou-se uma inibição da atividade metabólica pouco dependente do aumento do tempo de incubação, tendo-se verificado significâncias estatísticas entre as 24 h ( $p = 0,005$ ) e as 48 h ( $p = 0,005$ ) com as 96 horas. Nesta condição observou-se uma diminuição significativa da atividade metabólica em relação ao controlo às 24 h ( $90,97 \pm 4,65\%$ ;  $p = 0,005$ ), às 72 h ( $82,74 \pm 6,79\%$ ;  $p = 0,002$ ) e às 96 h

(73,35±9,05%;  $p<0,001$ ), sendo este último o único valor de atividade metabólica abaixo de 75%. Em combinação com o butirato foi observada uma clara dependência temporal na inibição da atividade metabólica na condição de But + 10 Gy, sendo que esta atingiu um mínimo às 96 horas, estatisticamente inferior aos valores obtidos às 24 h ( $p=0,003$ ), às 48 h ( $p=0,002$ ) e às 72 h ( $p=0,014$ ). Além disso, nesta condição verificou-se uma diminuição significativa da atividade metabólica em relação ao controlo para todos os tempos testados, com valores de 82,06±8,66% às 24 h ( $p=0,002$ ), de 61,92±6,37% às 48 h ( $p<0,001$ ), de 49,06±6,03% às 72 h ( $p<0,001$ ) e de 42,43±2,25% às 96 h ( $p<0,001$ ).

Quando avaliada a comparação entre as condições de tratamento com radioterapia isoladamente, é possível observar que o aumento da dose de radiação induziu a inibição da proliferação celular apenas nos tempos mais longos. A atividade metabólica diminuiu de forma significativa de 103,94±7,74% para 82,74±6,79% às 72 h ( $p=0,005$ ) e de 103,36±11,03% para 73,35±9,05% às 96 h ( $p=0,001$ ) quando comparadas a condição de 2 Gy com a condição de 10 Gy, respetivamente. Com o butirato combinado com a radioterapia nas células



**Figura 23.** Atividade metabólica às 24, 48, 72 e 96 horas da linha celular WiDr/10x em resposta à radioterapia isolada ou em combinação com butirato. Os resultados expressam a média e o desvio padrão ( $n\geq 6$ ). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com \* para  $p<0,05$ , com \*\* para  $p<0,01$  e com \*\*\* para  $p<0,001$ , sendo que as significâncias assinaladas em (A) e (C) são referentes ao controlo sem butirato e em (B) e (D) referentes ao controlo na presença do butirato, para os tempos de incubação respetivos.

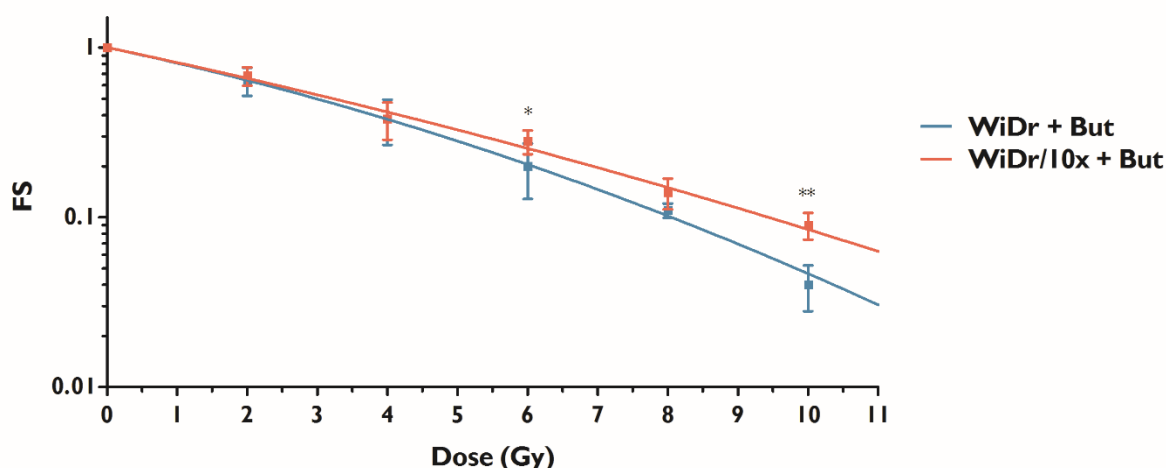
radiorresistentes observou-se o mesmo efeito na atividade metabólica. Esta diminuiu significativamente de  $81,42 \pm 3,71\%$  para  $61,92 \pm 6,37\%$  às 48 h ( $p=0,002$ ), de  $85,24 \pm 2,36\%$  para  $49,06 \pm 6,03\%$  às 72 h ( $p=0,001$ ) e de  $99,03 \pm 4,78$  para  $42,43 \pm 2,25\%$  às 96 h ( $p=0,001$ ) quando comparadas a condição de But + 2 Gy para a condição de But + 10 Gy, respetivamente. Por fim, estabelecendo a comparação entre a irradiação sem butirato e com butirato, observou-se que a irradiação combinada com o butirato induziu a inibição da atividade metabólica em todos os tempos estudados. Entre as condições de 2 Gy e de But + 2 Gy foi possível constatar diferenças com significância estatística às 24 h ( $p=0,038$ ), às 48 h ( $p=0,002$ ) e às 72 h ( $p=0,002$ ). Verificaram-se também diferenças significativas às 48 h ( $p=0,002$ ), às 72 h ( $p=0,001$ ) e às 96 h ( $p=0,001$ ) entre as condições de 10 Gy e de But + 10 Gy.

Através da comparação entre as duas linhas celulares, foi possível concluir que a linha celular radiorresistente WiDr/10x aparenta ser menos sensível ao tratamento de radioterapia isoladamente. Porém, o perfil de atividade metabólica apresenta-se semelhante ao da linha celular nativa WiDr em resposta ao tratamento de radioterapia na presença do butirato.

#### **4.2.2. Avaliação da Sobrevivência Celular**

Para o estudo da sobrevivência celular utilizou-se o ensaio clonogénico. Os resultados permitiram determinar o fator de sobrevivência das células em resposta aos tratamentos de radioterapia em combinação com a administração prévia do butirato, de forma a obter as curvas de dose-resposta após o ajuste ao modelo linear-quadrático.

A figura 24 representa as curvas de dose-resposta ajustadas ao modelo linear-quadrático referentes à linha celular nativa WiDr e à linha celular radiorresistente WiDr/10x em resposta ao tratamento de radioterapia combinado com o butirato. Pela análise dos resultados foi possível observar a diminuição dos fatores de sobrevivência com o aumento da dose de radiação tanto na linha celular WiDr como na linha celular WiDr/10x. Além disso, a linha celular radiorresistente apresentou fatores de sobrevivência superiores à linha celular nativa, com diferenças estatisticamente significativas com as doses de 6 Gy ( $p=0,028$ ) e de 10 Gy ( $p=0,004$ ). A linha celular WiDr apresentou um fator de sobrevivência celular de  $0,20 \pm 0,06$  com a dose de 6 Gy e de  $0,04 \pm 0,01$  com a dose de 10 Gy, relativamente ao controlo. Por sua vez, a linha celular WiDr/10x apresentou sempre fatores de sobrevivência superiores, correspondendo a  $0,28 \pm 0,04$  com a dose de 6 Gy e a  $0,09 \pm 0,02$  com a dose de 10 Gy, relativamente ao controlo. É de referir que todas as condições foram incubadas na presença do butirato.



**Figura 24.** Valores do fator de sobrevivência e curvas de dose-resposta das linhas celulares WiDr (representada a azul) e WiDr/10x (representada a vermelho) em resposta à irradiação com doses crescentes na presença de butirato. Os resultados apresentados correspondem à média e ao desvio-padrão ( $n \geq 6$ ). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ).

Na tabela 10 encontram-se apresentados os respetivos valores de  $DL_{50}$  determinados quer no tratamento de radioterapia isoladamente quer no tratamento combinado com butirato nas duas linhas celulares em estudo. A linha celular WiDr apresentou valores de  $DL_{50}$  semelhantes, tendo-se obtido os valores de 2,482 e de 2,980 Gy em cada modalidade de tratamento, respetivamente. Em relação à linha celular radiorresistente WiDr/10x, verificou-se uma diminuição dos valores de  $DL_{50}$  de 4,801 para 3,221 Gy no tratamento combinado com o butirato comparativamente com a radioterapia isolada. Este resultado permitiu concluir que os efeitos do butirato parecem sensibilizar a linha celular radiorresistente, verificando-se um menor  $DL_{50}$  e maior diminuição da sobrevivência celular.

**Tabela 10.** Valores dos parâmetros obtidos a partir do ajuste das curvas de sobrevivência celular das linhas WiDr e WiDr/10x ao modelo linear-quadrático.

Linha celular	Concentração de Butirato	$DL_{50}$ (Gy)	$r^2$
WiDr	-	2,482	0,955
	3 mM	2,980	0,999
WiDr/10x	-	4,801	0,944
	5 mM	3,221	0,996



### 4.2.3. Avaliação da Morte Celular

#### 4.2.3.1. Avaliação da Viabilidade Celular e Tipos de Morte Induzidos

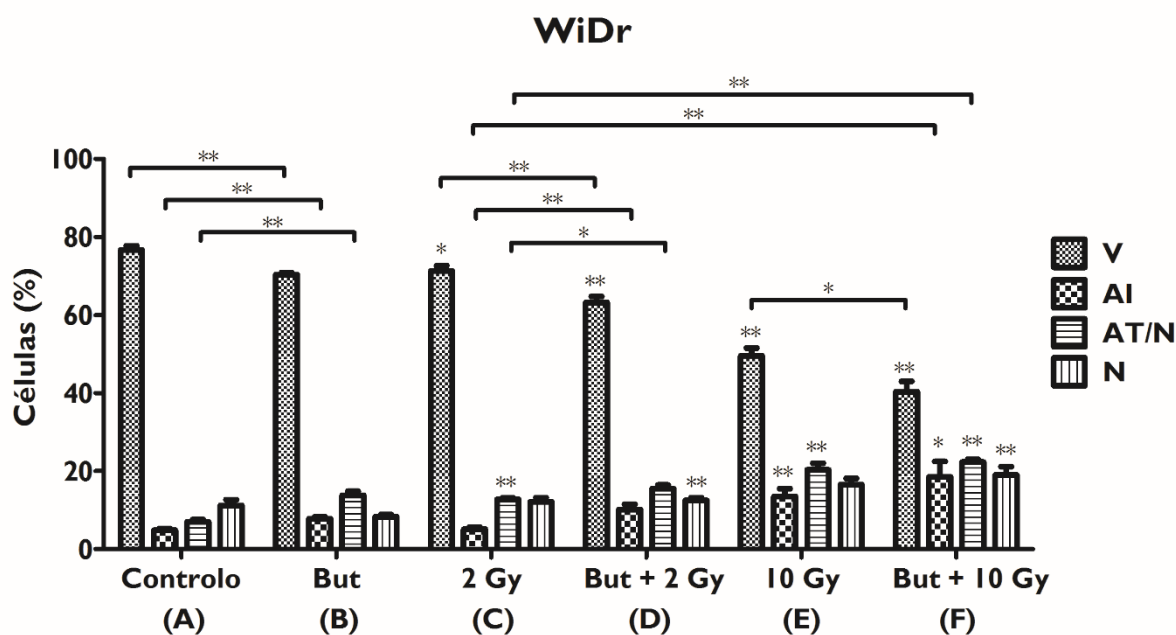
Tal como descrito anteriormente, a viabilidade celular foi avaliada por citometria de fluxo após 72 horas, utilizando a dupla marcação com AnV e IP com o intuito de determinar os tipos de morte celular induzidos, em resposta ao tratamento de radioterapia em combinação com butirato. Nos gráficos das figuras 25 e 26 encontram-se representadas as diferentes populações celulares identificadas após o tratamento das linhas celulares WiDr e WiDr/10x.

Em relação à linha celular nativa WiDr (Figura 25) foi possível observar que a irradiação com doses baixas induziu redução da viabilidade, tanto isoladamente como na presença do butirato. Verificou-se uma diminuição significativa do número de células viáveis que passou de  $76,67 \pm 1,05\%$  na condição controlo para  $71,25 \pm 1,39\%$ , na condição de 2 Gy ( $p=0,029$ ). Com a presença do butirato, esta população celular sofreu também uma diminuição significativa pois passou de  $70,33 \pm 0,49\%$  na condição de But para  $63,17 \pm 1,58\%$ , na condição de But + 2 Gy ( $p=0,002$ ). Em simultâneo com a diminuição desta população celular observou-se um aumento das restantes populações celulares. Na irradiação isolada foi notada significância estatística para a população em apoptose tardia/necrose ( $p=0,001$ ), com um aumento de  $7,00 \pm 0,63\%$  na condição controlo para  $12,75 \pm 0,45\%$ , na condição de 2 Gy. Com a combinação de butirato com a irradiação, verificou-se significância estatística para a população de células em necrose ( $p=0,002$ ), com um aumento de  $8,33 \pm 0,56\%$  na condição de But para  $12,50 \pm 0,67\%$  na condição de But + 2 Gy. No tratamento das células com doses de radiação mais elevadas observou-se um maior efeito na redução da viabilidade, sendo que a população de células viáveis diminuiu significativamente para  $49,50 \pm 2,05\%$  na condição de 10 Gy ( $p=0,002$ ) em relação à condição controlo, e para  $40,33 \pm 2,68\%$  na condição de But + 10 Gy ( $p=0,002$ ) em relação à condição de But. Na condição de 10 Gy foi possível observar ainda um aumento significativo da população de células em apoptose tardia/necrose ( $p=0,002$ ) que passaram para valores de  $20,33 \pm 1,71\%$ , e em apoptose inicial ( $p=0,002$ ) com valores de  $13,50 \pm 2,00\%$  comparativamente com  $4,83 \pm 0,48\%$  obtido na condição controlo. Em combinação com o butirato, observou-se um aumento das mesmas populações celulares, com significâncias estatísticas na população em apoptose inicial ( $p=0,002$ ), aumentando de  $7,83 \pm 0,48\%$  na condição de But para  $18,50 \pm 3,94\%$ , na condição de But + 10 Gy e em apoptose tardia/necrose ( $p=0,002$ ) as quais aumentaram de  $13,83 \pm 1,01\%$  na condição de But para  $22,33 \pm 0,67\%$  na condição de But + 10 Gy. Por último, podemos observar um aumento da população de células em necrose em todas as condições

testadas, à exceção da condição de But onde se observou uma redução mas sem diferenças estatisticamente significativas. Nesta população celular só foram notadas significâncias estatísticas nas irradiações em combinação com butirato, verificando-se um aumento de  $8,33 \pm 0,58\%$  na condição de But, para  $12,50 \pm 0,67\%$  na condição de But + 2 Gy ( $p=0,002$ ) e para  $19,00 \pm 2,13\%$ , na condição de But + 10 Gy ( $p=0,002$ ).

Estabelecendo uma comparação entre os tratamentos de radioterapia isoladamente e em combinação com butirato, foi observado que o efeito do butirato combinado à irradiação com doses baixas induziu a redução da viabilidade, sendo que se verifica uma diminuição significativa do número de células viáveis, que passaram de  $71,25 \pm 1,39\%$  na condição de 2 Gy para  $63,17 \pm 1,58\%$  na condição de But + 2 Gy ( $p=0,008$ ). Em correspondência com esta diminuição, na presença do butirato, verifica-se o aumento significativo das populações celulares em apoptose inicial ( $p=0,003$ ), a qual aumentou de  $5,13 \pm 0,51\%$  na condição de 2 Gy para  $10,17 \pm 1,35\%$  na condição de But + 2 Gy e da população celular em apoptose tardia/necrose ( $p=0,013$ ) que aumentou de  $12,75 \pm 0,45\%$  na condição de 2 Gy para  $15,50 \pm 0,98\%$  na condição de But + 2 Gy. Não se constataram diferenças na população de células necróticas com a irradiação com doses baixas. Por sua vez, feita uma comparação entre as condições de irradiação com doses mais elevadas, a combinação com butirato na irradiação levou a uma diminuição do número de células viáveis significativamente maior, verificando-se uma diminuição de  $49,50 \pm 2,05\%$  na condição de 10 Gy para  $40,33 \pm 2,68\%$  na condição de But + 10 Gy ( $p=0,015$ ). Entre as restantes populações não se observaram diferenças significativas, embora a combinação de butirato com a irradiação pareça mostrar uma tendência para o aumento da morte celular por apoptose. Apoiando esta observação, com a presença de butirato no tratamento de radioterapia, foi ainda verificado um número de células em apoptose inicial ( $p=0,001$ ) e em apoptose tardia/necrose ( $p=0,001$ ) significativamente maior na condição de But + 10 Gy comparativamente com à condição de 2 Gy, o que não se observou com a condição de 10 Gy, permitindo concluir que o efeito do butirato com a irradiação induziu uma maior tendência para estes tipos de morte celular. Além disso, o efeito do butirato nas células, sem irradiação, determinou alterações na viabilidade, com significâncias nas populações de células viáveis ( $p=0,002$ ), em apoptose inicial ( $p=0,002$ ) e em apoptose tardia/necrose ( $p=0,002$ ).

Pelos resultados da linha celular radiorresistente WiDr/10x (Figura 26) conseguiu-se constatar que a radioterapia com doses baixas de radiação levou a uma diminuição da percentagem de células viáveis apenas na irradiação isolada. Verificou-se uma diminuição significativa com valores que passaram de  $82,83 \pm 1,30\%$  na condição controlo para  $74,17 \pm 1,08\%$  na condição de 2 Gy ( $p=0,002$ ). Observou-se também o aumento das restantes

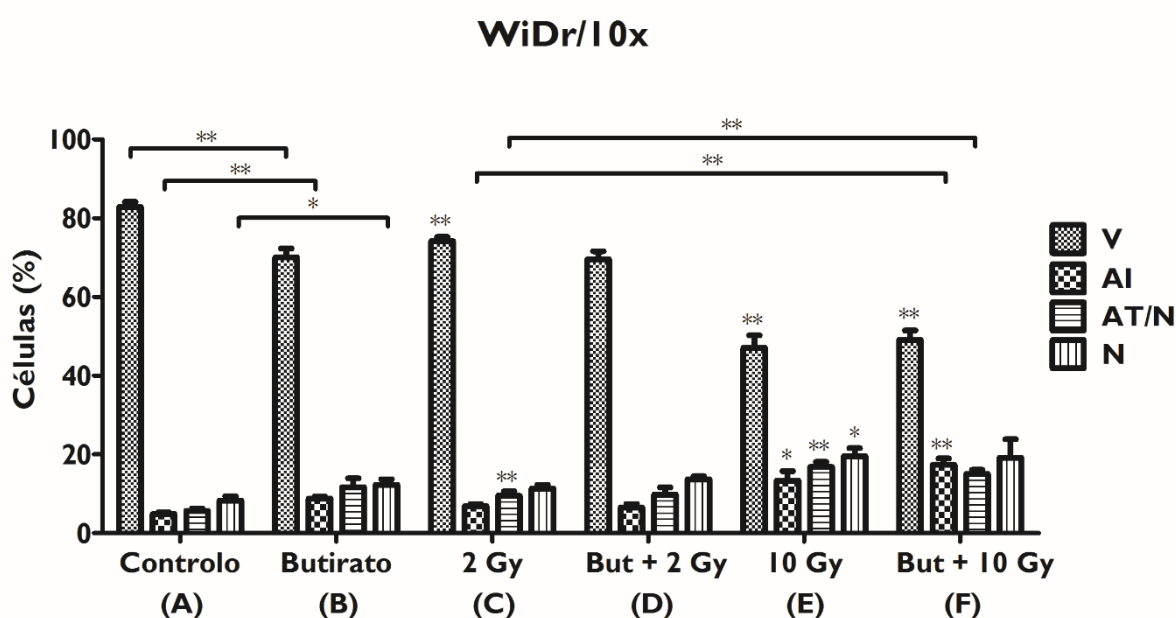


**Figura 25.** Avaliação da viabilidade celular às 72 horas da linha celular WiDr em resposta à sensibilização com butirato e com radioterapia. Os resultados estão apresentados em percentagem de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e em necrose (N) e exprimem a média e o erro-padrão ( $n \geq 5$ ). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ), sendo as significâncias assinaladas em (C) e (E) referentes ao controlo (A, sem butirato) e em (D) e (F) referentes ao controlo com butirato (B).

populações celulares, com um aumento significativo da população em apoptose tardia/necrose ( $p = 0,009$ ), que passou de  $5,67 \pm 0,61\%$  na condição controlo para  $9,50 \pm 1,09\%$  na condição de 2 Gy. O tratamento das células com doses de radiação mais elevadas revelou um maior efeito na diminuição da viabilidade tanto na irradiação isolada como na combinação com butirato. Na condição de 10 Gy a população de células viáveis diminuiu significativamente para  $47,00 \pm 3,20\%$  ( $p = 0,004$ ) relativamente à condição controlo. Em combinação com o butirato, observou-se uma diminuição significativa desta população que passou de  $70,00 \pm 2,28\%$  na condição de But para  $49,00 \pm 2,46\%$  na condição de But + 10 Gy ( $p = 0,002$ ). Além disso, na condição de 10 Gy verificou-se significância estatística para o número de células em apoptose tardia/necrose ( $p = 0,004$ ), com o valor de  $16,83 \pm 1,22\%$ , e em apoptose inicial ( $p = 0,015$ ), aumentando de  $4,83 \pm 0,48\%$  na condição controlo para  $13,33 \pm 2,43\%$  na condição de 10 Gy. Em combinação com o butirato, observou-se um aumento significativo da população em apoptose inicial ( $p = 0,002$ ), que passou de  $8,83 \pm 0,48\%$  na condição de But para  $17,33 \pm 1,63\%$  na condição de But + 10 Gy. A população em apoptose tardia/necrose aumentou, porém sem significância estatística, de  $11,67 \pm 2,30\%$  na condição de But para  $15,00 \pm 1,06\%$  na condição de But + 10 Gy. Quanto à população de células necróticas, foi observado um aumento em todas as condições testadas, sendo apenas significativo na comparação entre a condição controlo e a condição de 10 Gy ( $p = 0,010$ ), aumentando de  $8,33 \pm 1,02\%$  para  $19,50 \pm 2,08\%$ ,

respetivamente. No tratamento combinado com butirato observou-se igualmente um aumento sem significância estatística, de  $12,33 \pm 1,33\%$  na condição de But para  $19,17 \pm 4,66\%$  na condição de But + 10 Gy.

Comparando os dois tratamentos de radioterapia, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas com doses baixas de radiação na viabilidade celular com a irradiação na presença de butirato comparativamente à irradiação isolada. Entre as doses mais elevadas também se constata a mesma observação. Ainda assim, foi possível verificar um aumento do número de células em apoptose inicial na condição de But + 10 Gy relativamente à condição de 10 Gy, embora sem significância estatística. Porém, com a presença de butirato na irradiação das células radiorresistentes, foi ainda possível verificar um aumento significativo das populações em apoptose inicial ( $p=0,002$ ) e em apoptose tardia/necrose ( $p=0,009$ ) na condição de But + 10 Gy comparativamente à condição de 2 Gy, que não se observou comparando com a condição de 10 Gy. Com esta observação podemos concluir que a presença de butirato no tratamento de radioterapia aparentou aumentar a tendência para o aumento da morte celular por apoptose. Por fim, observa-se também que a presença do butirato sem o tratamento de radioterapia, leva à diminuição significativa do número de células viáveis ( $p=0,002$ ) e ao aumento das populações celulares em apoptose inicial ( $p=0,002$ ) e em necrose ( $p=0,026$ ) comparativamente à condição controlo.



**Figura 26.** Avaliação da viabilidade celular às 72 horas na linha celular WiDr/10x em resposta à sensibilização com butirato e tratamento com radioterapia. Os resultados estão apresentados em percentagem de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N) e exprimem a média e o erro-padrão ( $n \geq 5$ ). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ), sendo as significâncias assinaladas em (C) e (E) referentes ao controlo (A, sem butirato) e em (D) e (F) referentes ao controlo com butirato (B).

Ademais, pela comparação dos resultados das duas linhas celulares verificou-se uma população de células viáveis significativamente inferior na condição de But + 10 Gy ( $p=0,041$ ), na linha celular WiDr em relação à linha celular WiDr/10x, e ainda um valor significativamente superior da população em apoptose tardia/necrose na mesma condição ( $p=0,002$ ).

#### **4.2.3.2. Avaliação da Expressão de BAX/BCL-2**

Os níveis da expressão das proteínas pró-apoptótica BAX e anti-apoptótica BCL-2 foram determinados por citometria de fluxo após 72 horas de forma a avaliar a morte celular por apoptose em resposta ao tratamento de radioterapia combinado com o efeito do butirato. O gráfico da figura 27 apresenta os valores da razão BAX/BCL-2 obtidos depois do tratamento das linhas celulares em estudo, calculados em relação às condições controlo respetivas.

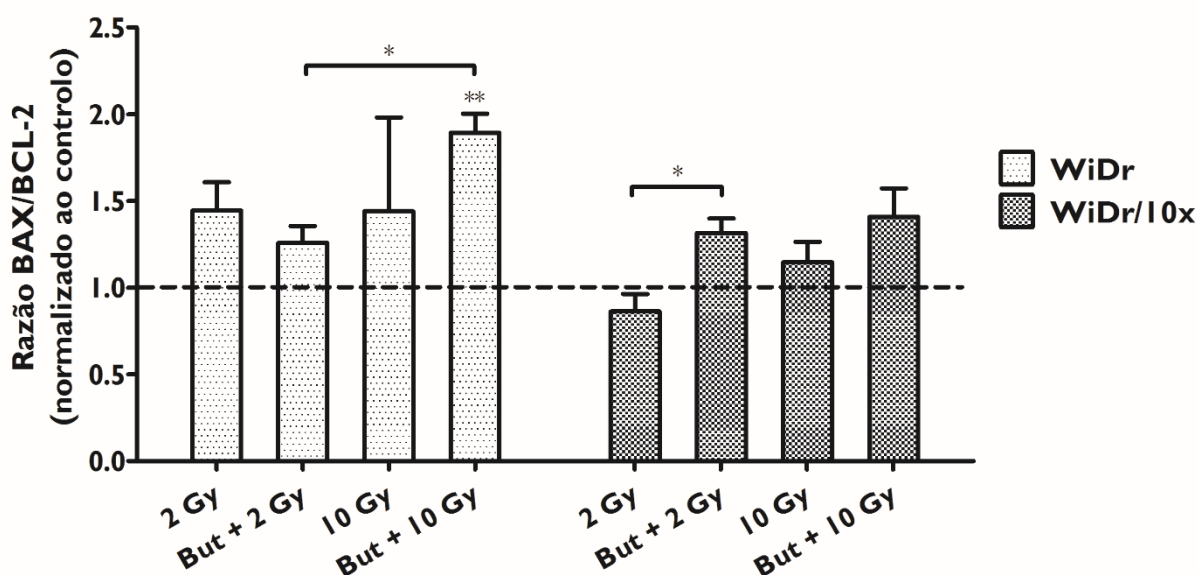
Pela análise dos resultados, na linha celular nativa WiDr não se verificaram diferenças estatisticamente significativas nas células sujeitas a doses baixas de radiação. Porém, foi possível constatar um aumento da razão entre as proteínas BAX e BCL-2 para  $1,44\pm 0,16$  do controlo sem butirato para a condição de 2 Gy, e ainda para  $1,26\pm 0,10$  do controlo com butirato para a condição de But + 2 Gy. No tratamento das células com doses de radiação mais elevadas observou-se um aumento da razão BAX/BCL-2 com a presença do butirato, sendo que se verifica significância estatística para a condição de But + 10 Gy comparativamente com a condição controlo com butirato, onde a razão atinge o valor de  $1,89\pm 0,11$  ( $p=0,003$ ). Na condição de 10 Gy observou-se um aumento da razão BAX/BCL-2 em relação ao controlo, embora sem significância estatística, sendo registado o valor de  $1,44\pm 0,54$ .

Comparando a irradiação isolada com a irradiação combinada com o butirato, não foram observadas diferenças significativas na razão BAX/BCL-2 com a presença de butirato tanto entre as doses de radiação mais baixas como entre as doses de radiação mais elevadas. Porém, foi possível observar um valor da razão BAX/BCL-2 significativamente maior para a condição de But + 10 Gy em relação à condição de But + 2 Gy ( $p=0,011$ ), o que não aconteceu com a condição de 10 Gy em relação à mesma condição. Assim, como a condição de But + 10 Gy foi também a única que apresentou um aumento significativo da razão BAX/BCL-2 em relação ao controlo, podemos concluir que o efeito do butirato combinado com a radiação tende a induzir uma maior sensibilização das células. Por sua vez, observa-se um aumento da expressão da proteína pró-apoptótica BAX comparativamente à anti-apoptótica BCL-2, tanto maior quanto mais elevada a dose de radiação. Este efeito não se verificou em resposta à irradiação sem o butirato.

Pela análise dos resultados da linha celular radiorresistente WiDr/10x, nenhuma das condições de tratamento testadas mostrou diferenças com significância estatística, relativamente aos respetivos controlos (sem e com butirato). Porém, é de notar um aumento da razão BAX/BCL-2 em ambas as condições do tratamento de radioterapia com a presença do butirato, sendo registado o valor de  $1,32 \pm 0,08$  para a condição de But + 2 Gy e de  $1,41 \pm 0,16$  para a condição de But + 10 Gy. Esse efeito não se manifestou com o tratamento isolado de radioterapia, sendo que o valor da razão BAX/BCL-2 foi de  $0,86 \pm 0,10$  para a condição de 2 Gy e de  $1,15 \pm 0,12$  para a condição de 10 Gy.

Através da comparação entre as condições de irradiação com doses baixas, observaram-se diferenças significativas na razão BAX/BCL-2 com a presença do butirato, sendo que esta é significativamente maior na condição de But + 2 Gy ( $p=0,040$ ) em relação à condição de 2 Gy. Entre as condições de irradiação com doses mais elevadas, verificou-se um valor da razão BAX/BCL-2 maior com a presença do butirato na condição de But + 10 Gy, embora sem significância estatística com a condição de 10 Gy. Podemos concluir que o efeito da presença do butirato no tratamento com radioterapia nesta linha celular induziu algum efeito na sensibilização das células e consequentemente observou-se uma tendência para o aumento da razão entre as proteínas BAX e BCL-2.

Através da comparação dos níveis de BAX e BCL-2 entre as linhas celulares, ainda foi possível verificar que a irradiação na presença de butirato induziu um aumento da razão BAX/BCL-2 mais evidente nas células WiDr do que nas células WiDr/10x, verificando-se significância estatística para a condição de But + 10 Gy ( $p=0,037$ ).



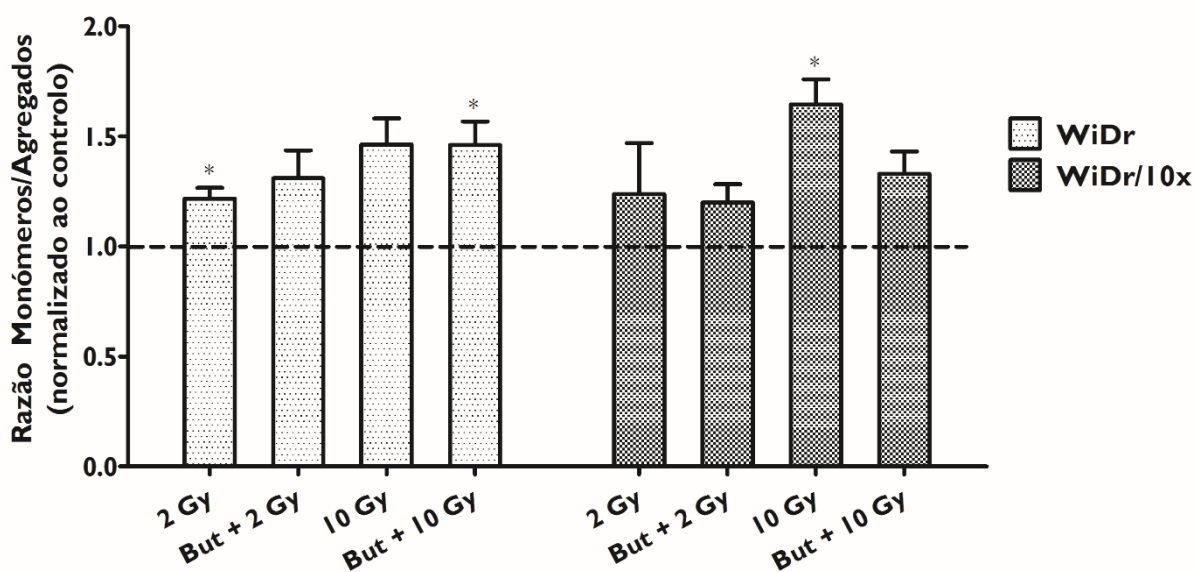
**Figura 27.** Expressão das proteínas BAX e BCL-2 às 72 horas nas linhas celulares WiDr e WiDr/10x em resposta à sensibilização com butirato e tratamento com radioterapia. Os resultados apresentam-se expressos na razão BAX/BCL-2 normalizada ao controlo e exprimem a média e o erro padrão ( $n \geq 5$ ). As diferenças significativas relativamente estão representadas por \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ).

#### 4.2.3.3. Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial

Tal como referido, o estudo do potencial de membrana mitocondrial teve o objetivo de avaliar a morte celular por apoptose após 72 horas, em resposta ao tratamento de radioterapia combinado com butirato. O gráfico da figura 28 representa os valores da razão monómeros/agregados das linhas celulares WiDr e WiDr/10x relativamente aos respetivos controlos.

Na linha celular nativa WiDr foi possível observar um aumento da razão monómeros/agregados com o tratamento das células com doses baixas de radiação, verificando-se diferenças estatísticas para a condição de 2 Gy ( $p=0,018$ ) em relação ao controlo sem butirato. A razão monómeros/agregados foi de  $1,22\pm 0,05$  na condição de 2 Gy e de  $1,31\pm 0,13$  na condição de But + 2 Gy. O tratamento com doses mais elevadas de radiação levou a um aumento da razão monómeros/agregados, observado tanto na ausência de butirato, com o valor de  $1,46\pm 0,12$  na condição de 10 Gy, como na presença do butirato, com o valor de  $1,46\pm 0,11$  na condição de But + 10 Gy. Na condição de But + 10 Gy verificou-se significância estatística em relação ao controlo com butirato ( $p=0,040$ ). Através da comparação da irradiação combinada ao butirato com a irradiação isoladamente, não foram observadas diferenças significativas com a presença do butirato.

Pela análise da linha celular radorresistente WiDr/10x verificou-se também uma tendência para o aumento da razão monómeros/agregados, de forma dependente da dose de radiação, todavia sem resultados com significância estatística à exceção da condição de 10 Gy. A razão de monómeros/agregados foi de  $1,24\pm 0,23$  para a condição de 2 Gy e de  $1,20\pm 0,08$



**Figura 28.** Potencial de membrana mitocondrial às 72 horas nas linhas celulares WiDr e WiDr/10x em resposta à sensibilização com butirato e tratamento com radioterapia. Os resultados apresentam-se expressos na razão monómeros/agregados normalizada ao controlo e exprimem a média e o erro padrão ( $n\geq 5$ ).

na condição de But + 2 Gy. No tratamento das células com doses de radiação mais elevadas, observou-se um aumento significativo da razão monómeros/agregados para valores de  $1,65 \pm 0,11$  na condição de 10 Gy ( $p=0,013$ ). Combinada com a presença do butirato obteve-se o valor de  $1,33 \pm 0,10$  para a condição de But + 10 Gy. O tratamento com a presença do butirato não mostrou diferenças em relação ao tratamento de radioterapia isolada.

#### 4.2.3.4. Avaliação do Ciclo Celular

O estudo do ciclo celular permitiu obter informações acerca das populações de células em cada fase após 72 horas, em resposta ao tratamento de radioterapia em combinação com o butirato nas linhas celulares WiDr e WiDr/10x com o intuito de relacionar as fases do ciclo celular com os resultados anteriores.

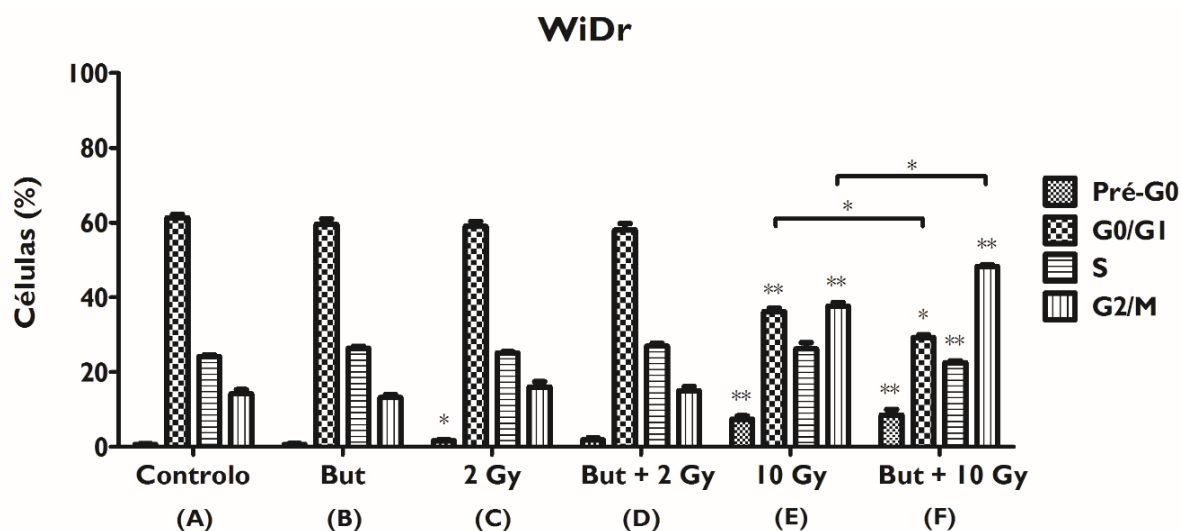
Pela análise dos gráficos das figuras 29 e 30 podemos verificar maiores diferenças nas condições tratadas com as doses de radiação mais elevadas e, sobretudo, na irradiação das células sujeitas ao butirato.

Na linha celular nativa WiDr (Figura 29) foi possível observar um aumento da população de células na fase pré-G0, correspondente ao pico apoptótico, tanto na irradiação isolada como em combinação com o butirato, de forma dependente da dose de radiação. Observou-se um aumento significativo de células na fase pré-G0 relativamente à condição controlo, tanto na condição de 2 Gy com valores de  $1,67 \pm 0,33\%$  ( $p=0,031$ ) como na condição de 10 Gy com valores de  $7,40 \pm 0,93\%$  ( $p=0,005$ ). Com a presença de butirato, observou-se um aumento de células nesta fase do ciclo celular, as quais atingiram um valor de  $1,83 \pm 0,60\%$  na condição de But + 2 Gy, e de  $8,50 \pm 1,50\%$  na condição de But + 10 Gy, sendo estatisticamente significativo em relação à condição de But ( $p=0,009$ ). Quanto às populações celulares das restantes fases, não se verificam diferenças significativas em nenhuma fase do ciclo com o tratamento com doses baixas de radiação. Em contraste, nos tratamentos com doses de radiação mais elevadas observou-se uma diminuição significativa do número de células na fase G0/G1, passando de  $61,33 \pm 0,88\%$  na condição controlo para  $36,20 \pm 0,92\%$  na condição de 10 Gy ( $p=0,006$ ), e de  $59,50 \pm 1,48\%$  na condição de But para  $29,25 \pm 0,75\%$  na condição de But + 10 Gy ( $p=0,01$ ). A diminuição da população em G0/G1 foi acompanhada por um aumento significativo da população celular na fase G2/M, passando de  $14,17 \pm 1,14\%$  na condição controlo para  $37,60 \pm 1,03\%$  na condição de 10 Gy ( $p=0,006$ ) e de  $13,17 \pm 0,83\%$  na condição de But para  $48,25 \pm 0,48\%$  na condição de But + 10 Gy ( $p=0,009$ ). Relativamente à fase S não foram observadas diferenças na condição de 10 Gy. Em combinação com o butirato,



esta população manifestou uma diminuição significativa passando de  $26,33 \pm 0,61\%$  na condição de But para  $22,50 \pm 0,50\%$  na condição de But + 10 Gy ( $p=0,009$ ).

Estabelecendo uma comparação entre os tratamentos com doses baixas de radiação, não foram observadas alterações com a presença do butirato em nenhuma fase do ciclo celular. Em contraste, comparando entre as condições irradiadas com doses mais elevadas foi observado que a presença do butirato induziu um aumento da sensibilidade das células aos efeitos da radiação, sendo verificada uma redução da população celular em fase G0/G1, diminuindo significativamente ( $p=0,013$ ) de  $36,20 \pm 0,92\%$  na condição de 10 Gy para  $29,25 \pm 0,75\%$  na condição de But + 10 Gy. Entre estas condições observou-se também um aumento significativo ( $p=0,014$ ) da população na fase G2/M, que passou de  $37,60 \pm 1,03\%$  para  $48,25 \pm 0,48\%$ .



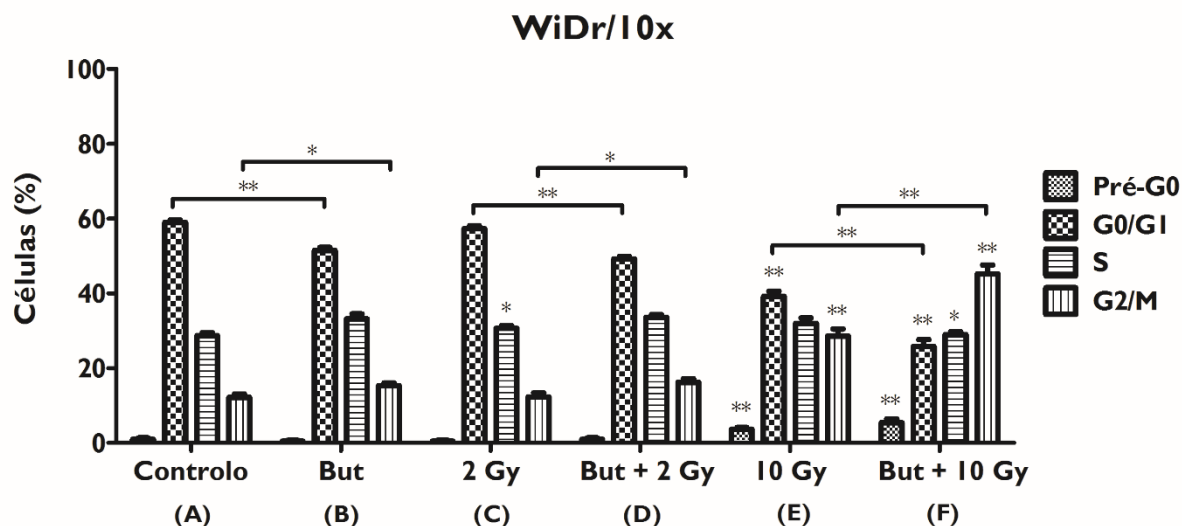
**Figura 29.** Avaliação do ciclo celular às 72 horas na linha celular WiDr em resposta à sensibilização com butirato e tratamento com radioterapia. Os resultados estão apresentados em percentagem de células em cada uma das fases do ciclo celular e exprimem a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes ( $n \geq 5$ ). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ), sendo as significâncias assinaladas em (C) e (E) referentes ao controlo (A, sem butirato) e em (D) e (F) referentes ao controlo com butirato (B).

Na linha celular radiorresistente WiDr/10x (Figura 30), observou-se um aumento significativo da população de células na fase pré-G0 na irradiação com as doses mais elevadas, tanto no tratamento de radioterapia isolada como em combinação com o butirato. Na irradiação isolada verificou-se um aumento significativo ( $p=0,007$ ) que passou de  $1,00 \pm 0,37\%$  na condição controlo para  $3,60 \pm 0,51\%$  na condição de 10 Gy. Com a presença de butirato, observou-se um aumento significativo ( $p=0,005$ ) de  $0,50 \pm 0,22\%$  na condição de But para  $5,40 \pm 1,03\%$  na condição de But + 10 Gy. As populações nas fases G0/G1 e G2/M não apresentaram diferenças com os tratamentos com doses de radiação baixas. Por sua vez, o

tratamento com as doses de radiação mais elevadas traduziu-se por maiores efeitos no ciclo celular. Na irradiação isolada verificou-se uma diminuição significativa do número de células na fase G0/G1 ( $p=0,005$ ) que passaram de  $59,00\pm 0,63\%$  na condição controlo para  $39,20\pm 1,36\%$ , na condição de 10 Gy. Em combinação com o butirato, observou-se uma diminuição significativa ( $p=0,006$ ) com valores que passaram de  $51,50\pm 0,76\%$  na condição de But para  $25,80\pm 1,88\%$  na condição de But + 10 Gy. Correspondente a estas diminuições, observou-se um aumento significativo da população em fase G2/M na irradiação isolada, que passou de  $12,17\pm 0,87\%$  na condição controlo para  $28,60\pm 1,91\%$  na condição de 10 Gy ( $p=0,006$ ), e na irradiação em combinação com butirato, onde passou de  $15,33\pm 0,67\%$  na condição de But para  $45,20\pm 2,40\%$  na condição de But + 10 Gy ( $p=0,006$ ). Observou-se ainda uma diminuição da população celular na fase S, com significância estatística para a condição de 2 Gy ( $p=0,048$ ) em relação à condição controlo, e para a condição de But + 10 Gy ( $p=0,034$ ) em relação à condição de But.

Pela comparação entre as condições irradiadas com doses baixas, na presença de butirato foi assinalada uma diminuição significativa da população na fase G0/G1 ( $p=0,006$ ), que passou de  $57,33\pm 0,71\%$  na condição de 2 Gy para  $49,20\pm 0,66\%$  na condição de But + 2 Gy e um aumento significativo da população na fase G2/M ( $p=0,033$ ), que passou de  $12,33\pm 1,02\%$  na condição de 2 Gy para  $16,20\pm 1,02\%$  na condição de But + 2 Gy. Entre as populações irradiadas com doses mais elevadas, verificou-se também que a presença de butirato no tratamento de radioterapia levou à diminuição significativa do número de células na fase G0/G1 ( $p=0,008$ ), que passou de  $39,20\pm 1,36\%$  na condição de 10 Gy para  $25,80\pm 1,88\%$  na condição de But + 10 Gy e ao aumento significativo do número de células na fase G2/M ( $p=0,009$ ), que passou de  $28,60\pm 1,91\%$  na condição de 10 Gy para  $45,20\pm 2,40\%$ , na condição de But + 10 Gy. Além disso, a presença de butirato, sem o tratamento de radioterapia, revelou também uma diminuição significativa da população celular na fase G0/G1 ( $p=0,004$ ) e o aumento significativo da população na fase G2/M ( $p=0,023$ ) relativamente à condição controlo.

Por fim, comparando a linha celular radorresistente (Figura 30) com a linha celular nativa (Figura 29) observou-se que a população celular da fase S se encontra significativamente aumentada na linha celular WiDr/10x em todas as condições. Verificou-se também um aumento significativo ( $p=0,009$ ) de células na fase G2/M na linha celular WiDr em relação à linha celular WiDr/10x na condição de 10 Gy.



**Figura 30.** Avaliação do ciclo celular às 72 horas na linha celular WiDr/10x em resposta à sensibilização com butirato e tratamento com radioterapia. Os resultados estão apresentados em percentagem de células em cada uma das fases do ciclo celular e exprimem a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes ( $n \geq 5$ ). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ), sendo as significâncias assinaladas em (C) e (E) referentes ao controlo (A, sem butirato) e em (D) e (F) referentes ao controlo com butirato (B).

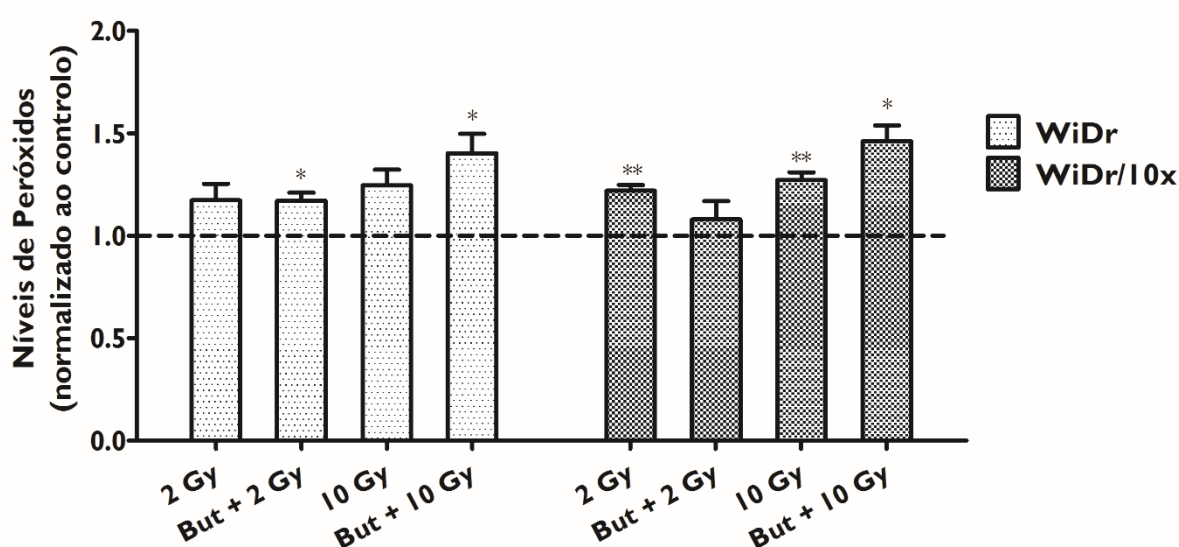
#### 4.2.4. Avaliação do Stresse Oxidativo e das Defesas Antioxidantes

##### 4.2.4.1. Avaliação da Produção Intracelular de Peróxidos

A quantidade de peróxidos de hidrogénio presente nas células foi avaliada pela marcação com a sonda DCF após 24 horas, em resposta ao tratamento de radioterapia combinado com o butirato. Os níveis de peróxidos das linhas celulares em estudo foram normalizados com os respetivos controlos e estão representados nos gráficos da figura 31.

Na linha celular nativa WiDr podemos observar um aumento dos níveis de peróxido de hidrogénio após a irradiação das células com doses baixas, tendo-se obtido o valor de  $1,17 \pm 0,08$  para a condição de 2 Gy, e de  $1,17 \pm 0,04$  para a condição de But + 2 Gy, sendo este valor significativamente maior relativamente ao controlo com butirato ( $p = 0,030$ ). Nas células irradiadas com doses mais elevadas notou-se um aumento da concentração intracelular de peróxidos, sobretudo em combinação com o butirato. Obteve-se o valor de  $1,25 \pm 0,07$  para a condição de 10 Gy e de  $1,40 \pm 0,09$  para a condição de But + 10 Gy, com significância estatística em relação ao controlo com butirato ( $p = 0,028$ ). Não foram observadas diferenças nos níveis de peróxido de hidrogénio entre a irradiação combinada com butirato e a irradiação isolada das células.

Quanto à linha celular radorresistente WiDr/10x (Figura 31), verificou-se que a irradiação isolada das células com doses baixas induziu um aumento significativo dos níveis de peróxido de hidrogénio, com o valor de  $1,22 \pm 0,03$  na condição de 2 Gy ( $p=0,003$ ) em relação ao controlo sem butirato. Na presença de butirato não foram observadas diferenças significativas nos níveis de peróxido, tendo-se registado o valor de  $1,08 \pm 0,09$  na condição de But + 2 Gy. Por outro lado, o tratamento com doses mais elevadas de radiação mostrou um aumento da concentração intracelular de peróxidos, sobretudo em combinação com o efeito do butirato. Na condição de 10 Gy verificou-se um aumento significativo do nível de peróxido de hidrogénio para valores de  $1,27 \pm 0,04$  ( $p=0,004$ ) em relação ao controlo sem butirato. De forma semelhante, na condição de But + 10 Gy observou-se um aumento significativo para  $1,46 \pm 0,08$  ( $p=0,010$ ) em relação ao controlo com butirato. A presença de butirato no tratamento de radioterapia não pareceu levar a diferenças nos níveis de peróxido de hidrogénio relativamente ao tratamento de radioterapia isoladamente.



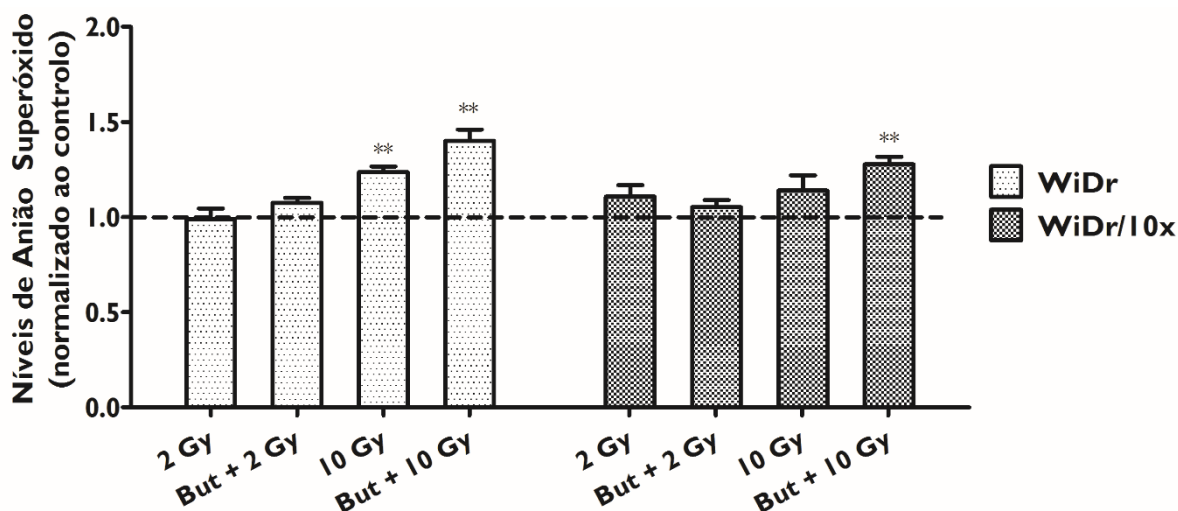
**Figura 31.** Níveis intracelulares de peróxidos de hidrogénio às 24 h nas linhas celulares WiDr e WiDr/10x em resposta à sensibilização com butirato e tratamento com radioterapia. Os resultados apresentam-se normalizados relativamente ao controlo e exprimem a média e o erro padrão ( $n \geq 5$ ). As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ).

#### 4.2.4.2. Avaliação da Produção Intracelular do Anião Superóxido

Os níveis da produção do anião superóxido foram determinados através da marcação com a sonda DHE, após 24 horas em resposta ao tratamento de radioterapia com a presença de butirato nas células das linhas celulares WiDr e WiDr/10x. Os resultados estão expressos no gráfico da figura 32, depois de efetuada a normalização com os controlos respetivos.

Na linha celular nativa WiDr não foram observadas diferenças na concentração intracelular do anião superóxido das células com a irradiação com doses baixas. Em contraste, no tratamento com doses de radiação mais elevadas observou-se um aumento significativo dos níveis de anião superóxido, registando-se o valor de  $1,24 \pm 0,03$  para a condição de 10 Gy ( $p=0,001$ ), relativamente ao controlo sem butirato, e de  $1,40 \pm 0,06$  para a condição de But + 10 Gy ( $p=0,003$ ), relativamente ao controlo com butirato. Entre os tratamentos com doses de radiação baixas não foram observadas diferenças nos níveis do anião superóxido com a presença de butirato na irradiação. Porém, com as doses mais elevadas de radiação foi possível observar um aumento dos níveis de anião superóxido com a presença de butirato, embora sem diferenças significativas em relação à irradiação isolada.

Na linha celular radorresistente WiDr/10x não foram observadas alterações nos níveis do anião superóxido com a irradiação com doses baixas. Com doses de radiação mais elevadas foi verificado que a combinação com butirato induziu um aumento significativo dos níveis do anião superóxido ( $p=0,004$ ), com o valor de  $1,28 \pm 0,04$  na condição de But + 10 Gy relativamente ao controlo com butirato. Na irradiação isolada não se observaram alterações, tendo-se obtido o valor de  $1,14 \pm 0,08$  na condição de 10 Gy relativamente ao controlo sem butirato. Porém, não foram observadas diferenças significativas entre as condições de radioterapia sem e com a presença do butirato.

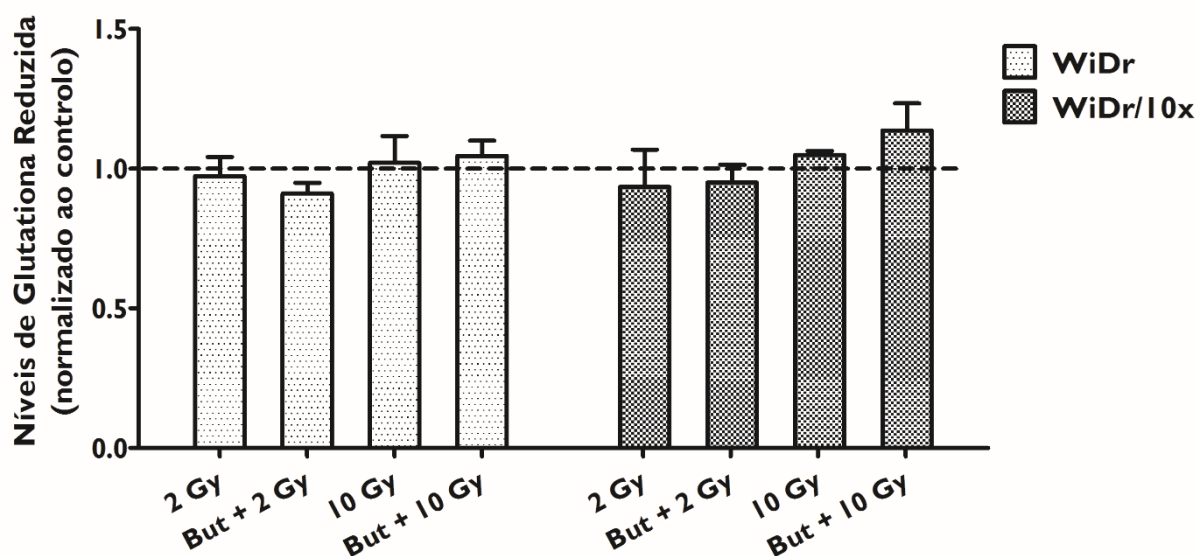


**Figura 32.** Níveis de anião superóxido às 24 h nas linhas celulares WiDr e WiDr/10x em resposta à sensibilização com butirato e tratamento com radioterapia. Os resultados apresentam-se normalizados relativamente ao controlo e exprimem a média e o erro padrão de  $n \geq 5$ . As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ).

#### 4.2.4.3. Avaliação da Expressão de Glutaciona Reduzida

Tal como foi referido, foram também avaliados os níveis de expressão de glutaciona reduzida após 24 horas, em resposta ao tratamento de radioterapia em combinação com o butirato. Os resultados foram normalizados relativamente aos respetivos controlos e estão expressos no gráfico da figura 33.

Através da análise dos resultados, não foram observadas diferenças nos níveis de expressão de GSH em nenhuma das condições testadas nas linhas celulares WiDr e WiDr/10x, tanto na irradiação isolada como em combinação com butirato.



**Figura 33.** Expressão de glutaciona reduzida às 24 h nas linhas celulares WiDr e WiDr/10x em resposta à sensibilização com butirato e tratamento com radioterapia. Os resultados apresentam-se normalizados relativamente ao controlo e exprimem a média e o erro padrão ( $n \geq 5$ ).



## V. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO





A dieta está incluída entre os fatores que mais influenciam a saúde nas sociedades modernas. Como foi referido no capítulo introdutório, determinados componentes da dieta têm vindo a ser alvo de estudo, tanto no sentido da correlação com o aumento do risco de desenvolvimento de cancro, nomeadamente de CCR, como no sentido da procura por compostos com potenciais efeitos terapêuticos e/ou preventivos. Durante os últimos anos, têm sido amplamente discutidos tanto a importância da ingestão de fibra dietética como o papel do butirato na homeostasia da mucosa do cólon (Gonçalves & Martel, 2013, Encarnação *et al.*, 2015). Por outro lado, é comum verificar alterações na flora intestinal em doentes com CCR que se relacionam com o desenvolvimento e a progressão da doença assim como com a desregulação dos níveis de butirato no cólon. Uma das terapêuticas mais comuns para o tratamento de CCR é a quimioterapia, sendo utilizada também em combinação com a radioterapia principalmente quando o tumor se localiza no reto. A radioterapia consiste na utilização da radiação ionizante para a indução de morte celular nas células tumorais. Para estádios mais avançados da doença, esta terapêutica é aliada a outros compostos que potenciam os efeitos da radiação, sendo a quimiorradioterapia considerada o tratamento neoadjuvante padrão. Contudo, um dos problemas principais está relacionado com a resistência à terapêutica, sendo difícil prever a resposta tumoral dos doentes ao tratamento (Chen *et al.*, 2010; Spitzner *et al.*, 2010).

O crescente desenvolvimento de novos fármacos tem permitido compreender a resposta celular e adaptar a terapêutica de forma a minimizar os efeitos nefastos da radioterapia. Assim, nos últimos anos tem sido importante o estudo de outras estratégias que potenciem os efeitos da radioterapia nas células tumorais e, simultaneamente, confirmem proteção às células normais. Recentemente, as estratégias mais promissoras envolvem a utilização de inibidores das HDAC (HDACi), uma nova classe de agentes anticancerígenos que promove o aumento da sensibilidade das células tumorais ao tratamento de radioterapia (Jessica *et al.*, 2006). O butirato é também considerado um HDACi pelo que já foi estudado o seu efeito na inibição seletiva da proliferação das células de CCR e na proteção dos tecidos da mucosa normal, o que lhe confere as características ideais para ser utilizado na radiosensibilização do CCR aos efeitos da radiação.

Assim, o estudo *in vitro* desenvolvido enquadra-se num projeto mais abrangente onde se pretende compreender os efeitos do butirato no metabolismo das células tumorais e entender se este é capaz de sensibilizar células resistentes aos efeitos da radiação, melhorando a eficácia da radioterapia no tratamento do cancro colorretal.

A primeira parte deste trabalho consistiu no estabelecimento de uma linha celular radorresistente a partir de uma linha celular humana de CCR de forma a avaliar a citotoxicidade do butirato e determinar o efeito da sua presença no metabolismo das células.

A linha celular radorresistente foi estabelecida pela irradiação da linha celular WiDr com raios-X. A escolha desta linha celular deve-se ao facto da radioterapia ser mais utilizada no tratamento de tumores na região do cólon sigmoide e do reto, sendo esta também a região com a maior incidência de tumores. Para este efeito, procedeu-se com uma adaptação do método utilizado por Smith *et al.*, pelo que as células WiDr foram irradiadas com frações únicas de 2 Gy a cada semana ao longo de 10 semanas, obtendo-se uma linha celular derivada, denominada por linha celular WiDr/10x. Pela análise dos resultados verificou-se que os valores de  $DL_{50}$  determinados para cada linha celular corroboraram os fatores de sobrevivência obtidos com as doses de radiação testadas. Neste contexto, a linha celular derivada WiDr/10x apresentou fatores de sobrevivência significativamente maiores aos da linha celular nativa WiDr. Em relação aos valores de  $DL_{50}$ , foram de 2,48 Gy para as células da linha celular nativa WiDr e de 4,80 Gy para as células da linha celular WiDr/10x. Este ensaio comprovou a capacidade clonogénica de determinadas células tumorais ao fim de várias irradiações com doses baixas, também comprovada num estudo referente ao estabelecimento de linhas celulares radorresistentes derivadas de linhas celulares de cancro da mama (Smith *et al.*, 2009).

Depois de obtida a linha celular radorresistente WiDr/10x, ambas as linhas celulares foram tratadas com concentrações crescentes de butirato, sendo avaliado o seu efeito a nível da atividade metabólica através do ensaio de MTT. Este ensaio permitiu ainda definir a concentração de butirato a usar no estudo do metabolismo e na avaliação do efeito radorresibilizante do butirato nesta linha celular, bem como na linha celular nativa WiDr. Foi observado que a atividade metabólica diminuiu com o aumento da concentração de butirato e do tempo de incubação. Estes resultados permitiram concluir que o butirato induziu um efeito antiproliferativo na linha celular radorresistente WiDr/10x, de forma semelhante ao verificado na linha celular nativa WiDr. Além disso, as células WiDr/10x aparentaram ser mais sensíveis ao butirato para os tempos de incubação mais longos, tendo-se obtido o  $IC_{50}$  de 3,63 mM às 96 horas, comparativamente ao  $IC_{50}$  de 4,44 mM obtido nas células WiDr.

Posteriormente, foram avaliados os efeitos da presença do butirato no metabolismo das células e para tal, usaram-se concentrações crescentes de butirato na linha celular radorresistente WiDr/10x. Como termo de comparação, recorreu-se a resultados anteriormente obtidos referentes ao metabolismo da linha celular nativa WiDr na presença de butirato (Gonçalves, 2014); no entanto é importante ressaltar o facto de que os resultados obtidos na linha celular WiDr/10x são ainda preliminares.

Para o estudo das alterações no metabolismo celular utilizou-se a molécula de glicose uniformemente marcada com carbono-13 ( $[U-^{13}C]$ glicose). A molécula de glicose é composta por carbono-12 pelo que a marcação com o carbono-13 permite distingui-la da metabolização de outras fontes energéticas, como o butirato, através de espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear.

Depois da glicose marcada entrar nas células tumorais é rapidamente metabolizada, sendo libertado para o meio de cultura lactato também marcado. A  $[U-^{13}C]$ glicose é convertida pela glicólise em duas moléculas de  $[U-^{13}C]$ piruvato que, devido à intensa atividade desta via metabólica, dão origem a duas moléculas de  $[U-^{13}C]$ lactato através da fermentação láctica. Deste modo, uma análise temporal das concentrações de  $[U-^{13}C]$ lactato no meio de cultura permite determinar a intensidade do metabolismo glicolítico das células de forma indireta.

Os resultados obtidos na linha celular radorresistente WiDr/10x mostraram que o butirato interferiu com o metabolismo da  $[U-^{13}C]$ glicose. Com a presença do butirato e da  $[U-^{13}C]$ glicose no meio de cultura foi verificada uma diminuição da produção de  $[U-^{13}C]$ lactato de aproximadamente 1 mM relativamente às culturas celulares sem butirato, sendo que as maiores diferenças na concentração de  $[U-^{13}C]$ lactato ocorreram para os tempos mais longos. De forma semelhante, a produção de lactato na linha celular nativa WiDr diminuiu cerca de 2 mM com a presença de butirato no meio de cultura (Gonçalves, 2014).

A partir dos metabolitos resultantes da metabolização da  $[U-^{13}C]$ glicose nas células radorresistentes WiDr/10x, pretendeu-se também avaliar o efeito do butirato na atividade da via glicolítica e do ciclo de Krebs.

Como foi referido, quando os níveis de NADH citosólico são elevados, ocorre uma maior conversão de piruvato em lactato pelo que mais intensa será a atividade da via glicolítica. Contudo, a sensibilidade e a resolução do espectro de RMN não possibilitou a análise correta dos níveis de piruvato, sendo que se recorreu à análise da razão entre o lactato e a alanina (produtos secundários). Assim, através da razão  $C3\_Lac/C3\_Ala$  foi possível avaliar se o butirato interfere com a via glicolítica das células radorresistentes. Os resultados mostraram que o butirato promoveu um ligeiro aumento da razão  $C3\_Lac/C3\_Ala$ , o que parece indicar um aumento da intensidade da via glicolítica. Contudo, por analogia com os resultados nas células WiDr, verificou-se que os valores da razão  $C3\_Lac/C3\_Ala$  se situam abaixo de 1, sugerindo que a via glicolítica das células WiDr/10x está diminuída mesmo sem a presença do butirato e que ocorre um aumento ligeiro com a presença do butirato. Na linha celular nativa WiDr foi verificado que a presença de butirato diminuiu consideravelmente o metabolismo glicolítico (Gonçalves, 2014). A comparação dos resultados das duas linhas celulares parece

sugerir que as células radorresistentes WiDr/I0x apresentam um metabolismo menos glicolítico relativamente às células nativas.

O acoplamento entre a glicólise e o ciclo de *Krebs* foi analisado através da razão C3\_Lac/C4\_Glut. A diminuição desta razão traduz-se numa maior conversão de glicose uniformemente marcada em acetil-CoA que irá para as mitocôndrias, sendo que a marcação é incorporada no glutamato através do *turnover* do ciclo de *Krebs*. Os resultados obtidos indicaram que o butirato induziu uma diminuição do acoplamento entre as duas vias metabólicas, ou seja, um aumento da quantidade de lactato marcado, o que significa um aumento da atividade da via glicolítica, corroborando o resultado anterior. Na linha celular WiDr verificou-se que a presença de butirato induziu o aumento do acoplamento entre as duas vias metabólicas (Gonçalves, 2014). Com estes dois últimos resultados podemos colocar a hipótese do butirato ser metabolizado ineficazmente nas células radorresistentes, como será discutido no próximo parágrafo.

O aumento do número de voltas do ciclo de *Krebs* leva ao aparecimento do multiplete C4Q no espectro do glutamato, sendo que esta marcação é observada após a segunda volta do ciclo de *Krebs*. Através da quantificação da razão Q/D45 referente à marcação do carbono-4 do espectro do glutamato, podemos avaliar a velocidade do *turnover* do ciclo de *Krebs*. Um aumento desta razão indica um maior número de voltas do ciclo, ou seja, o aumento da velocidade do *turnover*, o que significa que o metabolismo é mais oxidativo. A análise dos resultados obtidos indicou que o butirato promoveu uma ligeira diminuição da razão, isto é, uma redução da velocidade do *turnover* do ciclo de *Krebs* na linha celular radorresistente WiDr/I0x. Comparativamente aos resultados da linha celular WiDr constatou-se também que a razão Q/D45 é cerca de 4 vezes menor na condição controlo da linha celular WiDr/I0x, o que sugere que o metabolismo oxidativo está também mais reduzido nas células radorresistentes e que, com a presença do butirato, se mantém praticamente inalterado. Este resultado corrobora os resultados anteriores, o que permite concluir que o metabolismo das células radorresistentes é pouco intenso e que a entrada de butirato na célula não sugere uma interferência no metabolismo glicolítico tão acentuada quanto a que se observou na linha celular WiDr. Num estudo de *Andriamihaja* e os seus colaboradores foi observado que a capacidade oxidativa da linha celular HT-29 é de cerca de 1-2 mM, tendo sido concluído que a metabolização do butirato nestas células não funciona como fonte de energia, mas regula a concentração livre de butirato no interior da célula e, por esta razão, limita a ação do butirato em determinados alvos celulares (*Andriamihaja et al.*, 2009). Por este motivo, o butirato pode ser parcialmente metabolizado na mitocôndria e, devido às concentrações utilizadas, tender a acumular-se simultaneamente no núcleo das células onde irá atuar como HDACi. Portanto, a

metabolização do butirato não parece estar diretamente envolvida com o efeito antiproliferativo verificado no ensaio de citotoxicidade do butirato. Em vez disso, pela inibição das HDAC no núcleo das células, o butirato inibe a proliferação celular e, por isso, observa-se uma ligeira diminuição da produção de lactato na linha celular WiDr/10x. Na linha celular WiDr observou-se uma diminuição da razão Q/D45 mais acentuada, porém, esta pode ser explicada pelo facto da metabolização do butirato na mitocôndria originar duas moléculas de acetil-CoA, tendo este processo sido demonstrado também em células tumorais (Donohoe *et al.*, 2012; Andriamihaja *et al.*, 2009). Estas moléculas de acetil-CoA vão ser incorporadas no ciclo de Krebs simultaneamente com as moléculas acetil-CoA marcadas, provenientes da metabolização da glicose uniformemente marcada, resultando na diluição da marcação no glutamato com carbono-13. Esta diluição pode ser explicada pela ligação de moléculas de oxaloacetato marcadas (originadas a partir do *turnover* do ciclo de Krebs com acetil-CoA marcada) a moléculas de acetil-CoA sem marcação (originadas pela metabolização do butirato). Esta interação vai provocar a diluição dos vários intermediários no ciclo de Krebs e, conseqüentemente, observa-se a diminuição da marcação C4Q em comparação à C4D45 no espectro de RMN. Assim, o resultado observado deve-se ao facto de as células tumorais recorrerem também ao butirato para a produção de energia, e não devido à diminuição da velocidade de *turnover* do ciclo de Krebs.

Por último, avaliou-se o processo anaplerótico na produção de reservas lipídicas com a presença do butirato através da razão C3\_Glut/C4\_Glut. Esta razão pode também ser influenciada pela utilização do butirato como fonte energética, tendo sido demonstrado que a metabolização deste nas células tumorais induz o aumento da produção de reservas lipídicas e de outras macromoléculas. As alterações no metabolismo de outras fontes de energia nas células podem modificar as propriedades proliferativas destas. Por exemplo, o butirato altera o destino da glutamina e aumenta a incorporação de carbonos derivados da glutamina nos lípidos (Andriamihaja *et al.*, 2009; Blouin *et al.*, 2011). O aumento da anaplerose indica que a atividade da enzima piruvato carboxilase (PC) é mais intensa promovendo um maior enriquecimento em carbono-13 nos carbonos nas posições 2 e 3 do glutamato relativamente à marcação do carbono na posição 4. Além disso, a diluição do butirato causa também um aumento da marcação dos carbonos nas posições 2 e 3 do glutamato, o que pode resultar no aumento da razão C3\_Glut/C4\_Glut. Os resultados obtidos na linha celular radiorresistente WiDr/10x mostraram que o butirato não promoveu diferenças na anaplerose. No entanto, com a presença do butirato na linha celular nativa WiDr observou-se um aumento do recurso à anaplerose.

Os resultados deste ensaio não foram conclusivos para a linha celular radorresistente WiDr/I0x, tendo-se observado dois efeitos aparentemente opostos com a incubação do butirato: uma ligeira diminuição da produção de lactato e um ligeiro aumento do metabolismo glicolítico. As diferenças no metabolismo desta linha celular podem estar relacionadas com o seu carácter mais radorresistente, conferindo às células uma natureza metabólica mais diminuída relativamente à linha celular nativa WiDr, o que significa que as células WiDr/I0x se dividem menos frequentemente. Foi demonstrado que as células mais sensíveis à radiação ionizante mostram um maior metabolismo associado à maior frequência da atividade mitótica e da divisão celular (Mosby, 2014). Pela análise dos tempos de duplicação celular para cada linha celular, obtiveram-se os valores de 26,04 horas para a linha celular nativa WiDr e de 30,86 horas para a linha celular radorresistente WiDr/I0x. Estes resultados reforçam aquela explicação, indicando que um metabolismo mais reduzido pode estar associado à menor frequência de divisão celular da linha celular WiDr/I0x e, por conseguinte, a fração de butirato que é metabolizada será menor nas células radorresistentes comparativamente às células WiDr nativas, com maior metabolismo glicolítico. Além disso, coloca-se a hipótese de ocorrer uma maior acumulação de butirato no núcleo das células radorresistentes, o que pode significar um maior efeito na inibição das HDAC. De forma a auxiliar a compreensão do metabolismo das células radorresistentes é importante ainda realizar mais ensaios para clarificar as razões obtidas. Pode também ser promissor efetuar um estudo de comparação da expressão de transportadores de butirato entre a linha celular nativa WiDr e a linha celular radorresistente WiDr/I0x e realizar estudos metabólicos para avaliar a interferência do butirato no metabolismo oxidativo através da marcação uniforme do butirato com o carbono-13.

Na segunda parte deste trabalho, pretendeu-se avaliar a resposta das linhas celulares WiDr e WiDr/I0x ao tratamento de radioterapia em combinação com o butirato.

O desenho experimental consistiu na incubação das células com butirato, as quais foram seguidamente irradiadas com várias doses de radiação. Vários parâmetros foram avaliados após 24, 48, 72 e 96 horas. Definiram-se concentrações de butirato de 3 mM para a linha celular WiDr e de 5 mM para a linha celular WiDr/I0x, aferidas a partir do IC<sub>50</sub> obtido após 48 horas de incubação. O tempo de incubação das células com estas concentrações de butirato foi de 24 horas de forma a minimizar o seu efeito citotóxico. Este procedimento assemelha-se ao estudo realizado por Leith na combinação de butionina sulfoximina e butirato para a potencialização da sensibilidade de uma linha celular de cancro colorretal humano. Este investigador tratou a linha celular DLD-1 durante 3 passagens com concentrações entre 0 e 2 mM de butirato, antes do tratamento com radioterapia, e avaliou a sobrevivência celular (Leith,

1988). Arundel *et al.* estudaram também os efeitos da radiação na sobrevivência da linha celular DLD-1 cultivada num meio de cultura contendo 2 mM de butirato (Arundel *et al.*, 1985; Arundel *et al.*, 1986).

Deste modo, procedeu-se inicialmente à avaliação da atividade metabólica das linhas celulares em resposta ao tratamento de radioterapia isoladamente e em combinação com o butirato. Na linha celular nativa WiDr verificou-se que os tratamentos com doses de radiação mais elevadas induziram um maior efeito na redução da proliferação celular para os tempos mais longos, relativamente às culturas não irradiadas. Constatou-se uma diminuição da atividade metabólica de mais de 50% após 96 horas de incubação apenas com o tratamento de radioterapia combinado ao butirato. De facto, o tratamento com 10 Gy na presença de butirato demonstrou um efeito de radiosensibilização, sendo observada uma redução da atividade metabólica mais acentuada em todos os tempos estudados, com significância estatística às 96 horas comparativamente à irradiação sem o butirato. A linha celular WiDr/10x mostrou com efeito ser mais radorresistente, verificando-se que a radioterapia isolada com doses baixas não induziu efeitos na proliferação celular e que, com doses mais elevadas, apenas se verificou uma diminuição da atividade metabólica de mais de 25% após 96 horas. Em contraste, em combinação com o butirato observaram-se diminuições significativas da atividade metabólica com a irradiação com doses baixas para os três primeiros tempos estudados, tanto relativamente às culturas não irradiadas como em comparação com as respetivas irradiações isoladas. Por outro lado, não se verificou a ocorrência de uma diminuição da proliferação celular após 96 horas de incubação, o tempo mais longo, podendo estar relacionada com o facto de o tratamento com doses de radiação baixas produzir menos efeitos e, por isso, induzir menores danos no DNA. Estudos anteriores revelaram que a irradiação com doses mais elevadas levou a produção de mais danos no DNA das células da linha celular WiDr (Ferreira, 2014). Desta forma, os resultados obtidos na linha celular WiDr/10x sugerem que, durante as primeiras horas após a radiosensibilização com doses baixas, os danos no DNA induziram senescência nas células radorresistentes permanecendo estas vivas mas metabolicamente inativas, pelo que se observou uma diminuição da atividade metabólica. Contudo, decorridas mais algumas horas, o reconhecimento de danos no DNA por determinadas moléculas sinalizadoras pode levar à ativação de mecanismos de reparação do DNA. A reparação eficaz de determinados danos permite que as células resistam à morte celular e promove o desenvolvimento tumoral, o que pode explicar o aumento da atividade metabólica às 96 horas. De facto, foi também descrito que as células podem sobreviver e proliferar após uma reparação ineficiente dos danos no DNA (Surova, 2013).



As diferenças entre os tratamentos de radioterapia isolada e em combinação com o butirato tornaram-se mais evidentes com a irradiação com doses mais elevadas, na medida em que a irradiação na presença do butirato promoveu uma diminuição da atividade metabólica mais acentuada para todos os tempos relativamente às culturas não irradiadas e comparativamente com a irradiação isolada respetiva. A partir destes resultados foi possível concluir que o butirato levou ao aumento da sensibilização das células radorresistentes aos efeitos da radiação, pelo que o perfil de redução da atividade metabólica tornou-se semelhante ao da linha celular nativa WiDr com o tratamento com doses mais elevadas. Embora não se encontrem ainda estudos publicados acerca da atividade metabólica das células tumorais em resposta à combinação de butirato com a radiação ionizante, vários estudos com HDACi e outros fármacos que induzem a diferenciação mostram a inibição da atividade metabólica de forma mais acentuada (Ferreira, 2014; Karagiannies *et al.*, 2005; Patties *et al.*, 2013).

As diferenças observadas na atividade metabólica entre as duas linhas celulares com a presença de butirato nas células podem estar relacionadas com a desregulação da expressão de genes associados a potenciais vias de sinalização, tais como as vias PI3K/Akt/mTOR (do inglês *phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin*) e Wnt/ $\beta$ -catenina. A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR tem um papel importante no crescimento e na proliferação celular, e encontra-se frequentemente desregulada nas células tumorais devido a mutações. (Chang *et al.*, 2013). A radorresistência tumoral está associada à ativação da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR pela radiação. A inibição desta via no CCR aumenta a sensibilização à radiação tanto *in vitro* como *in vivo* (Chen *et al.*, 2015). A via Wnt/ $\beta$ -catenina está também envolvida na radorresistência de células do CCR, tendo sido demonstrado que a inibição desta via pode sensibilizar as células através da diminuição da ALDH (do inglês *aldehyde dehydrogenase*) (Bastos *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2015). A desregulação destas vias pode derivar da instabilidade genómica causada pelos efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante, nomeadamente no procedimento de indução de resistência à radioterapia para o estabelecimento da linha celular radorresistente WiDr/10x. Além disso, observou-se também que a diminuição da atividade metabólica foi tanto maior quanto maior o tempo de incubação no tratamento de ambas as linhas com radioterapia em combinação com o butirato, o que sugere que os efeitos induzidos estão mais relacionados com os efeitos indiretos da radiação, que podem não ser efeitos imediatos.

Tendo-se verificado que as concentrações de butirato utilizadas exercem um efeito de radiosensibilização na proliferação de ambas as linhas celulares, prosseguiu-se com o estudo da sobrevivência celular em resposta à radioterapia combinada com o butirato com o intuito de avaliar os efeitos da radiação nas células a longo prazo. Os resultados obtidos pelo ensaio

clonogénico indicaram uma diminuição do fator de sobrevivência de forma dependente da dose de radiação, tanto na linha celular nativa WiDr como na linha celular radorresistente WiDr/10x. As diferenças da sobrevivência entre as linhas celulares observaram-se com os tratamentos com doses mais elevadas de radiação. Assim, os fatores de sobrevivência foram significativamente superiores com as doses de 6 e de 10 Gy na linha radorresistente WiDr/10x relativamente à linha celular nativa WiDr, o que indica que as células WiDr apresentaram maior sensibilidade à radioterapia combinada com o butirato. Os  $DL_{50}$  obtidos com o tratamento de radiosensibilização foram de 2,98 Gy para a linha celular WiDr e de 3,22 Gy para a linha celular WiDr/10x. Pela análise deste parâmetro verificou-se um valor de  $DL_{50}$  superior nas células radorresistentes WiDr/10x em relação às células WiDr, corroborando os valores dos fatores de sobrevivência. Através da comparação dos  $DL_{50}$  obtidos nas células radorresistentes com a irradiação isolada (mencionados anteriormente) e a irradiação em combinação com o butirato, é possível concluir que a concentração de butirato utilizada na radiosensibilização promoveu a diminuição da sobrevivência celular, sendo verificada uma diminuição do valor de  $DL_{50}$  de 4,80 Gy para 3,22 Gy, respetivamente. Por outro lado, na linha celular nativa WiDr não se verificaram diferenças entre os dois regimes de tratamento, o que sugere que o butirato não exerceu um efeito de radiosensibilização a longo prazo. Este resultado pode estar relacionado com a existência de subpopulações celulares mais resistentes à radiação e com maior capacidade clonogénica responsáveis pela estimulação da produção de fatores de sobrevivência angiogénicos e tumorais. Vários autores sugerem esta mesma explicação para a recorrência e o desenvolvimento de tumores após o tratamento, sugerindo ainda que estas subpopulações têm uma natureza semelhante às células estaminais, ou seja, estas células tumorais têm a capacidade de regenerar tumores completos (Clarke *et al.*, 2006; Ischenko *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2010; Zuch *et al.*, 2012).

De um modo geral, a partir destes resultados podemos concluir que a atividade metabólica e a sobrevivência da linha celular nativa WiDr foram afetadas de forma distinta com os dois tipos de tratamento. A radiosensibilização com a presença de butirato observada a curto prazo sugere que os efeitos diretos serão os mais predominantes nesta linha celular. Relativamente à linha celular radorresistente WiDr/10x, a distinção entre os resultados obtidos com cada um dos tratamentos é mais clara, demonstrando ser radorresistente em resposta ao tratamento de radioterapia isolada mas sensível aos efeitos da radiação com a presença do butirato. Este efeito foi constatado tanto na inibição da proliferação celular como na diminuição da sobrevivência celular, tendo-se obtido um valor de  $DL_{50}$  menor, o que sugere que tanto os efeitos diretos como os efeitos indiretos da radiação no DNA são evidenciados com o tratamento de radiosensibilização na linha celular radorresistente. Vários outros

investigadores demonstraram que o butirato induz um efeito radiosensibilizador levando à diminuição da sobrevivência de algumas linhas celulares humanas de cancro (Arundel *et al.*, 1985; Li *et al.*, 2015).

É de referir que os ensaios de MTT e clonogénico foram importantes para definir as doses de radiação a utilizar no estudo da morte celular e do stresse oxidativo. Escolheram-se as doses de 2 Gy e de 10 Gy com o propósito de avaliar o efeito de radiosensibilização do butirato no tratamento de radioterapia com doses baixas e com as doses mais elevadas. Este tipo de ensaios é muito utilizado para a validação de resultados obtidos em estudos de citotoxicidade e de radiosensibilização bem como para a avaliação de compostos utilizados em quimiorradioterapia (Balça-Silva *et al.*, 2012; Buch *et al.*, 2012).

Os efeitos da radiação ionizante nas células provocam sobretudo a indução de danos nas cadeias de DNA e o aumento do stresse oxidativo que consequentemente podem induzir morte celular. Como se verificou a inibição da proliferação e da sobrevivência celular em resposta ao tratamento de radiosensibilização com o butirato, foi imperativo obter uma análise mais específica da viabilidade celular e dos tipos de morte induzidos em resposta à radioterapia isolada e em combinação com o butirato. Para isso, recorreu-se à dupla marcação com AnV/IP por citometria de fluxo.

De acordo com os resultados obtidos, ambas as linhas celulares responderam de forma semelhante ao aumento da dose de radiação, observando-se um maior efeito na redução da viabilidade celular com o tratamento com as doses mais elevadas. Na linha celular nativa WiDr, o tratamento de radiosensibilização com o butirato levou a uma menor viabilidade celular tanto em doses baixas como nas mais elevadas relativamente à radioterapia isolada. Com a radiosensibilização verificou-se também uma acentuação das populações celulares em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose comparativamente à irradiação isolada, sendo a morte celular por apoptose tardia/necrose a mais predominante. Estes resultados corroboram os da proliferação celular da linha celular WiDr, na medida em que a radiosensibilização levou à redução da atividade metabólica bem como à diminuição da viabilidade e indução de morte celular por apoptose de forma mais acentuada. Por isso, podemos concluir que a presença do butirato induziu a radiosensibilização das células WiDr. Por sua vez, na linha celular radorresistente WiDr/10x verificou-se que a radiosensibilização com as doses baixas promoveu uma diminuição da viabilidade celular mais acentuada relativamente à irradiação isolada, embora com as doses mais elevadas não se tenham verificado diferenças entre os dois tipos de tratamento. Tendo em conta os resultados da proliferação celular, poder-se-ia esperar mais diferenças com a radiosensibilização mas, tal como discutido anteriormente, a diminuição da atividade metabólica pode indicar que foi induzido um fenótipo senescente nas

células radorresistentes. Por esta razão, a morte celular deve acontecer mais tardiamente, tal como foi verificado pelo ensaio clonogénico. Além disso, com a radiosensibilização com as doses mais elevadas conseguiu constatar-se também uma acentuação da morte celular por apoptose inicial, apesar da morte celular por necrose ser a mais prevalente.

Por fim, observou-se também que a presença do butirato sozinho, sem qualquer tratamento de radioterapia, induziu algumas diferenças na viabilidade em ambas as linhas celulares. Este resultado corrobora as observações do ensaio de citotoxicidade com o butirato, na medida em que a entrada de butirato nas células e a sua acumulação no núcleo pode induzir um fenótipo senescente, discutido na análise do metabolismo celular. Num estudo de *Shitikoza* e os seus colaboradores em fibroblastos resistentes à apoptose, foi verificado que o butirato tem a capacidade de induzir senescência devido à paragem do ciclo celular na fase G2/M (Shitikova *et al.*, 2011).

Quanto aos tipos de morte celular induzidos, concluiu-se que a morte celular por apoptose inicial é acentuada com a radiosensibilização em ambas as linhas celulares, sugerindo que a combinação do butirato com a radioterapia induz o aumento dos efeitos diretos da radiação, que são mais imediatos. Na linha celular WiDr/10x observou-se uma menor indução da morte celular por apoptose tardia/necrose em relação à linha celular WiDr, diferença esta que pode derivar das células radorresistentes se encontrarem ainda senescentes ou em catástrofe mitótica, dando-se uma morte celular tardia quando estas tentam iniciar um processo mitótico.

Como foi referido, os efeitos da radiação podem induzir a ativação das vias intrínseca e extrínseca que promovem a morte celular por apoptose num espaço de tempo curto após a ocorrência de danos no DNA ou o aumento do stresse oxidativo. (Joiner & Kogel *et al.*, 2009). A radiação pode também induzir senescência tornando temporariamente as células incapazes de realizar a divisão celular. Um dos eventos determinantes na indução de apoptose após a ocorrência de danos no DNA é a ativação da proteína P53 que pode promover a reparação de danos no DNA ou o bloqueio do ciclo celular. Porém, a linha celular WiDr tem uma mutação na proteína P53, o que impede que esta interaja com a proteína P21 envolvida na paragem do ciclo celular. Apesar de já ter sido demonstrada a necessidade da proteína P53 para a ativação da morte celular em resposta à radiação ionizante, esta molécula não é precisa para todas as formas de indução da apoptose (Lowe *et al.*, 1993). Na ausência da função da P53, a apoptose é causada por outros estímulos que devem recorrer a fatores de transcrição diferentes para a ativação do mesmo padrão de genes envolvidos no processo de morte celular. Alguns dos mecanismos de apoptose induzidos pela radiação ionizante, independentes da P53, foram já documentados como, por exemplo, no tratamento de gliomas (Afshar *et al.*,

2006), do cancro da próstata (Kyprianou & Rock, 1997) e de células endoteliais (Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994). Outro investigador demonstrou a ativação da morte celular por apoptose no tratamento de duas linhas celulares de cancro colorretal com radiação gama, na ausência da proteína P53 funcional. Estes resultados sugerem que a perda da proteína P53 pode anular a paragem do ciclo celular na fase G1, observando-se um atraso da apoptose precedido pela paragem do ciclo em G2/M (Bracey *et al.*, 1995).

Assim, tendo-se observado o aumento da apoptose com o aumento da dose de radiação e uma maior tendência na presença do butirato, considerou-se também importante estudar as alterações na família de proteínas BCL-2, nomeadamente determinar o balanço entre as proteínas pró-apoptótica BAX e a anti-apoptótica BCL-2. Alguns estudos demonstraram que os danos no DNA podem levar ao aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas, promovendo a indução da apoptose pela via mitocondrial sem intervenção da proteína P53 (Tait & Green, 2010; Degenhardt *et al.*, 2002).

Quanto aos resultados obtidos na linha celular nativa WiDr, foi verificado que a radioterapia isolada levou a um aumento da razão BAX/BCL-2 de forma não dependente da dose de radiação e sem apresentar diferenças significativas relativamente às culturas não irradiadas. Por outro lado, em combinação com o butirato verificou-se uma maior razão BAX/BCL-2 relativamente à irradiação isolada, sendo esta significativa relativamente às culturas tratadas com butirato e não irradiadas. Este resultado corrobora os da viabilidade celular, na medida em que se verificou uma tendência para o aumento da população de células em apoptose com o tratamento de radiosensibilização com butirato. Na linha celular radorresistente WiDr/10x não se verificaram alterações na razão BAX/BCL-2 com a radioterapia isolada. Por sua vez, a combinação do butirato com a irradiação levou ao aumento da razão BAX/BCL-2 tanto com doses baixas como com as doses mais elevadas, embora sem significância estatística comparativamente com as culturas com butirato e não irradiadas. Apesar disso, a razão BAX/BCL-2 mostrou-se significativamente maior com a presença de butirato na irradiação com doses baixas comparativamente à irradiação isolada. Estes resultados mostram-se concordantes com os da atividade metabólica desta linha celular, concluindo-se que as células radorresistentes são menos sensíveis aos efeitos da radiação. Além disso, os resultados corroboram a acentuação da morte celular por apoptose observada no ensaio de viabilidade com a radiosensibilização, demonstrando que o butirato exerce um efeito radiosensibilizador na linha celular WiDr/10x.

Em ambas as linhas celulares observou-se um aumento da razão BAX/BCL-2 com o tratamento de radiosensibilização com o butirato, o que significa que ocorreu um aumento da indução da apoptose pela via intrínseca (Grivicich, *et al.*, 2007). Os resultados sugerem

também que o butirato promoveu uma maior radiosensibilização na linha celular nativa WiDr do que na linha celular radorresistente WiDr/10x. Adhikari e os seus colegas verificaram resultados semelhantes com a radioterapia de uma linha celular de cancro do endométrio, nas quais o tratamento prévio com butirato mostrou um aumento da expressão da proteína pró-apoptótica BAX, que se correlacionou com a potencialização dos efeitos da radiação e o aumento da morte celular. Estes investigadores sugerem também que o efeito de radiosensibilização do butirato pode ser bloqueado em células que sobreexpressam a proteína anti-apoptótica BCL-2 (Adhikari *et al.*, 2000). De facto, pela análise isolada dos valores da expressão basal de BAX e de BCL-2 observaram-se níveis de BCL-2 aumentados na linha celular radorresistente WiDr/10x comparativamente aos da linha celular nativa WiDr. Observou-se também que a presença de butirato nas células levou a um aumento dos níveis de BAX em ambas as linhas celulares, sendo os nossos resultados concordantes com os destes investigadores.

Relativamente à razão entre monómeros e agregados verificou-se um aumento com o aumento da dose de radiação na linha celular nativa WiDr, indicando uma diminuição do potencial da membrana mitocondrial mais acentuada e, conseqüentemente, um aumento da apoptose com as doses mais elevadas. Porém, verificou-se que este aumento foi apenas significativo com a presença de butirato em combinação com a radiação. Com a radioterapia isolada na linha celular radorresistente WiDr/10x foram obtidos resultados inesperados, verificando-se um aumento da razão monómeros/agregados com as doses mais elevadas com significância estatística relativamente às culturas não irradiadas. O tratamento de radiosensibilização com o butirato induziu também um aumento daquela razão com as doses de radiação mais elevadas mas, pelo contrário, não se verificou uma acentuação da razão relativamente à irradiação isolada. Os resultados obtidos na linha celular nativa WiDr corroboram os resultados da razão BAX/BCL-2, indicando que o aumento acentuado da apoptose se relaciona com o efeito de radiosensibilização do butirato. Relativamente à linha celular radorresistente WiDr/10x, não foram observadas muitas diferenças na apoptose entre os dois tipos de tratamento, estando de acordo com os resultados da viabilidade celular. Este resultado reforça a hipótese da senescência das células resultar numa morte celular tardia e, por isso, não se observarem alterações imediatas após 72 horas com o tratamento de radiosensibilização com butirato.

Considerou-se também relevante o estudo das alterações no ciclo celular induzidos em resposta à radioterapia de forma a analisar possíveis bloqueios em *checkpoints* específicos do ciclo celular. A radiação ionizante pode induzir a paragem do ciclo nas transições entre as fases G1-S e G2-M (Kleiman *et al.*, 2013). Além disso, o butirato pode também condicionar as

fases do ciclo celular promovendo a expressão do gene *CDKN1A* (do inglês *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) que codifica a proteína P21. A inibição das HDAC causa a sobreexpressão da P21 e conseqüentemente provoca o bloqueio do ciclo celular e a inibição da diferenciação celular (Minuci *et al.*, 2006; Encarnação *et al.*, 2015).

Na linha celular WiDr foi possível constatar alterações mais visíveis no tratamento com as doses de radiação mais elevadas, ocorrendo uma diminuição significativa da população celular na fase G0/G1 e um aumento significativo da população na fase G2/M, o que indicou a paragem do ciclo celular nesta fase. Verificou-se que a radiação combinada com o butirato levou a um bloqueio mais acentuado do ciclo celular na fase G2/M, o que sugere que o butirato exerceu um efeito radiosensibilizante no tratamento com as doses de radiação mais elevadas, com diferenças significativas em comparação à irradiação isolada. Verificou-se também um aumento ligeiro da fase pré-G1 (correspondente ao pico apoptótico) com as doses mais elevadas, semelhante ao resultado obtido com a presença de butirato. De forma análoga, na linha celular radiorresistente WiDr/10x verificaram-se maiores alterações no ciclo celular no tratamento de radioterapia com as doses de radiação mais elevadas. Em correspondência à diminuição significativa das células na fase G0/G1 verificou-se um aumento significativo da população celular na fase G2/M com as doses mais elevadas, acentuando-se com a radiosensibilização com butirato. O tratamento com butirato isolado nas células WiDr/10x induziu um bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, podendo estar relacionado com o bloqueio acentuado desta fase quando combinado com 10 Gy de radiação.

Os resultados de ambas as linhas celulares corroboram os resultados obtidos no ensaio de MTT, onde se observou uma menor atividade metabólica com o tratamento de radiosensibilização com butirato. Um estudo de *Munshi* e seus colegas demonstrou que o butirato induziu a radiosensibilização em duas linhas celulares humanas de melanoma, nas quais ocorreu um aumento da apoptose induzida pela radiação ionizante, que não se relacionou com a sobrevivência celular mas sim com a supressão de genes reguladores da reparação do DNA, nomeadamente os genes que codificam as proteínas Ku70 e Ku86 (Munshi *et al.*, 2005).

De acordo com os resultados dos ensaios de avaliação da morte celular e tendo em conta os resultados da proliferação celular, pode colocar-se a hipótese dos danos no DNA induzirem senescência nas células devido ao bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, ficando estas incapazes de proliferar. De facto, a definição clássica da senescência refere-se apenas ao bloqueio do ciclo celular na fase G1 desencadeado pelo encurtamento de telómeros nos cromossomas de células primárias mais velhas (Gire & Dulic, 2015). Contudo, vários estudos têm demonstrado que a proteína P21 pode mediar o bloqueio do ciclo celular induzido pelos

danos no DNA na fase G2/M e ser responsável pelo início do estado de senescência das células (Ye *et al.*, 2013). Além disso, Matsui e colegas estudaram os efeitos da radiação na apoptose e no ciclo celular em células de rato transfetadas com diferentes mutações na proteína P53. Neste estudo verificaram que os níveis de P53 se mantiveram após a irradiação das culturas celulares com a P53 mutada, embora se tenha detetado algum aumento da apoptose, o que sugere que as mutações na P53 representam um fenótipo que afeta a sensibilidade à radiação, mas não é dependente para a via de sinalização da ativação da apoptose (Matsui *et al.*, 2001). Uma forma interessante de estudar o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M poderá ser através da determinação da expressão da proteína P21 em resposta ao tratamento de radiosensibilização com butirato, bem como a influência do butirato na expressão da proteína P21 de ambas as linhas celulares.

Com os resultados da avaliação da morte celular às 72 horas, pode concluir-se que a presença de butirato na radioterapia promoveu um aumento da radiosensibilização em ambas as linhas celulares. Seria interessante fazer o estudo da morte celular noutros tempos como às 24 horas de forma a evidenciar principalmente os efeitos diretos da radiação na viabilidade celular e no ciclo celular. Um estudo de Koprinarova e colegas mostrou que o butirato não impôs a paragem do ciclo em G2/M na linha celular de cancro cervical HeLa. Por outro lado, o butirato inibe a reparação de quebras duplas, ou DSB, nas cadeias de DNA. Estes investigadores sugerem que após a quebra das cadeias de DNA, as HDAC deacetilam os núcleos das histonas na vizinhança das DSB de forma a compactar a cromatina e a prevenir o movimento livre das cadeias de DNA, permitindo uma reparação efetiva (Koprinarova *et al.*, 2011). Torna-se deste modo importante avaliar os danos no DNA pelo ensaio de cometa assim como a indução de DSB e a instabilidade genómica por quantificação da formação de  $\gamma$ H2AX, um marcador destes danos do DNA.

O aumento da apoptose verificado pode resultar não só do bloqueio do ciclo celular, mas também como consequência de outros estímulos endógenos como o aumento do stresse oxidativo. Assim, foi importante a avaliação das espécies reativas de oxigénio (ROS) e das defesas antioxidantes em resposta à radioterapia combinada com o butirato.

Relativamente à determinação da concentração intracelular de peróxidos, a análise dos resultados permitiu verificar um aumento da produção de peróxidos relativamente ao controlo, estatisticamente significativo apenas na linha celular radiorresistente WiDr/10x mas não dependente do aumento da dose de radiação. Em contraste, o tratamento prévio das células com o butirato promoveu uma formação de peróxidos mais acentuada comparativamente à irradiação isolada, com significância estatística em relação às células não irradiadas. Na linha celular radiorresistente WiDr/10x constataram-se resultados similares,



nas quais a radioterapia combinada com o butirato promoveu um aumento mais acentuado da concentração de peróxidos com as doses de radiação mais elevadas comparativamente à irradiação isolada respetiva, com significância estatística relativamente às culturas não irradiadas.

Os resultados da avaliação da concentração intracelular do anião superóxido mostraram o seu aumento apenas com os tratamentos com as doses de radiação mais elevadas na linha celular nativa WiDr, verificando-se diferenças significativas em ambos os tipos de tratamento relativamente às culturas celulares não irradiadas. A presença de butirato aquando da irradiação das células promoveu a acentuação da produção do anião superóxido, embora sem diferenças significativas comparativamente à irradiação isolada. Por sua vez, não foram verificadas alterações nos níveis de anião superóxido com os tratamentos nas células radorresistentes WiDr/10x, exceto quando a radioterapia foi combinada com o butirato, no qual se observou que as doses de radiação mais elevadas induziram um aumento significativo de anião superóxido relativamente às culturas não irradiadas. Estes resultados parecem indicar que uma maior tendência para o aumento da produção de anião superóxido com a presença do butirato, o que sugere que este contribuiu para o aumento da radiosensibilidade das linhas celulares. Porém, esse efeito é mais notório na linha celular nativa WiDr do que na linha celular radorresistente WiDr/10x, o que corrobora a viabilidade celular.

Por fim, quanto à expressão de GSH não foram observadas diferenças nos seus níveis com o aumento da dose de radiação nos dois tipos de tratamento, tanto na linha celular WiDr como na linha celular radorresistente WiDr/10x. A presença do butirato não alterou os níveis desta defesa antioxidante relativamente à radiação isolada.

A produção de ROS é um processo que representa a constante instabilidade que pode ser provocada no material genético das células. Uma produção exacerbada de ROS através de estímulos endógenos e exógenos pode prejudicar a homeostasia das células, aumentando o stresse oxidativo. Para além das espécies oxidativas poderem induzir mutações, aparentemente as ROS podem mediar vias de sinalização envolvidas na regulação da proliferação celular e, por isso, são fundamentais no estudo do processo de carcinogénese. O efeito do stresse oxidativo pode também estar relacionado com o tipo de radicais envolvidos, a sua reatividade e a concentração destes nas células (Valko *et al.*, 2006).

De acordo com os resultados obtidos, não aconteceram alterações nos níveis de GSH, pelo que podemos inferir que os mecanismos de defesa antioxidantes não foram ativados. Por outro lado, este resultado também pode ser explicado pela incapacidade das células repararem os danos causados sendo ativados mecanismos que terminam na morte celular. Contudo, verificou-se um aumento dos níveis de peróxidos e do anião superóxido, o que sugere que a

desregulação entre o balanço de espécies oxidantes e espécies antioxidantes induziu o aumento do stresse oxidativo em ambas as linhas celulares. Por outro lado, a formação de ROS não apresentou diferenças entre os dois tipos de tratamento pelo que o efeito de radiosensibilização do butirato na indução de stresse oxidativo parece ser reduzido. Ainda assim, será importante confirmar estes resultados através da determinação dos níveis de outras moléculas antioxidantes como a superóxido dismutase (Birben *et al.*, 2012). O estudo do stresse oxidativo foi realizado 24 horas após os tratamentos pelo que no futuro é de interesse o estudo dos efeitos da radiosensibilização com butirato em períodos de tempo mais curtos após as irradiações. Alguns estudos indicam que a concentração de ROS intracelular é bastante alterada momentos após o tratamento com radioterapia (Sosa *et al.*, 2013; Kwak *et al.*, 2014). O aumento de ROS observado após a irradiação com as doses de radiação mais elevadas pode estar na origem do aumento da apoptose, que se verificou no ensaio de viabilidade celular em ambas as linhas celulares.

Resumidamente, este trabalho permitiu avaliar a interferência do butirato no metabolismo de uma linha celular radorresistente, induzida a partir de uma linha celular humana nativa de cancro colorretal, bem como o seu efeito na radiosensibilização das células com várias doses de radiação. Os resultados obtidos permitiram confirmar que o butirato induziu um efeito citotóxico em ambas as linhas celulares, acentuando-se com o aumento da concentração e do tempo de incubação. Verificou-se também que o butirato interfere com o metabolismo glicolítico, levando à diminuição da produção de lactato na linha celular nativa WiDr e, de forma menos acentuada, na linha celular radorresistente WiDr/10x. Concluiu-se que as células radorresistentes WiDr/10x têm um metabolismo glicolítico mais reduzido e, dado que o butirato provocou menores alterações no metabolismo oxidativo destas células, a metabolização do butirato é ineficiente levando à acumulação deste no núcleo celular. No núcleo, o butirato inibe as HDAC e pode levar à inibição da proliferação celular bem como à indução de um fenótipo senescente. Esta hipótese pode ajudar à compreensão dos resultados da sobrevivência da linha celular WiDr/10x a longo prazo. De facto, os diversos estudos efetuados para a avaliação da radiosensibilização das células demonstraram que a presença de butirato promoveu a sensibilização das linhas células aos efeitos da radiação ionizante. A radiosensibilização promoveu aumento da apoptose e diminuição da viabilidade, embora este efeito se mostre mais acentuado na linha celular nativa WiDr. Porém, a radiosensibilização promoveu uma diminuição evidente na proliferação e da sobrevivência celulares da linha celular radorresistente WiDr/10x. Os efeitos da radiação podem induzir a ativação da morte celular e também causar senescência nas células pelo que podemos inferir que as células radorresistentes podem ficar senescentes e ter uma morte celular mais tardia. Além disso,

observou-se que a radiosensibilização induziu um aumento do bloqueio do ciclo celular na fase G2/M em ambas as linhas celulares, o que pode explicar a indução da senescência nas células. Quanto ao stresse oxidativo, observou-se um ligeiro aumento das espécies oxidativas com as doses mais elevadas de radiação e na presença de butirato que se correlaciona com a viabilidade celular. Por fim, o tratamento de radiosensibilização apresentou resultados muito promissores na linha celular WiDr/10x, mostrando o potencial do butirato na sensibilização de células com uma natureza radorresistente.

Como perspectivas futuras, será interessante alargar o espectro de concentrações de butirato utilizadas para o estudo da radiosensibilização das linhas celulares, visto que foram observados resultados promissores com este HDACi, como uma maior tendência para a morte celular por apoptose e aumento do stresse oxidativo. Além disso, as concentrações de butirato utilizadas são concentrações mínimas presentes nas células da mucosa do cólon em situações normais. A média da concentração de butirato é de 20 mM, a qual é facilmente atingida pela ingestão de uma dieta rica em fibra dietética (Cummings *et al.*, 1987; Donohoe *et al.*, 2012).

Os mecanismos e efeitos dos inibidores das HDAC na sensibilização das células radorresistentes ainda estão pouco estudados, embora já se conheçam vários fatores intrínsecos das células que influenciam a resistência aos efeitos da radiação ionizante entre mutações genéticas como a desregulação de determinadas vias de sinalização. A resistência à morte celular por apoptose pode estar relacionada com a inativação de genes pró-apoptóticos ou com um aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como a BCL-2 e a survivina (Roninson *et al.*, 2001). Por isso, são necessárias mais abordagens que suportem os resultados obtidos de forma a elucidar e a compreender de que forma os HDACi podem regular a sensibilidade das células à radiação.

Outra perspectiva futura incluirá a avaliação do efeito da radioterapia combinada com o butirato numa linha celular normal do cólon para verificar se o butirato exerce um efeito protetivo nas células normais. Além disso, devem ser realizados estudos *in vivo* em paralelo, de forma a analisar se o efeito de radiosensibilização do butirato observado nos estudos *in vitro* é traduzido no ambiente *in vivo*.

Uma dieta rica em fibra dietética pode ser a base da prevenção do CCR. A ingestão de frutos e de vegetais pode aumentar a concentração deste SCFA no lúmen do cólon de doentes de CCR e, verificando-se a hipótese deste trabalho, o butirato pode promover a sensibilização dos tumores colorretais aos efeitos da radiação melhorando assim a eficácia da radioterapia.

## **VI. BIBLIOGRAFIA**



- ABE, K., & MATSUKI, N. (2000). Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neuroscience Research*, 38(4), 325-329. doi:10.1016/S0168-0102(00)00188-7
- ABRAMOVA, M. V. [et al.] (2006). G1/S Arrest Induced by Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Butyrate in E1A + Ras-transformed Cells Is Mediated through Down-regulation of E2F Activity and Stabilization of  $\beta$ -Catenin. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 21040-21051. doi:10.1074/jbc.M511059200
- ADHIKARI, D. [et al.] (2000). Pretreatment of endometrial carcinoma cell lines with butyrate results in upregulation of Bax and correlates with potentiation of radiation induced cell kill. *In Vivo*, 14, 603-609.
- AFSHAR, G. [et al.] (2006). Radiation-induced caspase-8 mediates p53-independent apoptosis in glioma cells. *Cancer Research*, 66(8), 4223-4232.
- ANDRIAMIHAJA, M. [et al.] (2009). Butyrate metabolism in human colon carcinoma cells: implications concerning its growth-inhibitory effect. *Journal of Cellular Physiology*, 218, 58-65.
- ARUNDEL, C. M., GLICKSMAN, A. S., & LEITH, J. T. (1985). Enhancement of Radiation Injury in Human Colon Tumor Cells by the Maturational Agent Sodium Butyrate (NaB). *Radiation Research*, 104, 443-448.
- ASHKTORAB, H. (2009). Global Histone H4 Acetylation and HDAC2 Expression in Colon Adenoma and Carcinoma. *Digestive Diseases and Sciences*, 54(10), 2109-2117. doi:10.1007/s10620-008-0601-7
- BALÇA-SILVA, J. [et al.] (2012). Effect of miR-34b overexpression on the radiosensitivity of non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Research*, 32(5), 1603-1610.
- BARBARESKO, J. [et al.] (2013) Dietary pattern analysis and biomarkers of low-grade inflammation: a systematic literature review. *Nutrition Reviews*, 71(8), 511-527.
- BASKAR, R. [et al.] (2012). Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), 193-199. doi:10.7150/ijms.3635

- BASTOS, L. G. [et al.] (2014). Progeny from irradiated colorectal cancer cells acquire an EMT-like phenotype and activate Wnt/beta-catenin pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115, 2175-2187.
- BEDNER, E. [et al.] (1999). Analysis of Apoptosis by Laser Scanning Cytometry. *Cytometry*, 35, 181-195.
- BENSIGNOR, T. [et al.] (2014). Pathologic response of locally advanced rectal cancer to preoperative chemotherapy without pelvic irradiation. *Colorectal Disease*, 17(6), 491-498. doi:10.1111/codi.12879
- BESTEN, G. D. [et al.] (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2325-2340. doi:10.1194/jlr.R036012
- BIRBEN, E. [et al.] (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613
- BLOUIN, J. M. [et al.] (2011). Butyrate elicits a metabolic switch in human colon cancer cells by targeting the pyruvate dehydrogenase complex. *International Journal of Cancer*, 128(11), 2591-2601. doi:10.1002/ijc.25599
- BOLDEN, J. E., PEART, M. J., & JOHNSTONE, R. W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 769-784. doi:10.1038/nrd2133
- BONNER, W. M. (2003). Low-dose radiation: Thresholds, bystander effects, and adaptive responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9), 4973-4975. doi:10.1073/pnas.1031538100
- BORTNER, C. D., & CIDLOWSKI, J. A. (1999). Caspase Independent/Dependent Regulation of K1, Cell Shrinkage, and Mitochondrial Membrane Potential during Lymphocyte Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21953-21962.
- BRACEY, T. S. [et al.] (1995). Gamma-radiation-induced apoptosis in human colorectal adenoma and carcinoma cell lines can occur in the absence of wild type p53. *Oncogene*, 10, 2391-2396.

- BRÖMME, H. [et al.] (2008). DCFH 2 interactions with hydroxyl radicals and other oxidants - Influence of organic solvents. *Experimental Gerontology*, 43, 638-644. doi:10.1016/j.exger.2008.01.010
- BROWN, A. J. [et al.] (2003). The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short-chain carboxylic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11312-11319. doi:10.1074/jbc.M211609200
- BRYAN, A. K. [et al.] (2009). Measurement of mass, density, and volume during the cell cycle of yeast, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(3), 999-1004. doi:10.1073/pnas.0901851107
- BUCH, K. [et al.] (2012). Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - A comparative study. *Radiation Oncology*, 7(1), 1. doi:10.1186/1748-717X-7-1
- BUJANDA, L. [et al.] (2010). Malignant colorectal polyps. *World Journal of Gastroenterology*, 16(25), 3103-3111. doi:10.3748/wjg.v16.i25.3103
- CHANG-CLAUDE, J. [et al.] (2009). Genetic polymorphisms in DNA repair and damage response genes and late normal tissue complications of radiotherapy for breast cancer. *British Journal of Cancer*, 100(10), 1680-1686. doi:10.1038/sj.bjc.6605036
- CHANG, L. [et al.] (2013). Acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance. *Cell Death and Disease*, 4, e875-e875.
- CHEN, T. R. [et al.] (1987). WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 27(1), 125-134. doi:10.1016/0165-4608(87)90267-6
- CHEN, M. F. [et al.] (2010). Role of Peroxiredoxin I in rectal cancer and related to p53 status. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 78(3), 868-878. doi:10.1016/j.ijrobp.2010.05.025
- CHOROST, M. I. [et al.] (2004). Colon Cancer Screening: Where Have We Come from and Where Do We Go? *Journal of Surgical Oncology*, 85(1), 7-13. doi:10.1002/jso.20008



- CLARKE, M. F. [et al.] (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Research*, 66(19), 9339-9344.
- CLAUSEN, M. R., BONNÉN, H., & MORTENSEN, P. B. (1991). Colonic fermentation of dietary fibre to short-chain fatty acids in patients with adenomatous polyps and colonic cancer. *Gut*, 32(8), 923-928.
- Colon Cancer Treatment. National Cancer Institute (acedido em abril 2015, <http://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq>)
- COMALADA, M. [et al.] (2006). The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 132(8), 487-497. doi:10.1007/s00432-006-0092-x
- COOK, S. I., & SELLIN, J. H. (1998). Review article: short-chain fatty acids in health and disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 12(6), 499-507.
- CUMMINGS, J. H., [et al.] (1987). Short-chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28(10), 1221-1227.
- CUMMINGS, J. H., & MACFARLANE, G. T. (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *The Journal of Applied Bacteriology*, 70(6), 443-459. doi:10.1111/j.1365-2672.1991.tb02739.x
- DAVIE, J. R. (2003). Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate. *Journal of Nutrition*, 133(7 Suppl):2485S-2493S.
- DARZYNKIEWICZ, Z. [et al.] (1992). Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry. *Cytometry*, 13, 795-808.
- DASHWOOD, R. H., MYZAK, M. C., & HO, E. (2006). Dietary HDAC inhibitors: time to rethink weak ligands in cancer chemoprevention? *Carcinogenesis*, 27(2), 344-349. doi:10.1093/carcin/bgi253
- DAVEY, H. M., & KELL, D. B. (1996). Flow Cytometry and Cell Sorting of Heterogeneous Microbial Populations: the Importance of Single-Cell Analyses. *Microbiological Reviews*, 60(4), 641-696.

- DEGENHARDT, K. [et al.] (2002). Bax and Bak independently promote cytochrome c release from mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 14127-14134.
- Diagnóstico, Estadiamento e Tratamento do Adenocarcinoma Colo-Rectal, Norma da Direção-Geral da Saúde, 025/2012. (2012)
- DIETRICH, C. G. [et al.] (2011). Downregulation of breast cancer resistance protein in colon adenomas reduces cellular xenobiotic resistance and leads to accumulation of a food-derived carcinogen. *International Journal of Cancer*, 129(3), 546-552. doi:10.1002/ijc.25958
- DIETZ, D. W. (2013). Multidisciplinary Management of Rectal Cancer: The OSTRICH. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 17(10), 1863-1868. doi:10.1007/s11605-013-2276-4
- DONOHOE, D. R. [et al.] (2011). The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metabolism*, 13(5), 517-526. doi:10.1016/j.cmet.2011.02.018
- DONOHOE, D. R. [et al.] (2012). The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation. *Molecular Cell*, 48(4), 612-624. doi:10.1016/j.molcel.2012.08.033
- DRONAMRAJU, S. S. [et al.] (2008). Role of DNA-mismatch repair in anti-neoplastic effects of butyrate. *Proceedings of the Nutrition Society*, 67(OCE), E87. doi:10.1017/S0029665108007192
- EBERT, M. N. [et al.] (2003). Expression of glutathione S-transferases (GSTs) in human colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate. *Carcinogenesis*, 24(10), 1637-1644. doi:10.1093/carcin/bgg122
- EISENBERG, R. L. *Gastrointestinal Radiology*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2002) ISBN: 0781737060.
- EL-BAHRAWY, M. [et al.] (2004). Characterization of the E-cadherin/catenin complex in colorectal carcinoma cell lines. *International Journal of Experimental Pathology*, 85(2), 65-74. doi:10.1111/j.0959-9673.2004.0371.x
- ENCARNAÇÃO, J. C. O butirato e o irinotecano: a sinergia na terapêutica do Cancro do Cólon. Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra (2014).

- ENCARNAÇÃO, J. C. [et al.] (2015). Revisit dietary fiber on colorectal cancer: butyrate and its role on prevention and treatment. *Cancer and Metastasis Reviews*, 34(3), 465-478. doi: 10.1007/s10555-015-9578-9
- ENTIN-MEER, M. (2005). Butyric acid prodrugs are histone deacetylase inhibitors that show antineoplastic activity and radiosensitizing capacity in the treatment of malignant gliomas. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(12), 1952-1961. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0087
- ENTIN-MEER, M. [et al.] (2007). In vivo efficacy of a novel histone deacetylase inhibitor in combination with radiation for the treatment of gliomas. *Neuro-Oncology*, 9(2), 82-88. doi:10.1215/15228517-2006-032
- FALKENBERG, K. J., & JOHNSTONE, R. W. (2014). Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(9), 673-691. doi:10.1038/nrd4360
- FAN, J. [et al.] (2011). Tyrosine phosphorylation of lactate dehydrogenase A is important for NADH/NAD(+) redox homeostasis in cancer cells. *Molecular and Cellular Biology*, 31(24), 4938-4950. doi:10.1128/MCB.06120-11
- FANALI, C. [et al.] (2014). Cancer stem cells in colorectal cancer from pathogenesis to therapy: Controversies and perspectives. *World Journal of Gastroenterology*, 20(4), 923-942. doi:10.3748/wjg.v20.i4.923
- FAZIO, C., & RICCIARDIELLO, L. (2014). Components of the Mediterranean Diet with chemopreventive activity toward colorectal cancer. *Phytochemistry Reviews*. doi:10.1007/s11101-014-9346-4
- FERLAY, J. [et al.] (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, 49(6), 1374-1403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027
- FERREIRA, A. I. Resistência à Radioterapia no Cancro do Cólon. Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra (2014).
- FINI, L. [et al.] (2011) Chemoprevention of intestinal polyps in ApcMin/? mice fed with western or balanced diets by drinking annurca apple polyphenol extract. *Cancer Prevention Research*, 4(6), 907-915.

- FLOCH, M. H., & HONG-CURTISS, J. (2001). Probiotics and functional foods in gastrointestinal disorders. *Current Gastroenterology Reports*, 3(4), 343-350. doi:10.1007/s11938-002-0054-6
- FRIDMAN, J. S., & LOWE, S. W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22(56), 9030-9040. doi:10.1038/sj.onc.1207116
- GANESH, B., TALOLE, S. D., & DIKSHIT, R. (2009). A case-control study on diet and colorectal cancer from Mumbai, India. *Cancer Epidemiology*, 33(3-4), 189-193. doi:10.1016/j.canep.2009.07.009
- GILL, R. K. [et al.] (2005). Expression and membrane localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 289(4), C846-C852. doi:10.1152/ajpcell.00112.2005
- GIRE, V., & DULIC, V. (2015). Senescence from G2 arrest, revisited, *Cell Cycle*, 14(3), 297-304. doi:10.1080/15384101.2014.1000134
- GONÇALVES, P. [et al.] (2009). Modulation of butyrate transport in Caco-2 cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 379(4), 325-336. doi:10.1007/s00210-008-0372-x
- GONÇALVES, P., GREGORIO, I., & MARTEL, F. (2011). The short-chain fatty acid butyrate is a substrate of breast cancer resistance protein. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 301(5), C984-C994. doi:10.1152/ajpcell.00146.2011
- GONÇALVES, P., & MARTEL, F. (2013). Butyrate and colorectal cancer: the role of butyrate transport. *Current Drug Metabolism*, 14(9), 994-1008. doi:10.2174/1389200211314090006
- GONÇALVES, T. Efeito do Butirato no Metabolismo do Cancro Colorretal. Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra (2014).
- GROSEL, B. [et al.] (2013). Histone deacetylase inhibitors as radiosensitisers: effects on DNA damage signalling and repair. *British Journal of Cancer*, 108(4), 748-754. doi:10.1038/bjc.2013.21

- GUILLOTEAU, P. [et al.] (2010). From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews*, 23(2), 366-384. doi:10.1017/S0954422410000247
- GUPTA, N. [et al.] (2006). SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. *Life Sciences*, 78(21), 2419-2425. doi:10.1016/j.lfs.2005.10.028
- HADJIAGAPIOU, C. [et al.] (2000). Mechanism(s) of butyrate transport in Caco-2 cells: role of monocarboxylate transporter 1. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(4), G775-G780.
- HAGGAR, F. A., & BOUSHEY, R. P. (2009). Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 6(212), 191-197. doi:10.1055/s-0029-1242458.
- HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A., [et al.] (1994). Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 180, 525-535.
- HAMER, H. M. [et al.] (2008). Review article: The role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 27(2), 104-119. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x
- HARRISON, L. E., WANG, Q. M., & STUDZINSKI, G. P. (2015). Butyrate-induced G2/M block in Caco-2 colon cancer cells is associated with decreased p34cdc2 activity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 222(2), 150-156. doi:10.1046/j.1525-1373.1999.d01-125.x
- VAN HEERDE, W. L. [et al.] (2000). Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. *Cardiovascular Research*, 45, 549-559.
- HEI, T. K. [et al.] (2015). Mechanism of radiation-induced bystander effects: a unifying model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(8), 943-950. doi:10.1211/jpp.60.8.0001
- HENGARTNER, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 810-816.
- HIJOVA, E., & CHMELAROVA, A. (2007). Short-chain fatty acids and colonic health. *Bratislava Medical Journal*, 108(8), 354-358.

- HITTELMAN, W. N. [et al.] (2010). Are cancer stem cells radioresistant?. *Future Oncology*, 6(10), 1563-1576. doi:10.2217/fon.10.121
- HOFMANOVÁ, J. [et al.] (2009). Human fetal colon cells and colon cancer cells respond differently to butyrate and PUFAs. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(SUPPL. 1), 102-113. doi:10.1002/mnfr.200800175
- HOPE, M. E. [et al.] (2005). Sporadic colorectal cancer - Role of the commensal microbiota. *FEMS Microbiology Letters*, 244(1), 1-7. doi:10.1016/j.femsle.2005.01.029
- ILYAS, M. [et al.] (1997). 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), 10330-10334. doi:10.1073/pnas.94.19.10330
- ISCHENKO, I. [et al.] (2008). Cancer stem cells: how can we target them?. *Current Medicinal Chemistry*, 15(30), 3171-3184.
- ITO, T. (2007). Role of histone modification in chromatin dynamics. *Journal of Biochemistry*, 141(5), 609-614. doi:10.1093/jb/mvm091
- ITZKOWITZ, S. H., & YIO, X. (2004). Inflammation and Cancer IV. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: The Role of Inflammation. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287(1), G7-G17. doi:10.1152/ajpgi.00079.2004
- JOINER, M. & VAN DER KOGEL, A. *Basic Clinical Radiobiology*. (Hodder Arnold Publication, 2009) ISBN: 9780340929667
- JONES, P. A., & BAYLIN, S. B. (2002). The Fundamental Role of Epigenetic Events in Cancer. *Nature Reviews Genetics*, 3(6), 415-428. doi:10.1038/nrg816
- JORDAN, C. T., GUZMAN, M. L., & NOBLE, M. (2006). Cancer Stem Cells. *New England Journal of Medicine*, 355, 1253-1261.
- KARAGIANNIS, T. C., HARIKRISHNAN, K. N., & EL-OSTA, A. (2005). The histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, enhances radiation sensitivity and accumulation of gammaH2A.X. *Cancer Biology & Therapy*, 4(7), 787-793. doi:10.4161/cbt.4.7.1922

- KATOCH, O., DWARANKANATH, B. S., & AGRAWALA, P. K. (2013). HDAC inhibitors : applications in oncology and beyond. *HOAJ Biology*. doi:10.7243/2050-0874-2-2
- KAZ, A. M., & BRETNALL, T. A. (2006). Genetic testing for colon cancer. *Nature Clinical Practice - Gastroenterology & Hepatology*, 3(12), 670-679. doi:10.1038/ncpgasthep0663
- KHAN, Y. [et al.] (2013). Clinical and Dosimetric Implications of Air Gaps between Bolus and Skin Surface during Radiation Therapy. *Journal of Cancer Therapy*, 4, 1251-1255. doi:10.4236/jct.2013.47147
- KHODAPASAND, E. [et al.] (2015). Is Bax/Bcl-2 Ratio Considered as a Prognostic Marker with Age and Tumor Location in Colorectal Cancer? *Iranian Biomedical Journal*, 19(2), 69-75. doi:10.6091/ibj.1366.2015
- KIM, J. J., & TANNOCK, I. F. (2005). Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nature Reviews Cancer*, 5(7), 516-525. doi:10.1038/nrc1650
- KLEIMAN, L. B. [et al.] (2013). Comparative Analysis of Radiosensitizers for K-RAS Mutant Rectal Cancers. *PLOS One*, 8(12). doi:10.1371/journal.pone.0082982
- KOCH, U., KRAUSE, M., & BAUMANN, M. (2010). Cancer stem cells at the crossroads of current cancer therapy failures--radiation oncology perspective. *Seminars in Cancer Biology*, 20(2), 116-124.
- KOPRINAROVA, M., BOTEV, P., & RUSSEV, G. (2011). Histone deacetylase inhibitor sodium butyrate enhances cellular radiosensitivity by inhibiting both DNA nonhomologous end joining and homologous recombination. *DNA Repair*, 10(9), 970-977. doi:10.1016/j.dnarep.2011.07.003
- KUMAR, V., ABBAS A. K., FAUSTO N. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. (W. B. Saunders Co., 2004) ISBN: 0721601871.
- KUNZMANN, A. T. [et al.] (2015). Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer and incident and recurrent adenoma in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 102(4), 881-90. doi:10.3945/ajcn.115.113282

- KWAK, J. (2014). Fucoidan as a Marine Anticancer Agent in Preclinical Development. *Marine Drugs*, 12(2), 851-870. doi:10.3390/md12020851
- KYPRIANOU, N., ROCK S. (1997). Radiation-induced apoptosis of human prostate cancer cells is independent of mutant p53 overexpression. *Anticancer Research*, 18, 897-905.
- LAMAS, M. J. [et al.] (2012). X-ray cross-complementing group I and thymidylate synthase polymorphisms might predict response to chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 82(1), 138-144. doi:10.1016/j.ijrobp.2010.09.053
- LANGDON, S. P. *Cancer Cell Culture Methods and Protocols* (Humana Press, 2004) ISBN: 978-1-59259-406-1
- LEITH, J. T. (1988). Potentiation of X Ray Sensitivity by Combinations of Sodium, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 15, 949-951
- LI, G. [et al.] (2008). Advances in 4D medical imaging and 4D radiation therapy. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 7(1), 67-81. doi:10.1118/1.3553556
- LI, L. [et al.] (2015). Histone deacetylase inhibitor sodium butyrate suppresses DNA double strand break repair induced by etoposide more effectively in MCF-7 cells than in HEK293 cells. *BMC Biochemistry*, 16(1), 2. doi:10.1186/s12858-014-0030-5
- LIU, L. [et al.] (2010). An apple oligogalactan prevents against inflammation and carcinogenesis by targeting LPS/TLR4/NF-kappaB pathway in a mouse model of colitis-associated colon cancer. *Carcinogenesis*, 31(10), 1822-1832.
- LOWE, S. W. [et al.] (1993). P53 is required for Radiation-Induced Apoptosis in Mouse Thymocytes. *Nature*, 362, 847-849.
- LUCAS, L., RUSSELL, A., KEAST, R. (2011). Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Current Pharmaceutical Design*, 17(8), 754-768.
- LYNCH, H. T., & LA CHAPELLE, A. (2003). Hereditary Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(10), 919-932. doi:10.1056/NEJMra012242



- MALLOY, C. R., SHERRY, A. D., & JEFFREY, F. M. H. (1988). Evaluation of Carbon Flux and Substrate Selection through Alternate Pathways Involving the Citric Acid Cycle of the Heart by  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 263(15), 6964-6971.
- MARKS, P. A. [et al.] (2004). Histone Deacetylase Inhibitors. *Advances in Cancer Research*, 91, 137-168. doi:10.1016/S0065-230X(04)91004-4
- MATSUI, Y., TSUCHIDA, Y., & KENG, P. C. (2001). Effects of p53 Mutations on Cellular Sensitivity to Ionizing Radiation. *American Journal of Clinical Oncology*, 24(5), 486-490.
- MEYER, J. [et al.] (2007). Advanced Radiation Therapy Technologies in the Treatment of Rectal and Anal Cancer: Intensity-Modulated Photon Therapy and Proton Therapy. *Clinical Colorectal Cancer*, 6(5), 348-356. doi:10.3816/CCC.2007.n.003
- MEYN, R. E., STEPHENS, L. C., & MILAS, L. (1996). Programmed cell death and radioresistance. *Cancer Metastasis Reviews*, 15(1), 119-131.
- MILAS, L. [et al.] (2004). Epidermal growth factor receptor and tumor response to radiation: In vivo preclinical studies. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 58(3), 966-971. doi:10.1016/j.ijrobp.2003.08.035
- MINUCCI, S., PELICCI, P. G. (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *National Reviews Cancer*, 6, 38-51.
- MOHIUDDIN, M. [et al.] (2000). Prognostic Significance of Postchemoradiation Stage Following Preoperative Chemotherapy and Radiation for Advanced/Recurrent Rectal Cancers. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 48(4), 1075-1080.
- MOSBY, S. Mosby's Review Questions for the National Board Dental Hygiene Examination. (Elsevier, 2014). ISBN: 0323316123.
- MOTHERSILL, C., & SEYMOUR, C. (2004). Radiation-induced bystander effects and adaptive responses — the Yin and Yang of low dose radiobiology?. *Mutation Research*, 568(1), 121-128. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.050
- MULLENDERS, L. [et al.] (2009). Assessing cancer risks of low-dose radiation. *Nature Reviews Cancer*, 9(8), 596-604. doi:10.1038/nrc2677

- MUNSHI, A. [et al.] (2005). Cancer Therapy: Preclinical Histone Deacetylase Inhibitors Radiosensitize Human Melanoma Cells by Suppressing DNA Repair Activity. *Clinical Cancer Research*, 11(13), 4912-4922.
- MURPHY, K. M. [et al.] (2000). Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death and Differentiation*, 7, 102-111.
- MURPHY, N. [et al.] (2012). Dietary fibre intake and risks of cancers of the colon and rectum in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *PLoS ONE*, 7(6). doi:10.1371/journal.pone.0039361
- NEUHAUS, E. M. [et al.] (1998). Ethane-Freezing/Methanol-Fixation of Cell Monolayers: A Procedure for Improved Preservation of Structure and Antigenicity for Light and Electron Microscopies. *Journal of Structural Biology*, 121, 326-342.
- NEW, M., OLZSCHA, H., & LA THANGUE, N. B. (2012). HDAC inhibitor-based therapies: Can we interpret the code? *Molecular Oncology*, 6(6), 637-656. doi:10.1016/j.molonc.2012.09.003
- NIMPTSCH, K. [et al.] (2014). Dietary patterns during high school and risk of colorectal adenoma in a cohort of middle-aged women. *International Journal of Cancer*, 134(10), 2458-2467. doi:10.1002/ijc.28578.
- NIX, P. [et al.] (2005). Bcl-2 expression predicts radiotherapy failure in laryngeal cancer. *British Journal of Cancer*, 92(12), 2185-2189. doi:10.1038/sj.bjc.6602647
- NOGUCHI, P. [et al.] (1979). Characterization of WiDr: a human colon carcinoma cell line. *In Vitro*, 15(6), 401-408.
- NOMURA, A. MY. [et al.] (2008). Association of vegetable, fruit, and grain intakes with colorectal cancer: the Multiethnic Cohort Study 1,2,3. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88(3), 730-737.
- OIKE, T. [et al.] (2014). Chromatin-regulating proteins as targets for cancer therapy. *Journal of Radiation Research*, 55(4), 613-628. doi:10.1093/jrr/rrt227

- O'CONNOR, J. E. [et al.] (1988). A Flow Cytometric Assay for Intracellular Nonprotein Thiols Using Mercury Orange. *Cytometry*, 9, 529-532.
- PEREIRA, S. L. [et al.] (2011). Metabolic Remodeling During H9c2 Myoblast Differentiation : Relevance for *In Vitro* Toxicity Studies. *Cardiovascular Toxicology*, 11, 180-190. doi:10.1007/s12012-011-9112-4
- PAJAK, B., ORZECZOWSKI, A., & GAJKOWSKA, B. (2008). Molecular basis of parthenolide-dependent proapoptotic activity in cancer cells, *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 46(2), 129-135. doi:10.2478/v10042-008-0019-2
- PATTIES, I., KORTMANN, R., & GLASOW, A. (2013). Inhibitory effects of epigenetic modulators and differentiation inducers on human medulloblastoma cell lines. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 32(27). doi:10.1186/1756-9966-32-27
- PHANG, P. T. (2004). Total mesorectal excision: technical aspects. *Canadian Journal of Surgery*, 47(2), 130-137.
- QIU, H. [et al.] (2000). Molecular prognostic factors in rectal cancer treated by radiation and surgery. *Diseases of the Colon and Rectum*, 43(4), 451-459.
- Radiotherapy Research. Cancer Research UK (acedido em abril 2015, <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancers-in-general/treatment/radiotherapy/radiotherapy-research>)
- RAVIRAJ, J. [et al.] (2014). Radiosensitizers, radioprotectors, and radiation mitigators. *Indian Journal of Dental Research*, 25(1), 83-90. doi:10.4103/0970-9290.131142
- REYA, T. [et al.] (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414, 105-111.
- RICE, G. C. [et al.] (1986). Quantitative Analysis of Cellular Glutathione by Flow Cytometry Utilizing Monochlorobimane: Some Applications to Radiation and Drug Resistance *In Vitro* and *In Vivo*. *Cancer Research*, 46, 6105-6110.
- RÖDEL, C. [et al.] (2005). Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(34), 8688-8696. doi:10.1200/JCO.2005.02.1329

- RONINSON, I. B., BROUDE, E. V., & CHANG, B. D. (2001). If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resistance Updates*, 4(5), 303-13.
- ROSIGNOLI, P. [et al.] (2001). Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis*, 22(10), 1675-1680. doi:10.1093/carcin/22.10.1675
- RYCAJ, K., & TANG, D. G. (2014). Cancer stem cells and radioresistance. *International Journal of Radiation Biology*, 90(8), 615-621. doi:10.3109/09553002.2014.892227
- SAEMANN, M. D., BÖHMIG, G. A., & ZLABINGER, G. J. (2002). Short-chain fatty acids: bacterial mediators of a balanced host-microbial relationship in the human gut. *Wien Klin Wochenschr*, 114(8-9), 289-300.
- SALVIOLI, S. [et al.] (1997). Jc-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent prob to assess  $\Delta \Psi$  changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Letters*, 411(1), 77-82. doi:10.1016/S0014-5793(97)00669-8
- SANT, M. [et al.] (2009). EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *European Journal of Cancer*, 45(6), 931-991. doi:10.1016/j.ejca.2008.11.018
- SAURA-CALIXTO, F. (2011). Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: An essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 43-49. doi:10.1021/jf1036596
- SEELEY, R. R. *Anatomy and Physiology (McGraw-Hill Education, 1997)*
- SENGUPTA, S., MUIR, J. G., & GIBSON, P. R. (2006). Does butyrate protect from colorectal cancer? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21(1 PART2), 209-218. doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04213.x
- SHABASON, J. E. [et al.] (2011). Grand rounds at the National Institutes of Health: HDAC inhibitors as radiation modifiers, from bench to clinic. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(12), 2735-2744. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01296.x

- SHITIKOVA, Z. [et al.] (2011). Cell senescence induced by histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in rodent transformed cells resistant to apoptosis. *Tsitologiya*, 53(3), 277-284.
- SKVORTSOVA, I. [et al.] (2008). Intracellular signaling pathways regulating radioresistance of human prostate carcinoma cells. *Proteomics*, 8, 4521-4533.
- SLUYSER, M. Application of Apoptosis to Cancer Treatment (*Springer Netherlands*, 2005).
- SMITH, D. [et al.] (2006). Symptomatic presentation of early colorectal cancer. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 88(2), 185-190. doi:10.1308/003588406X94904
- SMITH, F. M. [et al.] (2006). Pathological and molecular predictors of the response of rectal cancer to neoadjuvant radiochemotherapy. *European Journal of Surgical Oncology*, 32(1), 55-64. doi:10.1016/j.ejso.2005.09.010
- SMITH, L. [et al.] (2009). Proteomic identification of putative biomarkers of radiotherapy resistance: a possible role for the 26S proteasome? *Neoplasia*, 11(11), 1194-1207. doi:10.1593/neo.09902
- SOSA, V. [et al.] (2013). Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 376-390. doi:10.1016/j.arr.2012.10.004
- SPIEGEL, S., MILSTIEN, S., & GRANT, S. (2013). Endogenous Modulators and Pharmacological Inhibitors of Histone Deacetylases in Cancer Therapy. *Oncogene*, 31(5), 537-551. doi:10.1038/onc.2011.267
- SPITZNER, M. [et al.] (2010). A gene expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 78(4), 1184-1192. doi:10.1016/j.ijrobp.2010.06.023
- STEPHENS, R. J. [et al.] (2010). Impact of short-course preoperative radiotherapy for rectal cancer on patients' quality of life: data from the Medical Research Council CR07/National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group C016 randomized clinical trial. *Journal of Clinical Oncology*, 28(27), 4233-4239. doi:10.1200/JCO.2009.26.5264
- SUROVA, O., & ZHIVOTOVSKY, B. (2013). Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene*, 32, 3789-3797.

- SWARTS, S. G. [et al.] (2007). Mechanisms of Direct Radiation Damage in DNA, Based on a Study of the Yields of Base Damage, Deoxyribose Damage, and Trapped Radicals in d(GCACGCGTGC)<sub>2</sub>. *Radiation Research*, 168(3), 367-381. doi:10.1667/RR1058.1
- TABARESTANI, S., & GHAFOURI-FARD, S. (2012). Cancer Stem Cells and Response to Therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(12), 5947-5954.
- TAIT, S. W. G., & GREEN, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature*, 11(9), 621-632. doi:10.1038/nrm2952
- TARPEY, M. M., WINK, D. A., & GRISHAM, M. B. (2004). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen : *in vitro* and *in vivo* considerations. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286, R431-R-444.
- TEOH, M. [et al.] (2011). Volumetric modulated arc therapy: a review of current literature and clinical use in practice. *The British Journal of Radiology*, 84(1007), 967-996. doi:10.1259/bjr/22373346
- THANGARAJU, M. [et al.] (2009). GPR109A Is a G-protein-Coupled Receptor for the Bacterial Fermentation Product Butyrate and Functions as a Tumor Suppressor in Colon, *Cancer Research*, 69(7), 2826-2833. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4466
- TOPPING, D. L., & CLIFTON, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*, 81(3), 1031-1064.
- TORRE, L. A. [et al.] (2015). Global Cancer Statistics, 2012, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 00(00), 1-22. doi:10.3322/caac.21262
- VALKO, M. [et al.] (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
- VAN CUTSEM, E. [et al.] (2010). Molecular markers and biological targeted therapies in metastatic colorectal cancer: expert opinion and recommendations derived from the 11th ESMO/World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2009. *Annals of Oncology*, 21(Supplement 6), 1-10. doi:10.1093/annonc/mdq273

- VAUPEL, P., & Mayer, A. (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(2), 225-239. doi:10.1007/s10555-007-9055-1
- VELÁSQUEZ, O. C., LEDERER H. M., & ROMBEAU J. L. (1997). Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 427, 123-134.
- VERMEULEN, K. [et al.] (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36, 131-149.
- VOGTMANN, E. [et al.] (2013). Fruit and vegetable intake and the risk of colorectal cancer: Results from the Shanghai Men's Health Study. *Cancer Causes Control*, 24(11), 1935-1945. doi:10.1007/s10552-013-0268-z
- WAGNER, O. I. [et al.] (2003). Mechanisms of Mitochondria – Neurofilament Interactions. *Journal of Neuroscience*, 23(27), 9046-9058.
- WAGNER, J. M. [et al.] (2010). Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in recent clinical trials for cancer therapy. *Clinical Epigenetics*, 1(3-4), 117-136. doi:10.1007/s13148-010-0012-4
- WEITZ, J. [et al.] (2005). Colorectal Cancer. *Lancet*, 365(9454), 153-165. doi:10.1016/S0140-6736(05)17706-X
- XU, W. S., PARMIGIANI, R. B., & MARKS, P. A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, 26(37), 5541-5552. doi:10.1038/sj.onc.1210620
- YE, C. [et al.] (2013). Radiation-induced cellular senescence results from a slippage of long-term G2 arrested cells into G1 phase. *Cell Cycle*, 12(9), 1424-1432.
- ZUCH, D. [et al.] (2012). Targeting Radioresistant Osteosarcoma Cells with Parthenolide. *Cell Biochemistry*, 113(4), 1282-1291.

