



Universidade da Beira Interior

Faculdade de Ciências da Saúde

Vitamina C, cancro e citotoxicidade selectiva

Estudos biológicos

Mestrado em Ciências Biomédicas

Ana Catarina Manjolinha Mamede

Junho de 2010



Universidade da Beira Interior

Faculdade de Ciências da Saúde

Vitamina C, cancro e citotoxicidade selectiva

Estudos biológicos

Vitamin C, cancer and selective cytotoxicity

Biological studies

Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho (Universidade de Coimbra), Professor Doutor Jorge Manuel Maia Pereira (Universidade da Beira Interior) e Mestre Ana Margarida Coelho Abrantes (Universidade de Coimbra).

Projecto elaborado no

IBILI (Instituto Biomédico de Investigação da Luz e Imagem)

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

O conteúdo do presente trabalho é da exclusiva responsabilidade da autora

Ana Catarina Manjolinha Mamede

Agradecimentos

Este trabalho representa o culminar de um objectivo a que me propus e que não seria possível sem a ajuda de um número considerável de pessoas às quais devo o meu agradecimento. Assim, nesta página espero encontrar as palavras certas para poder agradecer a todas as pessoas que me aconselharam, motivaram e orientaram ao longo deste último ano lectivo. Para além destas palavras escritas, espero encontrar melhor forma e melhor momento para dizer a todos o quanto estou agradecida e o quanto sinto que a todos devo um bocadinho deste trabalho.

À Professora Doutora Filomena Botelho, directora do Instituto de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço por me ter recebido no seio do seu grupo de investigação e me ter permitido aprender com a sua equipa. A alegria, dedicação, empenho e profissionalismo que coloca no seu trabalho é uma referência para todos os seus colaboradores. Obrigado pelo apoio, disponibilidade e partilha do conhecimento e experiência científica. Agradeço ainda a análise rigorosa de cada capítulo, as sugestões, os esclarecimentos e os comentários sempre oportunos que espero ter sabido aproveitar.

Ao Professor Doutor Jorge Maia, professor auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade da Beira Interior, agradeço por ter acreditado neste projecto desde o início. O seu apoio, amizade e profissionalismo têm sido fundamentais na minha vida académica. Obrigado por toda a dedicação, disponibilidade e pela análise crítica deste trabalho.

À Mestre Margarida Abrantes agradeço o seu exemplo de trabalho e dedicação. Durante este último ano ensinou-me tudo o que hoje sei e permitiu que eu me integrasse em todos os projectos a decorrer no Instituto de Biofísica e Biomatemática. A alegria contagiante com que gere o trabalho laboratorial torna cada experiência nova mais aliciante e mais emocionante, fazendo de mim uma melhor profissional e melhor pessoa. Obrigado pelos ensinamentos, disponibilidade, paciência, apoio e confiança.

À Sónia Tavares, minha colega nesta aventura, agradeço por todas as horas que passámos juntas este ano. Ao longo dos últimos meses foi no seu braço que me apoiei em dias menos bons à espera das suas palavras sempre animadoras e que agarrei quando cantávamos após uma nova descoberta ou simplesmente um bom resultado laboratorial. Sem ti, as horas durante este ano teriam sido mais longas. Obrigado pela amizade, apoio e cooperação.

Ao grupo de meninas com quem tive o prazer de trabalhar este ano e que tornaram cada dia deste último ano lectivo uma alegria: Ritinha, Susana, Mónica e Joana. A todos os estagiários de Medicina Nuclear da Escola Superior de Tecnologias de Saúde do Porto pelo seu interesse no meu trabalho e pela ajuda nas mais variadas tarefas. À Mafalda Laranjo, Ana Brito, Ana Marau e João Casalta pela amizade e cooperação, à Cristina Gonçalves pelo auxílio prestado na realização e na interpretação dos estudos de citometria de fluxo e à Professora Bárbara Oliveira pela disponibilidade para me apoiar na análise estatística dos dados. À Cláudia Caridade pelo sorriso sempre pronto e pela disponibilidade que apresenta diariamente para resolver todos os problemas que surgem no Instituto de Biofísica e Biomatemática e a todos os restantes elementos do serviço que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos de curso Margarida, Cátia, Micaela, Xana e Luís pela amizade. Mesmo longe, apoiaram-me e estiveram sempre disponíveis para mim, tornando a sua ausência menos dura.

Ao Puka pela amizade, amor e paciência em dias menos bons.

Aos meus pais, irmã e avó pela certeza do seu amor, amizade e carinho. Sou um pouco de vós e a vós vos devo tudo. Obrigado pelos conselhos sempre sábios e pela compreensão inesgotável.

As Deus, que certamente tem orientado todos os meus passos e me guiou até todas estas pessoas e a muitas outras que, não tendo sido mencionadas, não foram esquecidas.

A todos o meu “MUITO OBRIGADO”

Resumo

A vitamina C é um nutriente essencial ao metabolismo das células vivas que existe sob duas formas: a forma reduzida (ácido ascórbico - AA) e a forma oxidada (ácido dehidroascórbico – DHA). A vitamina C é um nutriente cujos benefícios são desde há muito tempo conhecidos e amplamente divulgados, sendo que a sua maioria se devem à acção antioxidante desta vitamina. Como antioxidante, o principal papel da vitamina C é neutralizar os radicais livres doando-lhes os seus electrões, reflectindo a sua capacidade redutora e a habilidade para diminuir o stresse oxidativo. No entanto, alguns estudos controversos sugerem que este nutriente possa ter um papel preventivo e terapêutico na doença oncológica devido à sua eventual actividade pró-oxidante, promovendo a formação de espécies reactivas de oxigénio que podem induzir a morte celular nas células cancerígenas. Este factor, aliado à diminuição das enzimas antioxidantes e ao aumento de metais de transição descompartimentalizados nas células tumorais poderá resultar na citotoxicidade selectiva da vitamina C e na consequente revelação do seu potencial terapêutico.

O objectivo deste trabalho é estudar o metabolismo e os mecanismos de acção da forma reduzida da vitamina C e mostrar o seu efeito citotóxico em duas linhas celulares tumorais: adenocarcinoma colorectal (WiDr) e melanoma melanocítico (A-375). Para tal, usaram-se técnicas de imagiologia nuclear e de biologia celular e molecular. Primeiramente, efectuou-se a marcação da forma reduzida da vitamina C com tecnécio-99m, de forma a obter um complexo radioactivo ($^{99m}\text{Tc-AA}$) passível de ser usado em imagiologia nuclear. Posteriormente, nos estudos *in vitro*, procedeu-se à realização de estudos de captação de $^{99m}\text{Tc-AA}$ e de pertecnetato de sódio nas duas linhas celulares estudadas, assim como à avaliação da citotoxicidade da vitamina através da avaliação da proliferação celular por espectrofotometria, ensaios clonogénicos e citometria de fluxo. Foram também feitos estudos *in vivo* com ratinhos Balb/c e Balb/c nu/nu com o intuito de comprovar os resultados obtidos no controlo de qualidade do $^{99m}\text{Tc-AA}$ e obter informação sobre a biodistribuição e vias de excreção e metabolização da formulação produzida. Por último, os ratinhos com xenotransplantes foram submetidos a uma terapia com AA e os tumores excisados foram analisados por citometria de fluxo. Os resultados obtidos sugerem que a forma reduzida da vitamina C induz um efeito anti-proliferativo e/ou citotóxico nas células em estudo, podendo eventualmente vir a constituir uma nova abordagem terapêutica no tratamento do cancro colorectal.

Palavras-chave: vitamina C, ácido ascórbico, espécies reactivas de oxigénio, cancro, citotoxicidade selectiva, radiofármaco, biodistribuição

Abstract

Vitamin C is an essential nutrient to the metabolism of living cells which exist in two forms: the reduced form (ascorbic acid - AA) and oxidized form (dehydroascorbic acid - DHA). Vitamin C is a nutrient whose benefits are long known and widely publicized, being most of them related to the antioxidant action of this vitamin. As an antioxidant, the main role of vitamin C is neutralize free radicals by donating their electrons to them, reflecting their reduction capacity and the ability to reduce oxidative stress. However, some controversial studies suggest that this nutrient may have a preventive and therapeutic role in cancer disease due to their possible pro-oxidant activity, promoting the formation of reactive oxygen species that can induce cell death in cancer cells. This factor, coupled with the decrease of antioxidant enzymes and increased transition metal compartmentalized in tumor cells may result in the selective cytotoxicity of vitamin C and the subsequent revelation of its therapeutic potential.

The aim of this work is to study the metabolism and mechanisms of action of the reduced form of vitamin C and show their cytotoxic effect in two tumor cell lines: colorectal adenocarcinoma (WiDr) and melanocytic melanoma (A-375). To this end, we used nuclear imaging and molecular and cell biology techniques. First, we marked the reduced form of vitamin C with technetium-99m, in order to obtain a radioactive complex ($^{99m}\text{Tc-AA}$) that can be used in nuclear imaging. Subsequently, in *in vitro* studies, we performed the studies of uptake of $^{99m}\text{Tc-AA}$ and sodium pertechnetate in both cell lines studied, as well as evaluated the cytotoxicity of vitamin through the evaluation of cell proliferation by spectrophotometry, clonogenic assays and flow cytometry. Also had been made *in vivo* studies with Balb/c and Balb/c nu/nu mice in order to verify the results obtained in the quality control of $^{99m}\text{Tc-AA}$ and obtain information about the biodistribution and pathways of excretion and metabolism of the formulation produced. Finally, mice with xenografts were subjected to treatment with AA and excised tumors were analyzed by flow cytometry. The results suggest that the reduced form of vitamin C induces an anti-proliferative and/or cytotoxic effect in cells under study and may eventually be a new therapeutic approach in the treatment of colorectal cancer.

Keywords: vitamin C, ascorbic acid, reactive oxygen species, cancer, selective cytotoxicity, radiopharmaceutical, biodistribution

Lista de abreviaturas

- ♦ 1-(4-Chloromercuriophenylazo)-2-naphthol – alaranjado de mercúrio
- ♦ 2'-7'-diclorofluoresceína – DCF
- ♦ 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína – DCFH
- ♦ 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato – DCFH₂-DA
- ♦ 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)2,5-diphenyltetrazolium bromide - MTT
- ♦ 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine – JC-1
- ♦ Ácido ascórbico – AA
- ♦ Ácido dehidroascórbico – DHA
- ♦ Ácido desoxirribonucleico – ADN
- ♦ Adenosina difosfato – ADP
- ♦ Adenosina trifosfato – ATP
- ♦ Altura equivalente do prato teórico – HETP
- ♦ American Type Culture Collection – ATCC
- ♦ Anexina V – AV
- ♦ Catalase – CAT
- ♦ Contagens por minuto – CPM
- ♦ Contagens por segundo – CPS
- ♦ Cromatografia líquida de alta precisão – HPLC
- ♦ Dihidroetídio – DHE
- ♦ Dimetilsulfóxido – DMSO
- ♦ Dinucleótido de flavina adenina – FADH₂
- ♦ Dinucleótido de nicotinamida-adenina – NADH
- ♦ Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM
- ♦ Espécies reactivas de nitrogénio – RNS
- ♦ Espécies reactivas de oxigénio – ROS
- ♦ Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína – FITC
- ♦ Forward scatter – FCS
- ♦ Fosfato de dinucleótido de nicotinamida-adenina – NADPH
- ♦ Fosfato inorgânico – Pi
- ♦ Glutatião reduzido – GSH
- ♦ Glutathiona peroxidase – GPx
- ♦ Gulonolactona oxidase – GULO

- ♦ Intravenosa – i.v.
- ♦ Iodeto de propídeo – IP
- ♦ Média das intensidades de fluorescência – MIF
- ♦ Milivolt - mV
- ♦ Mononucleótido de flavina – FMN
- ♦ Radioimunoensaio - RIA
- ♦ Regiões de interesse – ROIs
- ♦ Rotações por minuto – rpm
- ♦ Side scatter – SSC
- ♦ Statistical Package for Social Sciences – SPSS
- ♦ Superóxido dismutase – SOD
- ♦ Tampão fosfato - PBS
- ♦ Transportadores de glicose - GLUT
- ♦ Transportadores de vitamina C dependentes de sódio – SVCT
- ♦ Ultravioleta – UV

Lista de figuras

- ♦ **Figura 1.1** – Metabolismo oxidativo do ácido ascórbico (pp. 2)
- ♦ **Figura 1.2** – Mecanismo de transporte indirecto da vitamina C (pp. 5)
- ♦ **Figura 1.3.** – Mecanismo de transporte directo da vitamina C (pp. 6)
- ♦ **Figura 1.4.** – Cadeia transportadora de electrões (pp. 9)
- ♦ **Figura 1.5.** – Efeitos da exposição da célula às espécies reactivas de oxigénio (pp. 13)
- ♦ **Figura 2.1.** – Representação esquemática de uma cromatografia líquida de alta precisão (pp. 23)
- ♦ **Figura 2.2.** – Detecção de peróxidos intracelulares (pp. 32)
- ♦ **Figura 2.3.** – Detecção do radical superóxido intracelular (pp. 33)
- ♦ **Figura 3.1.** – Cromatogramas das amostras padrão (pp.40)
- ♦ **Figura 3.2.** – Cromatogramas de uma formulação com uma baixa eficiência de marcação de 75% (pp. 41)
- ♦ **Figura 3.3.** – Cromatogramas de uma formulação com uma elevada eficiência de marcação de 99% (pp.42)
- ♦ **Figura 3.4.** – Curva analítica do sistema de HPLC (pp. 44)
- ♦ **Figura 3.5.** – Captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ e do tecnécio livre pelas WiDr ao longo do tempo (pp.45)
- ♦ **Figura 3.6.** – Captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ e do tecnécio livre pelas A-375 ao longo do tempo (pp.45)
- ♦ **Figura 3.7.** – Captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ ao longo do tempo em duas linhas celulares distintas (pp.46)

- ♦ **Figura 3.8.** – Curva de dose-resposta das WiDr e das A-375 após exposição durante 1 e 4 horas ao AA (pp.47)
- ♦ **Figura 3.9.** – Ensaio clonogénico (pp.48)
- ♦ **Figura 3.10.** – Visualização das colónias celulares após a realização dos ensaios clonogénicos (pp. 48)
- ♦ **Figura 3.11.** – Dot-plot representativo da marcação com anexina-V e iodeto de propídeo (pp.49)
- ♦ **Figura 3.12.** – Viabilidade celular por citometria de fluxo recorrendo a dupla marcação com anexina-V e iodeto de propídeo (pp.50)
- ♦ **Figura 3.13.** – Histogramas de expressão com DCFH₂-DA (pp. 51)
- ♦ **Figura 3.14.** – Produção de peróxidos por citometria de fluxo recorrendo a marcação DCFH₂-DA (pp.51)
- ♦ **Figura 3.15.** – Histogramas de expressão da marcação com DHE (pp. 52)
- ♦ **Figura 3.16.** – Produção de radical superóxido por citometria de fluxo recorrendo a marcação com DHE (pp. 52)
- ♦ **Figura 3.17.** – Histograma de expressão da marcação com alaranjado de mercúrio (pp. 52)
- ♦ **Figura 3.18.** – Expressão intracelular de glutatião reduzido por citometria de fluxo recorrendo a marcação com alaranjado de mercúrio (pp.53)
- ♦ **Figura 3.19.** – Análise do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo recorrendo a sonda fluorescente JC-1 (pp.54)
- ♦ **Figura 3.20.** – Análise da expressão membranar do GLUT1 por citometria de fluxo (pp. 54)
- ♦ **Figura 3.21.** – Análise da expressão membranar do GLUT3 por citometria de fluxo (pp. 54)
- ♦ **Figura 3.22.** – Biodistribuição em animais Balb/c (normais) (pp. 55)

- ♦ **Figura 3.23.** – Biodistribuição em animais Balb/c nu/nu com xenotransplantes (pp. 57)
- ♦ **Figura 3.24.** – Percentagem da dose injectada por grama de tecido tumoral (pp. 57)
- ♦ **Figura 3.25.** – Razão entre as captações tumor/osso e tumor/sangue (pp. 58)
- ♦ **Figura 3.26.** – Imagiologia do $^{99m}\text{Tc-AA}$ (pp. 58)
- ♦ **Figura 3.27.** – Evolução do crescimento tumoral ao longo de doze dias de terapia com AA (pp. 59)

Lista de tabelas

- ♦ **Tabela 2.1.** – Tempo de incubação com a vitamina C e posterior tempo de repouso das células (pp. 29)
- ♦ **Tabela 2.2.** – Padrões de marcação com anexina-V e iodeto de propídeo para os diferentes grupos de células (pp. 31)
- ♦ **Tabela 3.1.** – Tempos de retenção das amostras padrão e do radiofármaco (pp. 41)
- ♦ **Tabela 3.2.** – Eficiência de marcação e pH do $^{99m}\text{Tc-AA}$ ao longo de seis horas (pp. 42)
- ♦ **Tabela 3.3.** – Comparação da biodistribuição aos 30 minutos em ratinhos Balb/c e Balb/c nu/nu (pp.56)
- ♦ **Tabela 3.4.** – Percentagem de células vivas, em apoptose e em necrose (pp. 60)

Índice

1. Capítulo I – Introdução	1
1.1. A vitamina C	2
1.1.1. Síntese e metabolismo	3
1.1.1.1. Absorção, armazenamento e excreção	3
1.1.1.2. Transporte	3
1.1.1.2.1. Transporte indirecto	4
1.1.1.2.2. Transporte directo	5
1.1.2. Funções	6
1.2. A vitamina C e o cancro	7
1.2.1. Stress oxidativo: vital ou fatal?	8
1.2.1.1. A mitocôndria	8
1.2.1.2. As espécies reactivas de oxigénio e as defesas antioxidantes enzimáticas	11
1.2.1.3. O papel do stress oxidativo no organismo humano	12
1.2.1.4. O stress oxidativo e o cancro	14
1.2.2. O efeito antioxidante, pró-oxidante e a citotoxicidade selectiva da vitamina C	15
1.2.3. Vias de administração da vitamina C	17
2. Capítulo II - Materiais e métodos	19
2.1. Estudos de química	20
2.1.1. Marcação radioactiva da vitamina C	20
2.1.2. Controlo de qualidade	21
2.2. Estudos in vitro	26
2.2.1. Culturas celulares	26
2.2.2. Estudos de captação	26
2.2.3. Determinação da viabilidade celular	27
2.2.4. Determinação da proliferação e sobrevivência celular	28
2.2.4.1. Avaliação da proliferação celular por espectrofotometria	28
2.2.4.2. Avaliação da sobrevivência celular através de ensaios clonogénicos	29
2.2.5. Citometria de fluxo	30
2.2.5.1. Avaliação da morte celular	31
2.2.5.2. Avaliação da produção intracelular de peróxidos	32

2.2.5.3. Avaliação da produção intracelular de radical superóxido	33
2.2.5.4. Avaliação da expressão intracelular do glutatião reduzido	33
2.2.5.5. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	34
2.2.5.6. Avaliação da expressão membranar dos transportadores de glicose	34
2.3. Estudos in vivo	35
2.3.1. Biodistribuição em animais normais	35
2.3.2. Biodistribuição em animais com xenotransplantes	36
2.3.3. Imagiologia	36
2.3.4. Terapia	37
2.4. Estudos ex vivo	37
2.4.1. Isolamento das células tumorais	37
2.4.2. Citometria de fluxo	38
2.5. Análise estatística	38
3. Capítulo III – Resultados	39
3.1. Estudos de química	40
3.1.1. Marcação radioactiva da vitamina C	40
3.1.2. Controlo de qualidade	40
3.2. Estudos in vitro	44
3.2.1. Estudos de captação e determinação da viabilidade celular.....	44
3.2.2. Determinação da proliferação e sobrevivência celular.....	46
3.2.2.1. Avaliação da proliferação celular por espectrofotometria.....	46
3.2.2.2. Avaliação da sobrevivência celular através de ensaios clonogénicos.....	47
3.2.3. Citometria de fluxo.....	49
3.2.3.1. Avaliação da morte celular.....	49
3.2.3.2. Avaliação da produção intracelular de peróxidos.....	50
3.2.3.3. Avaliação da produção intracelular de radical superóxido.....	51
3.2.3.4. Avaliação da expressão intracelular de glutatião reduzido.....	52
3.2.3.5. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	53
3.2.3.6. Avaliação da expressão membranar dos GLUT.....	54
3.3. Estudos in vivo	55
3.3.1. Biodistribuição em animais normais.....	55
3.3.2. Biodistribuição em animais com xenotransplantes.....	56
3.3.3. Imagiologia.....	58
3.3.4. Terapia.....	59
3.4. Estudos ex vivo.....	60

3.4.1. Citometria de fluxo.....	60
3.4.1.1.Avaliação da morte celular.....	60
4. Capítulo IV - Discussão	61
Conclusão e perspectivas futuras	72
Referências bibliográficas	76

Capítulo I

Introdução

1.1. A vitamina C

As vitaminas são compostos orgânicos essenciais ao normal funcionamento do corpo humano, sendo a vitamina C uma das mais populares devido aos seus efeitos benéficos largamente conhecidos. A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel que possui duas formas: a forma reduzida (ácido ascórbico – AA) e a forma oxidada (ácido dehidroascórbico – DHA). O AA, a forma predominante da vitamina C a pH fisiológico, foi isolado em 1928 pelo bioquímico húngaro Szent-Gyorgyi. Este ácido fraco instável e facilmente oxidável é uma lactona de peso molecular 176.13g/mol e fórmula química $C_6H_8O_6$. No seu estado natural, o AA tem a forma de cristal ou pó e pode apresentar uma tonalidade entre o branco e o amarelo. O DHA ($C_6H_6O_6$) resulta da oxidação do AA por uma reductase, tem um peso molecular de 174.11g/mol e é mais reactivo e instável em solução do que a forma reduzida da vitamina C, dependendo a sua estabilidade de factores como a concentração, temperatura e pH do meio. As duas formas da vitamina C podem ser encontradas em vários frutos, principalmente nos pertencentes à família dos citrinos, e em vários vegetais verdes foliformes, tendo também o peixe e o leite pequenas quantidades desta vitamina. A reacção de oxidação do AA é um processo de duas fases em que se libertam dois átomos de hidrogénio que podem ser usados na redução de compostos biologicamente significativos: (1) o AA doa um electrão e dá origem ao radical ascorbil, uma molécula relativamente estável com uma semi-vida de 10^{-5} segundos; (2) por sua vez, o radical ascorbil perde um electrão e forma o DHA (figura 1.1.). Uma vez formados, o radical ascorbil e o DHA podem ser novamente reduzidos a AA pelo menos por três vias enzimáticas separadas, assim como por compostos redutores presentes nos sistemas biológicos. O DHA pode também sofrer uma hidrólise e dar origem ao ácido dicetogulónico, um composto formado pela ruptura irreversível da estrutura do anel de lactona que faz parte do AA, do radical ascorbil e do DHA. De notar que as estruturas moleculares do AA e do DHA são semelhantes à da glicose ($C_6H_{12}O_6$) devido a existência de vários grupos hidroxilo próximos uns dos outros (Deutsch, 2000; Iqbal et al., 2004; Padayatty et al., 2003).

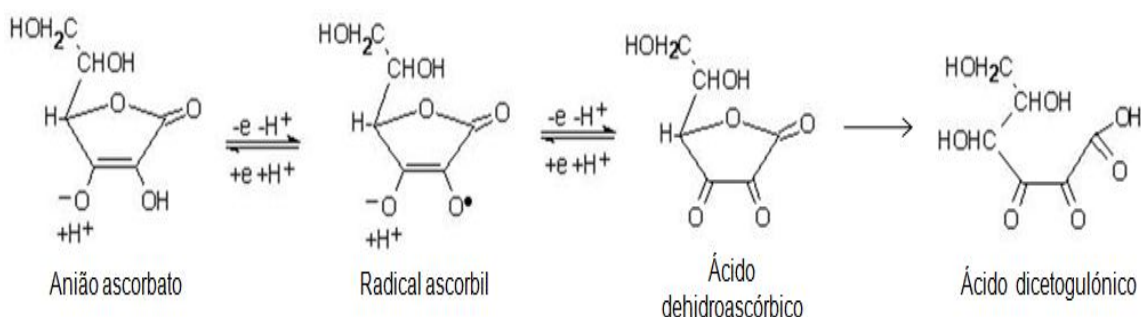


Figura 1.1. – Metabolismo oxidativo do ácido ascórbico. O ácido ascórbico dá origem ao radical ascorbil que, por sua vez, origina o ácido dehidroascórbico. Este composto pode ser reduzido novamente a ácido ascórbico ou pode sofrer uma hidrólise, dando origem ao ácido dicetogulónico (adaptado de <http://www.bioscience.org>)

1.1.1. Síntese e metabolismo

A vitamina C é sintetizada na via do ácido hexurónico presente no fígado e no rim devido à actividade de uma enzima particular: a gulonolactona oxidase (GULO). O Homem, assim como outros primatas, os ratinhos da Índia e algumas espécies de morcegos, pássaros e peixes, sofreram ao longo dos anos severas mutações no gene codificador desta enzima, com perda da capacidade de síntese da vitamina C. Por este motivo, os humanos apenas obtêm a vitamina C através de fontes exógenas (Padayatty et al., 2003; Rumsey e Levine, 1998).

1.1.1.1. Absorção, armazenamento e excreção

A absorção da vitamina C ocorre na mucosa bucal, estômago e intestino delgado, estando inversamente relacionada com a massa administrada. Assim, a administração de 1 a 1.5 g resulta numa taxa de absorção de 50%, enquanto uma taxa de absorção de 98% é atingida com uma administração inferior a 20mg. Após a absorção, a vitamina C é difundida para os capilares circundantes e posteriormente para o sistema circulatório, concentrando-se principalmente na glândula supra-renal e na hipófise. Está também presente em níveis mais baixos nas gónadas, fígado, baço, tiróide, cristalino, pâncreas, rim, glóbulos brancos e músculos esqueléticos. A quantidade total de vitamina C no corpo humano estima-se em 20mg/kg, o que corresponde a uma concentração plasmática de 57 μ M. Por ser um composto hidrossolúvel, a vitamina C é facilmente absorvida mas não é armazenada. Desta forma, a sua hidrossolubilidade determina que a eliminação da vitamina C seja essencialmente renal, não permitindo o seu armazenamento no tecido adiposo. No rim, a vitamina C é filtrada pelos capilares glomerulares para a cápsula de Bowman e, ao passar pelo túbulo contornado proximal, é reabsorvida para os capilares circundantes através das células epiteliais renais. A excreção renal é assim definida como a diferença entre a quantidade de vitamina C filtrada e reabsorvida e determina, juntamente com a absorção intestinal, a concentração intracelular máxima efectiva deste nutriente. De salientar que os rins desempenham um papel de maior relevância tanto na excreção como na retenção da vitamina C, uma vez que regulam a sua concentração tecidular. Assim, se o nível basal for inferior ou igual a 1500mg, o AA e o DHA podem ser reabsorvidos pelos túbulos renais. Neste caso, não ocorrerá excreção urinária da vitamina C. Contudo, para níveis entre 1500 e 3000mg verificar-se-á a saturação dos tecidos e consequente excreção urinária (Iqbal et al., 2004; Padayatty et al., 2003; Rumsey e Levine, 1998).

1.1.1.2. Transporte

O transporte da vitamina C através da membrana celular determina a distribuição da vitamina C entre os fluidos extra e intracelulares e ocorre por difusão simples, difusão facilitada e transporte activo. A difusão simples ocorre ao nível da boca e do estômago mas é considerada pouco relevante, uma vez que a vitamina C é um composto polar com uma massa molecular

relativamente grande e que não pode atravessar com facilidade as membranas por difusão simples. Por este motivo, o transporte da vitamina C através da membrana celular é controlado por mecanismos de transporte específicos que são mediados por distintas classes de proteínas membranares e que incluem a difusão facilitada e o transporte activo. A difusão facilitada é mediada por transportadores de vitamina C dependentes de sódio (SVCT), enquanto o transporte activo é consumado através dos transportadores de glicose (GLUT). De notar que, à medida que a concentração intracelular da vitamina C aumenta a níveis farmacológicos, a taxa de transporte da mesma é atenuada e os níveis fisiológicos normais da vitamina C são restabelecidos. Este facto constitui um obstáculo às estratégias de obtenção de doses elevadas de vitamina C tendo em vista a protecção antioxidante e/ou outro benefício clínico conferido pela mesma (Li e Schellhorn, 2007; Padayatty e Levine, 2001; Wilson, 2005).

1.1.1.2.1. Transporte indirecto

O DHA passa através da membrana celular por um mecanismo de transporte a favor do gradiente, tendo para tal a assistência de transportadores específicos que não parecem ter qualquer afinidade para a forma reduzida e biologicamente activa da vitamina C: os GLUT. Este mecanismo de transporte, denominado por difusão facilitada, tende para uma velocidade máxima constante à medida que se aumenta a concentração de DHA a ser difundido. O mecanismo responsável por limitar a velocidade de difusão prende-se com o facto do DHA se ligar a uma parte específica da proteína transportadora. Desta forma, quando todos os locais de ligação estiverem “ocupados”, não adiantará aumentar a concentração de DHA a ser transportado. Este mecanismo de transporte é usado indirectamente pela célula para transportar o AA para o seu interior através de três passos: 1) oxidação extracelular do AA transformando-o em DHA; 2) transporte do DHA pelo transportador GLUT; 3) redução intracelular do DHA a AA, prevenindo assim o efluxo da forma oxidada (figura 1.2.). Este processo desenrola-se devido ao facto da glicose inibir a captação do AA mas não de DHA, apesar deste último competir com as moléculas de glicose pelos GLUT. Além da inibição pela glicose, os GLUT estão também sujeitos a um controlo hormonal (Li e Schellhorn, 2007; Wilson, 2005). Tendo por base a afinidade do DHA para os GLUT, estudos realizados comprovam que entre as várias isoformas dos GLUT, as isoformas 1 e 3 são as responsáveis pelo influxo de DHA. Outra isoforma, o GLUT4, foi posteriormente descoberta e associada também ao transporte do DHA. O GLUT1 e o GLUT3 estão predominantemente localizados nos osteoblastos, músculos e células da retina, mediando o influxo de DHA nestas células. O GLUT1 é também expresso nas células endoteliais da barreira hematoencefálica e pode ser parcialmente responsável pela acumulação de vitamina C no cérebro. No entanto, este mecanismo pode não ser fisiologicamente relevante, uma vez que a inibição competitiva do transporte de DHA pela glicose reduz o influxo de vitamina C pelo GLUT1 para níveis insignificantes face à acumulação da mesma pelos SVCT (Li e Schellhorn, 2007; Wilson, 2005).

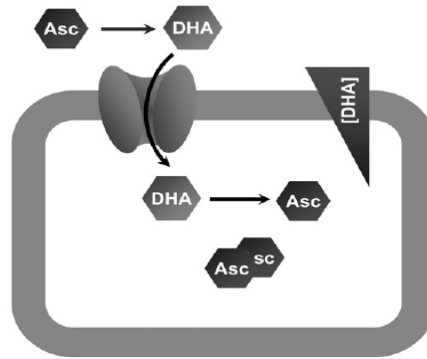


Figura 1.2. – Mecanismo de transporte indirecto da vitamina C. O transporte através dos transportadores de glicose requer a oxidação extracelular do ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico. O ácido dehidroascórbico é importado pelos transportadores de glicose e novamente reduzido a ácido ascórbico no interior da célula, mantendo assim o gradiente de concentração do ácido dehidroascórbico (adaptado de Li e Schellhorn, 2007)

1.1.1.2.2. Transporte directo

O AA é transportado directamente para o interior das células através de um mecanismo de transporte activo mediado pelos SVCT (figura 1.3.). Neste tipo de transporte dá-se a combinação temporária das substâncias a transportar (AA e iões sódio) e de sistemas enzimáticos, denominados por ATPases, sendo o transporte feito com gasto de energia proveniente do metabolismo. Desta forma, os SVCT transportam o AA à custa de um gradiente electroquímico de sódio ao longo da membrana celular e, por este motivo, este transporte é classificado como um transporte activo secundário. Os SVCT têm maior afinidade para o AA do que os GLUT para o DHA e, por este motivo, são considerados os transportadores de vitamina C com maior afinidade. Tal como os GLUT, os SVCT possuem duas isoformas: o SVCT1 e o SVCT2. Uma comparação destas duas isoformas revela que o SVCT2 possui uma maior afinidade mas menor capacidade de transporte para o AA do que o SVCT1. Também a distribuição e funções das duas isoformas de SVCT são distintas, sendo que o SVCT1 está amplamente expresso em vários tecidos epiteliais (intestino, fígado, rim, pulmões, epidídimo e glândula lacrimal), mediando a reabsorção intestinal e renal do AA. Por outro lado, o SVCT2 está presente em células especializadas tais como as células do cérebro, olho e placenta, podendo estar envolvido na manutenção dos níveis intracelulares de vitamina C essenciais para a função neuronal e protecção contra o stresse oxidativo (Li e Schellhorn, 2007; Wilson, 2005).

O co-transporte do AA dependente de sódio pode ser mimeticamente regulado pela alteração das concentrações dos substratos transportados ou pelo potencial de membrana. A expressão do SVCT1 é atenuada por elevadas concentrações de AA *in vitro*. Consequentemente, a sub-regulação do SVCT1 pode limitar a concentração máxima de vitamina C plasmática atingível por ingestão oral. De modo semelhante, o SVCT2 é sensível a alterações dos níveis intracelulares de AA, o que poderá desempenhar um papel regulador na manutenção da homeostase do AA no interior da célula. O fluxo de AA pode também ser controlado por alterações do potencial de

membrana, na medida em que os transportadores SVCT implicam o envolvimento de dois catiões sódio para cada anião AA transportado. As variações do potencial de membrana conduzem à alteração do gradiente electroquímico e, conseqüentemente, da energia livre do sistema de transporte. Mais particularmente, a despolarização da membrana abranda a captação de AA para o interior da célula. Para além dos factores referidos, o transporte do AA pode também ser regulado pelo pH, sendo 7,5 o valor considerado óptimo para que ocorra o transporte através dos SVCT. Na verdade, a acidificação dos meios extracelular e/ou citoplasmático inibe o transporte do AA visto que a potência dos prótons excede aquela que pode ser explicada pela protonação do AA. Assim sendo, os prótons inibem os sistemas de transporte podendo actuar directamente nas proteínas transportadoras, reduzindo assim a afinidade das mesmas para o AA. De notar também que os mecanismos de transporte da vitamina C variam conforme os tipos celulares em questão, sendo que o transporte pode ser alterado consoante a afinidade de ligação do substrato, a capacidade de translocação de cada transportador ou o número de proteínas transportadoras presentes na membrana plasmática (Li e Schellhorn, 2007; Wilson, 2005).

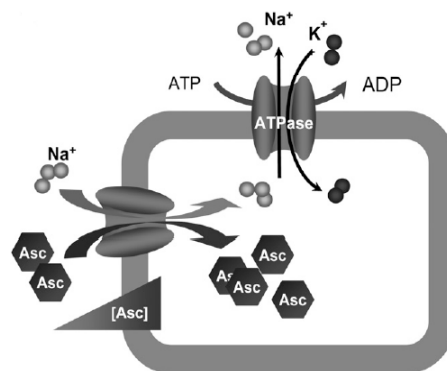


Figura 1.3. – Mecanismo de transporte directo da vitamina C. O ácido ascórbico é acoplado ao sódio e é transportado directamente pelos transportadores de vitamina C dependentes de sódio. O excesso de sódio intracelular é activamente exportado através da troca por potássio extracelular através de uma ATPase de sódio -potássio (adaptado de Li e Schellhorn, 2007)

1.1.2. Funções

A vitamina C é necessária em pequenas concentrações para o cumprimento de várias funções fisiológicas normais. Esta vitamina doa electrões para oito enzimas diferentes, das quais três participam na hidroxilação do colagénio, aumentando assim a estabilidade da estrutura em tripla hélice desta molécula. Outras duas enzimas dependentes da vitamina C são necessárias para a síntese da carnitina, uma molécula essencial para o transporte de ácidos gordos para o interior da mitocôndria para se dar a formação de adenosina trifosfato (ATP). As restantes três enzimas dependentes da vitamina C possuem as seguintes funções: uma participa na biosíntese da dopamina a partir da norepinefrina, outra adiciona grupos amida a hormonas peptídicas e a terceira enzima modula o metabolismo da tirosina (Levine et al., 1999; Padayatty et al., 2003). A vitamina C é também necessária para a conversão do ácido fólico, o metabolismo do triptofano, a

actividade do citocromo P-450 e o metabolismo do colesterol (Block, 1991). Para além de tudo isto, o AA está também envolvido na absorção de ferro e parece ter alguma importância na fertilidade masculina e feminina (Luck et al., 1995).

Muitos artigos da literatura documentam a aplicação desta vitamina a uma grande variedade de doenças. De facto, muitas pessoas acreditam que a vitamina C possa curar infecções respiratórias virais e que possa ser benéfica em várias doenças como a diabetes, cataratas, glaucoma, degeneração macular, arteriosclerose, derrame cerebral, doenças cardiovasculares e cancro. A deficiência de vitamina C resulta no enfraquecimento das estruturas de colagénio, causando a perda de dentes, dores nas articulações, desordens nos ossos e tecidos conjuntivos e pobre cicatrização. Pode também resultar em fadiga, anemia, escorbuto, infecções, degeneração muscular, hemorragias, retenção de fluidos, distúrbios nervosos, letargia, alterações de humor e depressão (Carr e Frei, 1999). Normalmente não existem complicações associadas ao consumo de vitamina C uma vez que esta é um nutriente hidrossolúvel regularmente excretado pelo corpo humano. No entanto, em casos muito raros, a administração de elevadas doses de vitamina C pode levar à hemólise em doentes que sofrem de deficiência da glicose-6-fosfato dehidrogenase. Por outro lado, como o ácido oxálico é o último e o maior metabolito da oxidação do AA, pode ocorrer hiperoxalúria após a administração intravenosa (i.v.) de AA. O AA pode também levar à acidificação da urina, o que pode promover a precipitação de urato, cisteína, oxalato e fármacos no tracto urinário (Iqbal et al., 2004; Verrax e Calderon, 2008).

1.2. A vitamina C e o cancro

Apesar dos esforços feitos pela comunidade científica nas últimas décadas para adquirir novos conhecimentos sobre o cancro e para aliar esta informação a novas técnicas de diagnóstico e tratamento, as taxas de morbilidade e de mortalidade devido à doença oncológica não param de aumentar. Por outro lado, a eficácia das terapias anti-tumorais convencionais, como a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, parece ter atingido um patamar. Por este motivo, é necessário desenvolver novas abordagens que visem a prevenção e o tratamento do cancro. As vitaminas antioxidantes estão no topo das terapêuticas mais promissoras para o cancro, de tal forma que nos últimos anos o seu potencial quimiopreventivo tem sido consideravelmente analisado. A ideia de usar a vitamina C na prevenção e no tratamento do cancro foi primeiramente proposta em 1949 por McCormick. No entanto, e apesar da associação entre a vitamina C e o cancro não ser nova, a sua história é muito controversa. A utilização de vitaminas antioxidantes na doença oncológica surge pois, uma vez que não se pode aumentar propositadamente os antioxidantes endógenos para combater o excesso de stresse oxidativo presente nas células tumorais, a capacidade antioxidante pode ser reforçada através de antioxidantes exógenos obtidos através da dieta. Vários estudos

epidemiológicos e laboratoriais indicaram já que um elevado consumo de vegetais e frutos ricos em antioxidantes poderá diminuir o risco de cancro. Por outro lado, elevadas concentrações de vitaminas antioxidantes podem inibir o crescimento de várias células tumorais, reduzir a toxicidade nas células normais e melhorar o efeito dos agentes terapêuticos. Desta forma, torna-se imperativo estudar os efeitos de elevadas concentrações de vitamina C no desenvolvimento e progressão de tumores e os mecanismos de acção que poderão contribuir para o seu efeito anti-cancerígeno, sendo para tal muito importante entender a relação que existe entre a vitamina C e o stresse oxidativo, característica importante da doença oncológica (Chen et al., 2005; González et al., 2005; Li e Schellhorn, 2007; Padayatty e Levine, 2001).

1.2.1. Stresse oxidativo: vital ou fatal?

O corpo humano é constituído por milhões de células que desempenham as suas funções devido à acção de uma série de reacções químicas muito complexas e altamente reguladas que ocorrem de forma inter-relacionada com o objectivo de manter a homeostase celular. O stresse oxidativo é uma condição bioquímica resultante da acção perturbadora de factores exógenos ou endógenos sobre a homeostase celular e que se caracteriza pelo desequilíbrio entre elevados níveis de espécies reactivas tóxicas e os mecanismos de defesa antioxidantes. A dieta, o tabaco, a medicação e o estilo de vida em geral, assim como a exposição à radiação e aos poluentes, a acção de fármacos anti-cancerígenos e xenobióticos sobre o organismo humano, podem contribuir para o aparecimento da doença oncológica. Por outro lado, o stresse oxidativo pode também ter origem em factores endógenos como o metabolismo celular normal do citocromo P450, a acção dos neutrófilos e macrófagos durante a inflamação, a degradação dos ácidos gordos pelos peroxissomas e a acção das várias oxidases. No entanto, apesar da contribuição de todos estes factores, a cadeia respiratória mitocondrial é o principal processo fisiológico que está na origem do stresse oxidativo (Ames et al., 1993; Ozben, 2007; Valko et al., 2006; Valko et al., 2007).

1.2.1.1. A mitocôndria

A mitocôndria, um importante organelo encontrado no citoplasma da maior parte das células eucarióticas, apresenta uma matriz mitocondrial e duas membranas fosfolipídicas, uma externa lisa e outra interna com vilosidades. A matriz mitocondrial, rodeada pela membrana interna, contém o complexo piruvato dehidrogenase, as enzimas do ciclo do ácido cítrico, a via de oxidação dos ácidos gordos e a via de oxidação dos aminoácidos, razão pela qual a mitocôndria está envolvida numa grande variedade de processos, sendo um dos mais importantes a produção de energia para a célula. As células obtêm a energia necessária para suprir as suas necessidades através de um mecanismo catabólico que se processa na presença de oxigénio (O_2) e que consiste no desdobramento da glicose com o objectivo final de produzir dióxido de carbono (CO_2), água (H_2O) e energia sob a forma de ATP: a respiração celular. Este processo inicia-se no citoplasma e termina

no interior da mitocôndria, local onde se dá a fosforilação oxidativa através da cadeia respiratória mitocondrial. Esta cadeia, presente na membrana interna da mitocôndria, é constituída por uma série de transportadores de electrões arranjados de acordo com os seus potenciais redox e organizados em quatro complexos que possuem grupos prostéticos capazes de aceitar e doar um ou dois electrões (figura 1.4.) (Azevedo, 2005). O complexo I, também conhecido por NADH dehidrogenase, é uma enzima de grandes dimensões através da qual se inicia o transporte de electrões. O dinucleótido de nicotinamida-adenina (NADH) liga-se ao complexo I e doa dois electrões que entram no complexo através de um grupo prostético, o mononucleótido de flavina (FMN). Os electrões são posteriormente transferidos do FMNH₂ através de diversos núcleos de ferro e enxofre até à molécula de ubiquinona que se encontra na membrana, reduzindo-a. Durante este processo, quatro protões são bombeados da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, criando assim um gradiente de protões. De notar que o dinucleótido de flavina adenina (FADH₂) pode também doar electrões à cadeia respiratória mitocondrial e desencadear o processo de respiração celular (Nelson e Cox, 2004; Seeley et al., 2003).

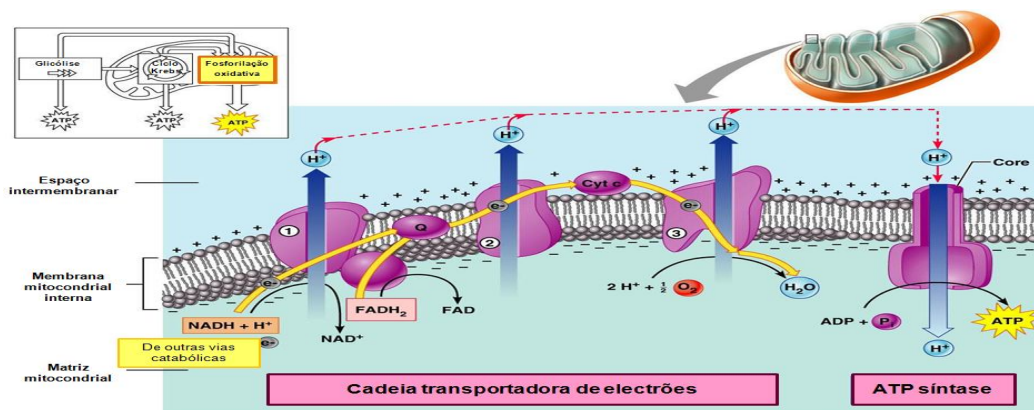


Figura 1.4. - Cadeia transportadora de electrões. O NADH ou FADH₂ transferem os seus electrões para a cadeia transportadora de electrões que, em série, são transferidos através dos quatro complexos da cadeia. No complexo IV, os electrões, os iões hidrogénio e o oxigénio combinam-se para formar água. À medida que os electrões se movem ao longo da cadeia transportadora, alguma da sua energia é utilizada para bombear iões hidrogénio para o compartimento exterior, causando uma concentração de iões hidrogénio mais elevada no compartimento exterior do que no interno. Os iões hidrogénio difundem-se de novo para o compartimento interno através de canais especiais (ATP sintetase), que associam o movimento dos iões hidrogénio à produção de adenosina trifosfato (adaptado de <http://stevebambas.com>)

O complexo II é um segundo ponto de entrada dos electrões na cadeia transportadora. Apesar de mais pequeno e simples do que o complexo I, este complexo contém cinco grupos prostéticos de dois tipos, quatro subunidades proteicas diferentes e participa tanto no ciclo do ácido cítrico como na fosforilação oxidativa. Possui na sua estrutura um local de ligação para a ubiquinona e um grupo heme que não participa na transferência de electrões mas que aparenta ser necessário para diminuir o stress oxidativo. Este complexo oxida o succinato a fumarato e reduz a ubiquinona. Outra forma dos electrões penetrarem na cadeia transportadora é através da

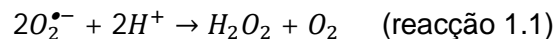
ubiquinona oxiredutase, uma enzima que transfere electrões para a cadeia respiratória ao reduzir a ubiquinona a ubiquinol, funcionando assim como um terceiro ponto de entrada na cadeia de transporte electrónico. No complexo III, conhecido por citocromo reductase, dois electrões são removidos do ubiquinol e são sequencialmente transferidos para dois citocromos c, um transportador electrónico hidrossolúvel localizado no espaço intermembranar. Este citocromo só consegue transportar um electrão de cada vez e, por este motivo, o mecanismo de acção do complexo III é mais complexo do que os restantes, desenrolando-se em dois passos designados por ciclo Q. No primeiro passo, o complexo liga três substratos: o ubiquinol, o citocromo c e a ubiquinona. O ubiquinol sofre oxidação e passa um electrão para o citocromo c e outro para a ubiquinona, que se transforma no radical ubisemiquinona, libertando dois protões para o espaço intermembranar. Posteriormente, os dois primeiros substratos são libertados e a ubisemiquinona permanece ligada. No segundo passo do ciclo Q, uma segunda molécula de ubiquinol liga-se ao complexo e transfere um electrão a outro citocromo c e ao radical ubisemiquinona, reduzindo-o a ubiquinol. Por último, o complexo IV, ou citocromo oxidase, catalisa a reacção final da cadeia transportadora de electrões removendo quatro electrões de quatro citocromos c e transferindo-os para o oxigénio molecular, dando assim origem a duas moléculas de água ao mesmo tempo que bombeia protões através da membrana. A ATP sintetase, considerada por muitos como o complexo V, utiliza a energia armazenada no gradiente de protões que existe na membrana mitocondrial para realizar a síntese de ATP a partir de adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi) (Nelson e Cox, 2004; Seeley et al., 2003).

Apesar da grande afinidade do oxigénio molecular para os electrões, acredita-se que 1 a 2% do oxigénio consumido durante a respiração celular possa ser reduzido e dar origem a compostos oxidantes altamente reactivos, tornando a cadeia respiratória mitocondrial a maior fonte endógena de espécies reactivas. Estes compostos oxidantes são denominados por espécies reactivas de oxigénio (ROS) e podem ser definidos como moléculas orgânicas ou inorgânicas que contêm um ou mais electrões desemparelhados nas suas orbitais e que, por este motivo, tendem a reagir com outras espécies químicas para completar o seu número de electrões de valência. Devido à sua semi-vida muito curta, a acção das ROS a nível celular tem um carácter transitório. As ROS mais importantes são o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidroxilo (HO^{\bullet}) e o oxigénio singleto (1O_2), tendo também os hidroperóxidos lipídicos e as espécies reactivas de nitrogénio (RNS) um importante papel biológico. A relativa contribuição de cada complexo para a produção de radical superóxido varia de órgão para órgão e depende da actividade da mitocôndria. A formação de radicais superóxido pelos transportadores de ferro-enxofre do complexo I parece ser a principal fonte deste anião no cérebro sob condições normais e numa grande variedade de cenários patológicos. Para além disto, o complexo III tem também um importante papel na produção do radical superóxido, uma vez que a oxidação da ubiquinona

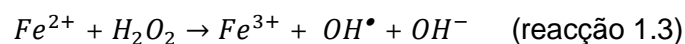
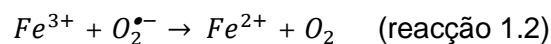
procede uma série de reacções do ciclo Q e a semiquinona instável pode ser uma potencial fonte de espécies reactivas. De notar que, quando o fluxo de electrões diminui, a concentração de oxigénio aumenta e há falta de disponibilidade de ADP, a taxa de formação de radical superóxido aumenta. Esta taxa aumenta também na presença de certos inibidores como a rotenona e a antimicina que inibem o complexo I e III, respectivamente. A monoamida oxidase, uma flavoproteína localizada na membrana mitocondrial externa, é outra importante fonte mitocondrial de ROS, em particular do peróxido de hidrogénio (Cadenas e Davies, 2000; Orrenius et al., 2007; Spector, 2000; Toykuni, 1999; Turrens, 2003).

1.2.1.2. As espécies reactivas de oxigénio e as defesas antioxidantes enzimáticas

O corpo humano desenvolveu vários sistemas que lhe permitem limitar os níveis de oxidantes e o dano que estes infligem no organismo. Um destes sistemas baseia-se no poder antioxidante de várias enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). Por serem antioxidantes, estas enzimas atrasam ou evitam a oxidação de várias moléculas biológicas, prevenindo assim os danos induzidos pelo aumento do stresse oxidativo (Valko et al., 2007). A SOD é uma metaloenzima responsável pela dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogénio (reacção 1.1) e que pode existir segundo diversos tipos de SOD, dependendo do metal que actua como co-factor no seu centro activo: cobre, zinco, manganésio, ferro ou níquel.

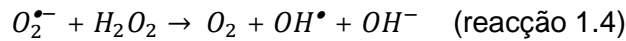


O peróxido de hidrogénio, também resultante da acção da xantina oxidase ou da fosfato de dinucleótido de nicotinamida-adenina (NADPH) oxidase, tem uma grande facilidade de difusão, factor que aumenta a sua capacidade de provocar lesões celulares, e pode dar origem ao radical hidroxilo na presença de metais de transição descompartimentalizados através da reacção de Fenton (reacção 1.3) (Fruehauf e Meyskens, 2007; Orrenius et al., 2007).



O ferro é encontrado em quase todos os seres vivos e cumpre numerosas e variadas funções, sendo essencial para reagir com as ROS. Alguns autores defendem que existe uma pequena fracção de ferro não ligado a proteínas que se move entre os centros de armazenamento e transporte e os centros onde vai ser usado, podendo este ser utilizado para reagir com as ROS. Por outro lado, já foi provado que o ferro é libertado da transferrina a pH ácido, da ferritina, hemoglobina e mioglobina por lesão proteica induzida por peróxidos e da ferritina por redução pelo

radical superóxido. O radical hidroxilo, resultante da reacção de Fenton, possui uma elevada reactividade e uma semi-vida de aproximadamente 10^{-9} segundos, factores que limitam os alvos deste radical a macromoléculas na vizinhança imediata do seu local de formação. Este poderoso radical também pode ter origem na reacção entre o radical superóxido e o peróxido de hidrogénio através da reacção conhecida por reacção de Haber-Weiss (reacção 1.4) (Valko et al., 2006).



A CAT é uma proteína que catalisa a redução do peróxido de hidrogénio a água com libertação de oxigénio e cuja actividade nas células eucarióticas está maioritariamente localizada nos peroxissomas, organelos que produzem abundantemente peróxido de hidrogénio. A GPx é uma enzima que contém selénio no seu centro activo e que, com a CAT, coopera na remoção do peróxido de hidrogénio, reduzindo-o a água, e de hidroperóxidos lipídicos e não lipídicos, reduzindo-os aos respectivos álcoois. O mecanismo de acção desta enzima é muito complexo e actualmente só está parcialmente compreendido (Ribeiro, 2000).

1.2.1.3. O papel do stresse oxidativo no organismo humano

Nas últimas décadas, tornou-se óbvio que o stresse oxidativo desempenha um importante papel na saúde e na doença humana. Em condições normais, o estado redox de uma célula é mantido numa escala apertada, no entanto, pode aumentar de valores baixos para elevados em condições patológicas, determinando assim a alteração do normal funcionamento celular. Na verdade, o stresse oxidativo pode ter efeitos diferentes no organismo dependendo do genótipo celular, do tipo de espécies reactivas envolvidas e da intensidade e duração do stresse oxidativo.

Em baixas/moderadas concentrações, as ROS desempenham um importante papel em muitos processos vitais como a transdução de sinal, a activação de várias cascatas enzimáticas e a actividade bactericida dos fagócitos, podendo também induzir o aumento da proliferação celular (Ozben 2007). Por outro lado, em elevadas concentrações, as ROS podem tornar-se prejudiciais para o organismo humano uma vez que induzem a oxidação de vários componentes celulares como os lípidos, as proteínas e o ácido desoxirribonucleico (ADN). A agressão das ROS aos lípidos presentes nas membranas das células, denominada por peroxidação lipídica, resulta na desintegração membranar e no conseqüente contacto das espécies reactivas com as estruturas intracelulares. Por outro lado, uma vez iniciada a peroxidação lipídica pela subtracção de um átomo de hidrogénio, esta auto-perpetua-se ao longo de toda a membrana, através de uma reacção em ciclo, contribuindo assim para a lesão celular mesmo na ausência da espécie radicalar iniciadora. Deste modo, a membrana fica com a estrutura, a permeabilidade e a microviscosidade alteradas. A agressão das ROS aos lípidos leva também à formação de aldeídos citotóxicos, nomeadamente o malondialdeído e o 4-hidroxinonenal (Gutteridge e Halliwell, 1990; Burdon, 1995; Toyokuni, 1999;

Valko et al., 2007). A oxidação das proteínas pelas ROS pode levar à oxidação dos resíduos de aminoácidos das cadeias laterais, clivagem das ligações peptídicas e consequente cruzamento proteico (intra e intermolecular). A oxidação directa dos aminoácidos, em particular da arginina, prolina e treonina, promove a formação de carbonilos proteicos, estruturas que podem alterar dramaticamente a estrutura terciária da proteína, resultando no seu desenrolamento parcial e no consequente aumento da hidrofobicidade proteica. Tal evento confere uma forte propensão à proteína para formar perigosas interações proteína-proteína, levando à perda das suas funções normais (Orrenius et al., 2007). As lesões induzidas pelas ROS no ADN podem levar a alterações nas purinas e nas pirimidinas e a quebras nas cadeias de ADN, podendo estas ter um efeito mutagénico, citoestático, carcinogénico ou mesmo letal (Valko et al., 2007). De notar que a própria mitocôndria é um alvo sensível ao stresse oxidativo, sendo o ADN mitocondrial especialmente susceptível ao ataque das ROS devido à proximidade com a cadeia respiratória mitocondrial e à falta de histonas protectoras. A disfunção mitocondrial resultante do ataque das ROS pode levar à perda da produção de ATP e do potencial transmembranar através do dano da cadeia respiratória mitocondrial que, por sua vez, pode causar a libertação do citocromo c e activar as vias apoptóticas. Para evitar ou minimizar estes efeitos, a mitocôndria está fortemente aprovionada com defesas contra as espécies reactivas (Orrenius et al., 2007, Ozben, 2007; Ribeiro, 2000). Acredita-se também que, em concentrações muito elevadas, as ROS podem induzir a morte celular por apoptose ou necrose (figura 1.5.). A apoptose é o resultado da activação de um mecanismo genético de suicídio celular e que resulta na morte celular programada dependente de ATP. São características da morte por apoptose a retracção de volume, a formação de protusões na membrana plasmática e a fragmentação nuclear com formação de corpos apoptóticos. Pelo contrário, a necrose é um tipo de morte celular muito mais violenta que ocorre quando a célula é exposta a um estado de stresse extremo. Neste caso, a membrana plasmática é destruída, o conteúdo citoplasmático extravasa para o exterior e apenas o núcleo mantém a sua integridade (Ribeiro, 2000).



Figura 1.5. – Efeitos da exposição da célula às espécies reactivas de oxigénio. Em baixas concentrações, as espécies reactivas de oxigénio podem potenciar a proliferação celular, enquanto elevadas concentrações podem induzir severos danos nas células que a podem levar à morte por apoptose ou necrose.

De facto, o stresse oxidativo tem sido implicado em múltiplos processos fisiológicos que conduzem à instabilidade genética, lesão celular e a diversas alterações nos mecanismos de sinalização celular envolvidos no crescimento, diferenciação e morte celular. Por este motivo, pensa-se que possa estar envolvido na iniciação e promoção do envelhecimento, diabetes tipo II, arteriosclerose, artrite, processos inflamatórios, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, cataratas e cancro (Orrenius et al., 2007; Ozben, 2007; Valko et al., 2006).

1.2.1.4. O stresse oxidativo e o cancro

O corpo humano é formado por células que se dividem, amadurecem e morrem, renovando-se a cada ciclo. Quando existem células que deixam de seguir este processo e a integridade dos tecidos e órgãos é posta em causa, surge o cancro. Esta patologia, actualmente considerada como um problema de saúde pública, tem vindo progressivamente a aumentar a sua taxa de incidência e mortalidade em todo o mundo. Apesar dos métodos de diagnóstico e tratamento terem evoluído bastante nas últimas décadas, a constante aquisição de novos conhecimentos na área da biologia e da carcinogénese é imprescindível para redireccionar as estratégias a usar, tornando-as mais dinâmicas e específicas.

Os genes são responsáveis pelo controlo das funções celulares e, quando modificados, levam a um crescimento descontrolado e/ou à resistência à morte celular, comprometendo todos os sistemas capazes de destruir e limitar as células produzidas anormalmente. O cancro surge devido a uma complexa interacção entre factores genéticos e ambientais que tem início devido à mutação dos genes que regulam o crescimento celular: os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais. Os proto-oncogenes promovem o crescimento celular através da produção de hormonas e são responsáveis pela transdução e recepção de sinais. A mutação destes genes por agentes carcinogénios (químicos, físicos ou biológicos) pode modificar a sua expressão e função, aumentando a actividade da proteína codificada e tornando as células capazes de uma divisão excessiva e descontrolada. Quando tal acontece, os proto-oncogenes são denominados por oncogenes. Para que a carcinogénese efectivamente ocorra, é também necessário que os genes supressores de tumores sejam inactivados. Estes genes participam na regulação da proliferação e da diferenciação celular através dos seus efeitos inibidores (Knudson, 1993; Ribeiro, 2000; Weinberg, 1993). O processo de carcinogénese possui habitualmente três fases: iniciação, promoção e progressão. A iniciação envolve alterações genéticas irreversíveis, usualmente num único gene; a promoção é geralmente associada ao aumento da proliferação das células iniciadas, o que conduz à acumulação destas células; e a progressão resulta normalmente da formação de novas alterações genéticas que conduzem à aquisição do fenótipo maligno ou invasivo (Martinez et al., 2003). Estima-se que apenas 5% das neoplasias malignas resulte da carga genética de cada indivíduo, sendo os factores ambientais determinantes no aparecimento do cancro. A exposição a carcinogénios químicos, a radiação ionizante (e.g. raios X, gama, partículas carregadas, neutrões,

etc.) e não ionizante (e.g. raios infravermelhos, ultravioletas, microondas, etc.) e os estados inflamatórios crónicos, assim como a dieta, o tabaco e o estilo de vida em geral, são factores a ter em conta na etiologia do cancro. A etnia, o sexo, a idade e o estado geral de saúde influenciam também as taxas de incidência e mortalidade desta doença (Perera e Weinstein, 2000).

As funções biológicas do stresse oxidativo e o seu potencial papel no desenvolvimento e progressão do cancro têm sido investigados ao longo das últimas décadas. As mutações no ADN induzidas pelo stresse oxidativo podem representar um passo crítico no início da carcinogénese, resultando no atraso ou na indução da transcrição, indução das vias de transdução de sinal, erros de replicação e instabilidade genómica. Actualmente, foram já encontrados elevados níveis de lesões oxidativas no ADN em vários tumores, implicando fortemente este dano à etiologia do cancro. Existem também evidências de que o dano oxidativo no ADN mitocondrial esteja relacionado com a carcinogénese, uma vez que foram identificadas mutações e alterações na expressão de genes que codificam os complexos I, III, IV e V em vários tipos de cancro humanos (Valko et al., 2007). As células cancerígenas estão sob maior stresse oxidativo do que as células normais, factor associado à transformação oncogénica, ao aumento da actividade metabólica, à má função mitocondrial e ao conseqüente aumento de ROS. As células cancerígenas têm um metabolismo altamente activo e necessitam de uma grande quantidade de ATP para manter o crescimento e proliferação celular descontrolados, factor que vai aumentar a quantidade de ROS produzidas através da cadeia respiratória mitocondrial. Aliada à elevada actividade glicolítica, existe comumente uma grande produção de lactato nas células tumorais. Por outro lado, os tumores são muitas vezes infiltrados com fagócitos que podem criar grandes quantidades de ROS no interior do tecido tumoral. A utilização de fármacos anti-neoplásicos e a má nutrição dos doentes oncológicos pode também ser um factor determinante no aumento de ROS, uma vez que não há o aporte normal de nutrientes como a glicose, proteínas e vitaminas antioxidantes necessários para controlar a produção de radicais livres. Estudos recentes provam também que as células tumorais possuem um sistema antioxidante enzimático deficiente e que, devido à elevada disponibilidade de metais de transição nas células tumorais, existe uma elevada produção de ROS. Todos estes factores contribuem para a persistência do stresse oxidativo na célula tumoral, o que poderá ser responsável pela proliferação celular anómala e pela resistência à quimioterapia (Ozben, 2007; Ribeiro, 2000).

1.2.2. O efeito antioxidante, pró-oxidante e a citotoxicidade selectiva da vitamina C

Paralelamente, e correlacionados com os estudos clínicos que têm sido feitos para avaliar os efeitos anti-cancerígenos de elevadas doses da vitamina C, estudos experimentais têm sido desenvolvidos com o objectivo de investigar os mecanismos de acção da vitamina C que contribuem para o seu efeito terapêutico. Estes estudos incluem as funções antioxidante e pró-oxidante da vitamina C, a sua capacidade de modular a transdução de sinal e a expressão génica,

assim como o seu potencial papel citotóxico nas metástases tumorais. Embora a vitamina C seja conhecida por estimular a função imunitária, inibir a formação de nitrosaminas, bloquear a activação metabólica de carcinogénios e inibir a angiogénese, os seus efeitos preventivos poderão estar sobretudo associados à protecção contra o stresse oxidativo.

Em concentrações fisiológicas, a vitamina C é um poderoso antioxidante hidrossolúvel capaz de neutralizar as ROS, protegendo as células da lesão oxidativa. Quando a vitamina C doa um electrão a um radical livre reactivo e possivelmente perigoso, forma-se consequentemente o radical ascorbil. Quando comparado com outros radicais livres, o radical ascorbil é relativamente estável e possui um tempo de semi-vida de 10^{-5} segundos, sendo pouco perigoso para as células (Lee et al., 2003; Li e Schellhorn, 2007; Ribeiro, 2000; Valko et al., 2007;). Desta forma, a vitamina C neutraliza os radicais livres pois estes necessitam de um par de electrões para recuperar a sua estabilidade, reduzindo potencialmente o stresse oxidativo. Na verdade, a vitamina C é um antioxidante biológico perfeito, uma vez que está presente em quantidades adequadas na célula, reage com uma variedade de radicais livres e é regenerado continuamente (Arrigoni e Tulio, 2002). Este mecanismo contra o stresse oxidativo manifesta-se numa série de funções citopreventivas sob condições fisiológicas, as quais incluem a prevenção de mutações do ADN ao impedir a oxidação das bases, a protecção dos lípidos membranares contra a lesão peroxidativa e a reparação de resíduos de aminoácidos oxidados. Tendo em conta que as mutações no ADN são as maiores responsáveis pelo desenvolvimento do cancro, a atenuação da oxidação intracelular pela vitamina C constitui um potencial mecanismo anticancerígeno (Lee et al., 2003; Li e Schellhorn, 2007).

Paradoxalmente, estudos em várias linhas celulares diferentes revelam que elevadas concentrações de vitamina C produzem efeitos citotóxicos associados à inibição da proliferação celular. Estes estudos têm associado este efeito citotóxico da vitamina C ao facto desta poder desempenhar funções como pró-oxidante, promovendo assim o stresse oxidativo. A actividade pró-oxidante da vitamina C pode ocorrer devido à presença de metais livres de transição como o cobre e o ferro. O potencial pró-oxidante intrínseco da vitamina C poderá contribuir para as suas propriedades citotóxicas selectivas, visto que se revela ser mais evidente em células tumorais (Gonzalez et al., 2005; Lee et al., 2003; Li e Schellhorn, 2007). Assim, as funções da vitamina C como pró-oxidante e/ou antioxidante são determinadas pelo menos por três factores: o potencial redox no ambiente celular, a presença ou ausência de metais de transição e as concentrações locais de vitamina C (Li e Schellhorn, 2007).

Pensa-se também que a vitamina C apresente citotoxicidade selectiva, uma vez que dados recentemente obtidos através de estudos *in vitro* mostram que concentrações farmacológicas de AA (0,3-20mM) matam as células tumorais, preservando as células normais (efeito verificado em várias linhas celulares diferentes). Esta resposta anti-cancerígena selectiva é dependente do tempo de incubação da vitamina C e da sua concentração extracelular, sendo independente da concentração intracelular da mesma. Pensa-se também que a estimulação das vias apoptóticas e o

dano pró-oxidante acelerado que não pode ser reparado pelas células tumorais possam estar na base da citotoxicidade selectiva da vitamina C. Estes factores estão estreitamente relacionados com várias propriedades intrínsecas das células tumorais, nomeadamente a diminuição das concentrações de enzimas antioxidantes (como a CAT e a SOD), o aumento da disponibilidade de metais de transição e o aumento da oxidação do AA que, em elevadas concentrações plasmáticas associado a sobre-expressão dos GLUT, promove a acumulação do metabolito instável DHA, podendo ser tóxico. A sobre-expressão dos GLUT deve-se ao elevado metabolismo glicolítico da maior parte dos tumores. Todas estas propriedades intrínsecas contribuem para o incremento das concentrações intracelulares de ROS e para a consequente revelação do potencial terapêutico da vitamina C (Chen et al., 2005; Li e Schellhorn, 2007; Padayatty e Levine, 2005). De notar que, para além das vantagens supracitadas, a vitamina C possui outras vantagens que a distinguem de outros agentes citotóxicos. Além de matar preferencialmente as células neoplásicas, não suprime o sistema imunitário e não provoca a supressão da medula óssea. Para além disto, aumenta a resistência animal e humana a agentes infecciosos, melhorando a linfopoiese e a imunidade celular, a actividade bactericida dos neutrófilos e a modulação de proteínas complementares. De referir também a sua importância no fortalecimento da integridade estrutural da matriz extracelular, a qual é responsável pela resistência à metastização (Riordan et al., 1994).

1.2.3. Vias de administração da vitamina C

A vitamina C é um agente citotóxico contra uma variedade de células cancerígenas mas apresenta uma baixa toxicidade nas células normais, o que pode levar a considerar a vitamina C como um interessante agente anti-cancerígeno quando administrada em doses elevadas. Estudos de farmacocinética demonstraram claramente que as concentrações de vitamina C no plasma e nos tecidos são altamente controladas em função das doses orais, uma vez que esta via de administração é limitada pela eliminação do excesso de vitamina por via renal. Como consequência, a administração oral da vitamina C não pode alcançar concentrações plasmáticas superiores a 50-100 μ M e, por este motivo, a suplementação oral de vitamina C parece não ter influência no tratamento de doentes oncológicos. Tanto a toma de suplementos orais como a ingestão de alimentos ricos em vitamina C não alteram em grande escala os valores normais das concentrações plasmáticas da mesma. O consumo de frutos ou vegetais, cinco a nove vezes por dia, permite atingir concentrações plasmáticas de 80 μ M ou até menos e, mesmo com uma administração oral diária de 3g (em seis vezes), os valores não excedem os 220 μ M. Por outro lado, a injeção i.v. prescinde do sistema de reabsorção renal e permite a obtenção de concentrações plasmáticas de vitamina C muito mais elevadas. Concentrações plasmáticas até 20mM, cerca de cem vezes superiores às obtidas pela máxima dosagem oral, são claramente citotóxicas para as células cancerígenas *in vitro*. De facto, vários estudos mostram que é possível manter as

concentrações de vitamina C, *in vivo* e após injeção i.v., suficientemente elevadas para actuar como um agente terapêutico (Li e Schellhorn, 2007; Padayatty et al., 2004).

Estudos *in vitro* revelam que concentrações fisiológicas de vitamina C (0,1mM) não mostraram quaisquer efeitos em células tumorais ou normais. Todavia, em concentrações farmacológicas (0,3-20mM), atingíveis *in vivo* por administração i.v., a vitamina C mata selectivamente as células tumorais. Esta acção citotóxica pode ser explicada pela propriedade pró-oxidante da vitamina C, a qual, em concentrações elevadas, medeia a produção de espécies ROS (Li e Schellhorn, 2007). Actualmente, a administração i.v. de vitamina C como uma nova terapia adjuvante permanece controversa na ausência de informação clínica consistente (Verrax e Calderon, 2008). De notar, por outro lado, que existem evidências crescentes que os antioxidantes potenciam os efeitos anti-tumorais das terapias convencionais *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, alguns autores defendiam que a utilização de antioxidantes com a quimioterapia e radioterapia era de evitar, uma vez que estes iriam interferir com a formação de ROS e com a citotoxicidade destas terapias, protegendo tanto as células normais como as tumorais das espécies reactivas produzidas pela irradiação e pela maioria dos agentes quimioterapêuticos. No entanto, tais preocupações já foram consideradas inválidas com base em vários estudos experimentais e/ou clínicos realizados os quais concluíram que, longe de prejudicar os benefícios das terapias convencionais, poderão mesmo contribuir para a melhoria das mesmas. Na verdade, cada vez mais doentes oncológicos têm usado suplementos nutricionais que contêm antioxidantes a par das terapias convencionais e a sua qualidade de vida tem melhorado (Drisko et al., 2003; Lee et al., 2003; Moss, 2006; Prasad, et al., 1999; Walingo, 2005).

Apesar da maioria dos estudos disponíveis suportarem a ideia de que a vitamina C pode ser útil na prevenção e no tratamento do cancro, tem sido difícil encontrar um consenso sobre esta matéria. Por este motivo, este trabalho pretende avaliar o metabolismo e os mecanismos de acção da vitamina C e mostrar o efeito citotóxico da mesma em células de adenocarcinoma colorectal e de melanoma melanocítico através de métodos bioquímicos e de imagiologia nuclear, contribuindo assim para o esclarecimento do potencial papel da vitamina C ao nível do cancro.

Capítulo II

Materiais e métodos

Na última década tem-se assistido a um interesse crescente por parte da comunidade científica na aplicação das vitaminas antioxidantes como potenciais agentes com acção preventiva e terapêutica na doença oncológica. No que diz respeito à vitamina C, até agora não existem resultados conclusivos. Com o objectivo de esclarecer o potencial papel da vitamina C no cancro, e tendo em conta as práticas já existentes, o desenvolvimento de novas técnicas capazes de fornecerem informação sobre o metabolismo e mecanismo de acção da vitamina C pode ser crucial para o conhecimento dos processos através dos quais actua. Desta forma, a medicina nuclear pode constituir uma das soluções para esta aproximação, já que através da marcação radioactiva da vitamina C com um radionúclido emissor de fotão gama é possível inferirmos através de estudos *in vitro* e *in vivo* como é que ocorrem os seus processos metabólicos e funcionais. Por outro lado, o recurso a técnicas de biologia celular e molecular pode ser uma mais-valia para o esclarecimento do papel biológico deste poderoso antioxidante e pró-oxidante, complementando assim os dados obtidos nos estudos realizados *in vivo* e *in vitro* com a vitamina C marcada radioactivamente.

2.1. Estudos de química

2.1.1. Marcação radioactiva da vitamina C

Os radiofármacos, compostos sem acção farmacológica, constituídos por um radionúclido e um componente biologicamente activo em concentrações apropriadas, são utilizados em Medicina Nuclear para o diagnóstico e terapia de várias doenças. Actualmente, os radiofármacos para diagnóstico que têm na sua composição o tecnécio-99 metaestável (^{99m}Tc) representam cerca de 80% do volume de exames realizados num serviço de medicina nuclear. Esta preponderância deve-se às propriedades físicas e químicas deste radioisótopo como o seu período de semi-desintegração de 6.01 horas, decaimento por transformação isomérica com emissão de radiação gama de 140keV, ausência de reacções biológicas adversas, baixo custo e fácil obtenção a partir de um gerador de molibdénio (^{99}Mo). O tecnécio é um metal de transição que apresenta vários estados de oxidação que variam entre -1 e +7, factor que lhe dá a possibilidade de formar complexos de coordenação com numerosos agentes quelantes. No entanto, a coordenação de agentes quelantes ao tecnécio é feita quando este metal se encontra em estados de oxidação inferiores a +7 (Mease e Lambert, 2001). Por este motivo, foi necessário adicionar à formulação farmacêutica desenvolvida um agente capaz de reduzir o tecnécio do estado de oxidação +7 a outros estados de oxidação para que ocorresse a marcação efectiva do AA: o cloreto de ferro III (FeCl_3) (Sigma, 157740). Assim, a 222MBq de pertecnetato de sódio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$) num volume de 1,5ml foi adicionado 0,2ml de uma solução de cloreto de ferro III 0,1N em ácido clorídrico (HCl) 0,1N. Posteriormente, esta solução foi adicionada a 200mg de AA (Sigma, A5960) em frasco previamente argonado e protegido da luz. Após breve agitação, o pH foi levado a 6,5 pela adição

de 1,2ml de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M, o que foi confirmado pelo método de comparação de cores (pH-Fix 4,5-10, Machenerey-Nagel). O pH é um factor importante no processo de marcação, uma vez que pode interferir significativamente na eficiência de marcação, levando à formação de complexos com estrutura química e comportamento biológico diferentes do esperado. A optimização desta marcação radioactiva foi obtida após a escolha de um agente redutor adequado, variação da concentração do ligando e do agente redutor, da actividade do radionúclido, da temperatura e do pH.

2.1.2. Controlo de qualidade

O processo de marcação de um componente biologicamente activo com o tecnécio nem sempre é um processo eficiente, resultado da decomposição do complexo devido a inúmeros factores: mudanças na temperatura ou pH, acção da luz, presença de agentes redutores ou oxidantes, radiólise dos constituintes, qualidade do eluato proveniente do gerador, procedimentos de marcação desadequados e falhas no processo de marcação devido a erro humano. Como resultado, surgem impurezas radioquímicas como o tecnécio livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) e o tecnécio reduzido e hidrolisado ($^{99m}\text{Tc-RH}$). O tecnécio livre resulta da falta de redução do radionúclido pelo agente redutor ou do facto deste estar em maior quantidade estequiométrica relativamente ao ligando. Por outro lado, o tecnécio reduzido e hidrolisado resulta da hidrólise do tecnécio livre devido ao excesso de agente redutor ou da diminuta quantidade de radionúclido relativamente ao ligando, resultando na formação de complexos hidrofóbicos e coloidais de tecnécio reduzido e hidrolisado não ligado. A presença de impurezas radioquímicas contribui para a diminuição da qualidade das imagens devido ao aumento da actividade de fundo e para o aumento da dose no doente (Robbins, 1984). Desta forma, a pureza radioquímica, definida como a percentagem de actividade presente na forma química desejada relativamente à actividade total, foi determinada recorrendo à cromatografia líquida de alta precisão (*high performance liquid chromatography* - HPLC).

A cromatografia é um processo de separação que se baseia no transporte forçado de um líquido (fase móvel) que transporta consigo a mistura a analisar através de um meio poroso (fase estacionária), sendo que as diferenças de interacção entre os analitos e as duas fases imiscíveis resultam em diferentes tempos de migração para os diferentes constituintes da amostra a analisar, permitindo assim a sua identificação. Desta forma, a coluna retém os componentes que interagem mais fortemente com esta, enquanto aqueles que possuem menor afinidade química são arrastados pela fase móvel e são primeiramente detectados no tempo. Devido à grande variedade de combinações entre as fases móveis e estacionárias, a cromatografia é uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação em muitas áreas. O HPLC é uma técnica cromatográfica rápida, reprodutível, específica e sensível que permite a separação dos compostos de uma mistura devido ao bombeamento de uma fase líquida móvel a altas pressões através de uma coluna. Devido ao grande empacotamento da fase estacionária utilizada em HPLC, a difusão

lateral é reduzida e as partículas do empacotamento têm uma grande área de superfície, resultando numa elevada resolução. Como a eficiência da coluna é inversamente proporcional ao tamanho das partículas nela compactadas, é necessária uma pressão relativamente alta para bombear o líquido através de uma coluna eficiente, reduzindo o tempo de análise do composto. Podem-se analisar e separar muitas misturas de compostos mudando a polaridade quer da fase móvel, quer da fase estacionária. Actualmente, o HPLC de fase reversa é o mais utilizado e é realizada com recurso a uma fase estacionária não polar; entre as mais comuns temos a coluna de fase reversa C-18 que é constituída por sílica com uma cobertura quimicamente ligada de octadecilsilano. O HPLC de fase reversa baseia-se no princípio de os compostos não polares da amostra interagirem com a fase estacionária não polar, sendo esta interacção responsável pela diminuição da velocidade com que a amostra percorre a fase estacionária. Por outro lado, os compostos polares são atraídos pela fase móvel, também polar, movendo-se rapidamente ao longo da fase estacionária utilizada. Assim, no HPLC de fase reversa o tempo de retenção é superior para as moléculas não polares, sendo o tempo de retenção das moléculas polares muito inferior. De notar que o tempo de retenção das moléculas aumenta com a utilização de um solvente polar como fase móvel, diminuindo quando é utilizado um solvente mais hidrofóbico apolar. Por vezes, para obter uma separação óptima dos vários componentes da amostra usam-se dois solventes e, nesse caso, é necessário ajustar-se um gradiente entre os dois com o intuito de obter a melhor separação (Meyer, 2004).

Após a passagem da amostra pela coluna é necessário fazer a detecção dos seus componentes, a qual pode ser realizada por espectrofotometria, electroquímica, fluorescência, espectrometria de massa, detecção de eventos por cintilação, entre outros. Na análise de radiofármacos, tanto o monitor ultravioleta (UV) como o detector de radiação são frequentemente usados para medir a concentração dos diferentes componentes da amostra. O monitor UV mede a absorvância de luz do eluato, que é proporcional à concentração do soluto presente no mesmo. O detector de radiação é usado para medir a concentração dos componentes radioactivos no eluato. A maioria dos monitores de detecção por radioactividade possui cristais cintiladores entre dois fotomultiplicadores de elevada eficiência de contagem. Os sinais medidos por estes são amplificados e posteriormente quantificados. Esta quantificação é efectuada por um processo de integração gráfica das detecções obtidas, gerando-se assim um cromatograma pela relação entre o valor real da detecção da substância e o seu tempo de retenção. Por sua vez, o tempo de retenção é o tempo que o composto leva a percorrer a distância desde a coluna até ao detector, o qual se inicia no momento em que a amostra é injectada e termina no instante em que a altura do pico (no cromatograma) referente ao composto é máxima. O cromatograma é obtido em contagens por segundo (CPS) em função do tempo e em milivolt (mV) em função do tempo para a detecção por radioactividade e UV, respectivamente. Assim, a quantidade de composto que sai da coluna vai determinar a intensidade do sinal no detector. Quando nenhum componente passa pelo detector,

regista-se um sinal constante, designado de linha basal. Por outro lado, quando um componente atravessa o detector ocorre uma alteração no sinal da resposta, o que se traduz num pico de resposta. Desta forma, pela comparação dos tempos de retenção da amostra com os tempos de retenção de compostos puros podem identificar-se as substâncias presentes na amostra a analisar. Pela determinação da área dos picos podem medir-se as quantidades das substâncias nas amostras através da calibração do sistema de HPLC para as mesmas substâncias. Após a detecção, um computador acoplado ao detector permite registar automaticamente o sinal enviado por este. Este computador encontra-se na unidade central de controlo e possui os ficheiros de comando e de controlo de todo o processo e é onde o operador pode seleccionar parâmetros de actuação, assim como observar em cada instante o cromatograma, podendo este ser enviado para um arquivo em papel ou ser armazenado em suporte informático (Meyer, 2004). A figura 2.1. representa um sistema de HPLC.

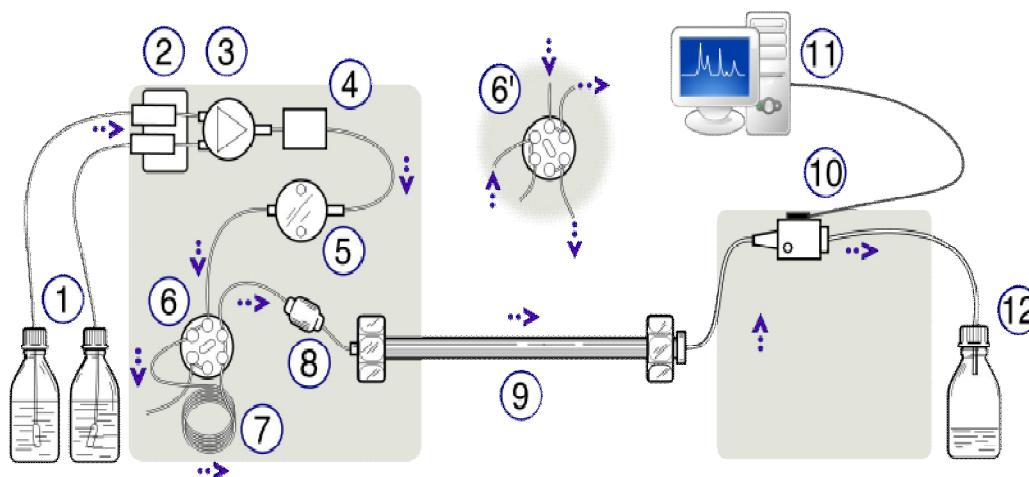


Figura 2.1. – Representação esquemática de uma cromatografia líquida de alta precisão. Este sistema é constituído por: (1) reservatório dos solventes; (2) desgaseificador dos solventes; (3) válvula de gradiente; (4) recipiente de mistura para a entrega da fase móvel; (5) bomba de elevada pressão; (6) válvula para injeção da amostra em posição "load"; (7) loop para injeção da amostra; (8) pré-coluna; (9) coluna; (10) detector; (11) computador; (12) colector de lixos (adaptado de <http://commons.wikimedia.org>).

Através de um sistema de HPLC de fase reversa foi possível determinar a pureza radioquímica do complexo marcado por separação dos vários componentes do radiofármaco preparado: o AA e o cloreto de ferro III por detecção UV e o AA marcado radioactivamente ($^{99m}\text{Tc-AA}$) e o tecnécio livre por radioactividade. De referir que não foi possível visualizar o pico referente ao tecnécio reduzido e hidrolisado pois este forma agregados coloidais com 30-130nm de pequenas partículas de 2-3nm de diâmetro e, por este motivo, fica retido na pré-coluna pois o filtro desta apenas permite que passem partículas de tamanho igual ou inferior a 0,1nm (Sekine et al., 2004). Para realizar o controlo de qualidade foi utilizado um equipamento Gilson composto por UV/VIS-151 Detector, 321-PUMP e 506-C System Interface. A definição dos métodos e o processamento dos resultados foi feito usando o software Gina-Star, cuja base de dados armazena

automaticamente todos os dados obtidos. O método de HPLC para o controlo de qualidade do $^{99m}\text{Tc-AA}$ foi desenvolvido usando como fase estacionária uma coluna Nucleosil com pré-coluna (Hichrom, NC100-5C18), uma fase móvel com um gradiente de hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) (0,025M; pH 3) e metanol (CH_3O) na proporção de 96/4 (v/v) e o fluxo constante de 1 mL/min. A detecção UV foi efectuada com o comprimento de onda de 210nm. Primeiramente fez-se uma lavagem de todo o sistema durante 30 minutos com uma fase móvel de metanol e água numa proporção de 90/10 (v/v) num fluxo constante de 1mL/min e num comprimento de onda de 254nm, sendo esta fase móvel a recomendada pelo fabricante para a lavagem da coluna utilizada. Posteriormente, estabilizou-se o sistema de HPLC com a fase móvel descrita para o controlo de qualidade durante 30 minutos, servindo esta passagem unicamente para a estabilização dos detectores de UV e de radioactividade. Após a preparação do complexo $^{99m}\text{Tc-AA}$, foram retirados 25 μL do mesmo e transferidos para uma microseringa de HPLC (Hamilton), tendo-se posteriormente injectado no *loop* e iniciado o método anteriormente descrito com o objectivo de realizar o controlo de qualidade aos 0, 30, 60, 180, 240 e 360 minutos. O tempo de duração de cada ensaio foi de 30 minutos. Obtiveram-se também os cromatogramas do AA, cloreto de ferro III e tecnécio livre para tornar possível a interpretação dos cromatogramas obtidos no controlo de qualidade do $^{99m}\text{Tc-AA}$. Após a obtenção dos cromatogramas desejados, efectuou-se novamente uma lavagem do sistema com a fase móvel da coluna recomendada pelo fabricante. De notar que todas as fases móveis utilizadas foram previamente filtradas e desgaseificadas de forma a garantir que não existem bolhas de ar no sistema e a consequente estabilidade da linha basal. Para determinar o tempo de retenção e quantificar cada composto presente no complexo marcado e nas amostras padrão, foi feita uma integração gráfica do cromatograma. A integração gráfica foi feita desenhando regiões de interesse (ROIs) do tipo BB, que são definidas tendo em conta que os extremos do pico coincidem com a linha basal. Desta forma, obtiveram-se as áreas sob a curva correspondente à quantidade de radioactividade total de cada composto e foi feita a avaliação das respectivas quantidades percentuais em função da radioactividade total detectada. A pureza radioquímica do radiofármaco preparado traduz-se na equação 2.1:

$$\%^{99m}\text{Tc} - \text{AA} = 100 - \%^{99m}\text{TcO}_4^- \quad (\text{equação 2.1})$$

A avaliação das características de desempenho do método de HPLC nas condições experimentais definidas foi feita de forma a garantir a sua aplicabilidade ao nível do intervalo de concentrações e tipos de amostras a partir da selectividade, eficiência, resolução e linearidade. A capacidade de um sistema cromatográfico para discriminar diferentes analitos é denominada selectividade (α) e pode ser determinada através da razão entre os tempos de retenção de dois analitos (t_{R1} e t_{R2}) (Kazakevich e LoBrutto, 2007) (equação 2.2):

$$\alpha = \frac{t_{R1}}{t_{R2}} \quad (\text{equação 2.2})$$

O aumento da selectividade nos sistemas cromatográficos é fundamental, uma vez que uma selectividade igual a 1 não permite distinguir dois picos. Num caso ideal, a selectividade de um sistema depende apenas da diferença de interacção dos analitos com a superfície da fase estacionária. No entanto, pode também ser influenciada pelo tipo e pela composição da fase móvel. A eficiência de um sistema cromatográfico pode ser definida como o grau de alargamento de um pico e é expressa em número de pratos teóricos (N) ou altura equivalente do prato teórico ($HETP$), uma vez que se assume que a coluna possa ser visualizada como uma divisão de secções imaginárias chamadas de pratos. Nas equações seguintes (2.3 e 2.4), t_r é o tempo de retenção do analito considerado em minutos, w é a largura do pico medida em unidades de tempo entre a distância das duas intersecções dos extremos do pico com a linha basal e L representa o tamanho da coluna em centímetros. A eficiência é uma propriedade da coluna e, teoricamente, todos os analitos separados na mesma coluna devem ter a mesma eficiência (Kazakevich e LoBrutto, 2007).

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2 \quad (\text{equação 2.3})$$

$$HETP = \frac{L}{N} \quad (\text{equação 2.4})$$

A eficiência da coluna é maioritariamente dependente de factores cinéticos do sistema cromatográfico, tal como a difusão molecular, a dinâmica do fluxo de massa, as propriedades do empacotamento da coluna e o fluxo da fase móvel. Quanto menores as partículas que constituem a coluna e mais uniforme for o seu empacotamento, maior será a sua eficiência. Por outro lado, quanto maior for o fluxo da fase móvel, menor tempo possuem as moléculas do analito para se difundirem e aumentarem a dilatação do gráfico. A resolução (R) de um sistema cromatográfico é definida como a razão entre a diferença dos tempos de retenção e a soma das larguras a meia altura dos picos, a qual deve ter superiores a 1,5 e pode ser descrita pela equação 2.5 (Kazakevich e LoBrutto, 2007)

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad (\text{equação 2.5})$$

Onde t_{R1} e t_{R2} correspondem aos tempos de retenção do pico 1 e 2, respectivamente, e w_1 e w_2 representam a largura a meia altura dos dois picos considerados (Kazakevich e LoBrutto, 2007).

Por último, a linearidade de um procedimento analítico de HPLC corresponde à capacidade deste para fornecer resultados instrumentais proporcionais à concentração da substância a analisar na amostra através de uma relação linear. A linearidade é normalmente avaliada por inspecção

visual de um gráfico onde se representam os sinais de resposta (área dos picos) em função da concentração da substância a analisar em soluções padrão. Os parâmetros da regressão obtidos pelo método dos mínimos quadrados (o declive, a ordenada na origem e o coeficiente de correlação) traduzem a relação linear dos dados experimentais, permitindo extrair informação sobre o método analítico. O coeficiente de correlação dá informação sobre a qualidade da curva obtida, indicando menor dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos parâmetros da regressão linear quanto mais próximo o valor for de 1. Assim, para construir a curva de calibração do sistema foi necessário injectar cinco amostras de AA com as concentrações de 1, 3, 5, 7 e 10mM, tendo sido posteriormente calculada a equação da recta e o coeficiente de correlação (Snyder et al., 1997).

2.2. Estudos *in vitro*

Os estudos *in vitro*, realizados fora de um organismo vivo em ambiente controlado, pretendem descrever os efeitos de uma variável experimental num pequeno grupo de constituintes de um organismo. Este tipo de estudos procura encontrar mecanismos de acção biológica sem ter outras variáveis a influenciar os resultados, sendo por isso fundamental para este trabalho. Desta forma, para avaliarmos a cinética de entrada e os efeitos citotóxicos da vitamina C foram realizados estudos *in vitro* com duas linhas celulares tumorais humanas: adenocarcinoma colorectal (WiDr) e melanoma melanocítico (A-375).

2.2.1. Culturas celulares

As duas linhas celulares consideradas, obtidas na *American Type Culture Collection* (ATCC), foram descongeladas e propagadas após a recepção. A propagação foi feita em culturas aderentes a 37°C e 5% de CO₂ (HeraCell 150) utilizando para tal o meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma D-5648) suplementado com 100 µM de piruvato de sódio (Gibco 11360), 10% de soro bovino fetal (Gibco 2010-09) e 1% de antibiótico (100U/mL de penicilina e 10µg/mL estreptomicina, Gibco 15140-122). É de referir que todo o material de manipulação das culturas celulares foi devida e previamente esterilizado. Da mesma forma, todos os procedimentos foram efectuados nas condições de esterilização e assepsia necessários.

2.2.2. Estudos de captação

Os transportadores desempenham um papel fundamental no perfil farmacocinético de muitos fármacos. Presentes em todas as barreiras farmacológicas, estas proteínas determinam a absorção, distribuição e a via de eliminação dos fármacos. Desta forma, através dos estudos de captação do ^{99m}Tc-AA podemos verificar o influxo e o efluxo deste radiofármaco ao longo do tempo nas WiDr e A-375. Para a realização dos estudos de captação foi necessário preparar uma

suspensão celular com 2×10^6 células. Para tal, as células foram incubadas com 3mL de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco 25200) durante 3 minutos para que ocorresse a desagregação celular. De seguida, adicionaram-se 8mL de DMEM para inactivar a tripsina e centrifugou-se a suspensão celular a 1000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos (Heraeus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18.7 cm). Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em meio de cultura de modo a obter uma concentração de 2×10^6 células/mL e foram deixadas a repousar a 37°C durante 60 minutos em frascos de 25 cm^2 para recuperarem do stresse induzido pela acção da tripsina. Após a preparação da suspensão celular foi adicionado o $^{99\text{m}}\text{Tc-AA}$ numa actividade igual a 0.925 MBq/mL . Aos 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a adição, foram retiradas alíquotas de $200 \mu\text{L}$ da suspensão celular para tubos de *ependorf* que continham solução de tampão fosfato (PBS) gelado, de modo a reduzir o metabolismo celular. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm durante 60 segundos para completa separação entre o *pellet* e o sobrenadante, tendo este sido recolhido para um tubo identificado. Seguiu-se uma lavagem do *pellet* com $500 \mu\text{L}$ de PBS gelado, repetindo-se o procedimento de separação do sobrenadante para obter a completa rentabilização do sobrenadante. Os sobrenadantes resultantes das centrifugações foram recolhidos para os tubos identificados e os *pellets* permaneceram nos respectivos tubos de *ependorf* devidamente identificados. Após a incubação das células com o radiofármaco e a colheita separada dos *pellets* e dos sobrenadantes, foi possível calcular a captação do $^{99\text{m}}\text{Tc-AA}$ por parte das células para cada tempo. Assim, pela contagem de ambas as fracções (*pellets* e sobrenadantes) no contador de poço (DPC Gamma C12) em contagens por minuto (CPM), quantificou-se a percentagem de captação do $^{99\text{m}}\text{Tc-AA}$ pelas células, utilizando a equação 2.6:

$$\% \text{ Captação} = \frac{CPM_{\text{pellet}}}{CPM_{\text{pellet}} + CPM_{\text{sobrenadante}}} \times 100 \quad (\text{equação 2.6})$$

Para além do estudo de captação com o $^{99\text{m}}\text{Tc-AA}$ nas WiDr e A-375, foi realizado outro estudo com as mesmas células e com o mesmo procedimento utilizando o pertecnetato de sódio para efeitos de comparação da percentagem de captação obtida com a molécula marcada.

2.2.3. Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada recorrendo ao método de exclusão do azul de tripano. O método de exclusão do azul de tripano baseia-se no princípio de que células viáveis apresentam membranas intactas que evitam a entrada deste corante, enquanto as membranas metabolicamente inactivas das células mortas (não viáveis) não conseguem evitar a penetração do corante na célula. Após a entrada na célula, o corante atravessa o invólucro nuclear e acaba por se localizar nos núcleos, que ficam corados de azul. Assim, as células azuis correspondem a células

mortas, enquanto as células vivas se encontram com um aspecto brilhante (não coradas de azul). Para realizar este procedimento, após o término dos estudos de captação aos 120 minutos, retira-se uma alíquota de 20µL da suspensão celular incubada com o $^{99m}\text{Tc-AA}$ ou com o pertecnetato de sódio e adiciona-se a 20µL de azul tripano (Sigma T0776) num *ependorf*. De seguida, a suspensão celular é homogeneizada utilizando uma micropipeta e colocada num hemocitómetro que foi visualizado ao microscópio óptico (Motic AE31). A contagem das células foi efectuada nos quatro quadrantes do hemocitómetro e a viabilidade celular das WiDr e A-375 foi calculada através da equação 2.7:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{\text{células vivas}}{\text{células vivas} + \text{células mortas}} \times 100 \quad (\text{equação 2.7})$$

2.2.4. Determinação da proliferação e sobrevivência celular

2.2.4.1. Avaliação da proliferação celular por espectrofotometria

Para avaliar os efeitos da vitamina C na proliferação das células WiDr e A-375, foi realizado um teste colorimétrico denominado por MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2),5-diphenyltetrazolium bromide). O MTT é reduzido por células metabolicamente activas devido à acção das enzimas desidrogenases, sendo que esta redução ocorre principalmente na mitocôndria através da acção da succinato desidrogenase, fornecendo este método uma medida de função mitocondrial. Estas enzimas possuem a capacidade de clivar os anéis tetrazólio do MTT e formar cristais de formazano de cor azul escura que podem ser posteriormente solubilizados e quantificados por meios espectrofotométricos. Desta forma, a quantidade de cristais de formazano formados é directamente proporcional à quantidade de células viáveis. Para este estudo foi necessária uma suspensão celular com 5×10^4 células/mL em meio de cultura distribuída por placas de 24 poços, contendo cada poço 500µL da suspensão. Após 24 horas, as células foram incubadas com diferentes concentrações de AA que variaram entre 0,05mM a 50mM durante 1 e 4 horas (tabela 2.1.), sendo que após o tempo de incubação o meio das células foi mudado. Após 24 e 48 horas a proliferação celular foi avaliada: o meio das culturas celulares foi retirado, adicionou-se 500µL de PBS a cada poço para lavagem e, posteriormente, 200µL de uma solução de MTT (5mg/mL; Sigma M2128) em PBS. Passadas 3 horas, acrescentou-se 200µL de uma solução de isopropanol ácido, com 0,04M de ácido clorídrico 37% fumante, e as células foram colocadas numa placa de agitação durante 30 minutos. O conteúdo de cada poço foi posteriormente homogeneizado e transferido para uma placa de 96 poços e a absorvância foi quantificada a 570nm com um filtro de referência de 620nm, usando o espectrofotómetro ELISA (SLT-Spectra). Os resultados obtidos foram analisados e processados no programa OriginPro 8.0.

Tabela 2.1. – Tempo de incubação com a vitamina C e posterior tempo de repouso das células.

Linha celular	Tempo (horas)	
	Incubação com AA	Repouso
WiDr	1	24
	4	
	1	48
	4	
A-375	1	24
	4	
	1	48
	4	

2.2.4.2. Avaliação da sobrevivência celular através de ensaios clonogénicos

O ensaio clonogénico é uma técnica realizada *in vitro* que visa determinar a sobrevivência celular tendo por base a capacidade de uma única célula para crescer e formar uma colónia após as células serem submetidas à acção da vitamina C. Uma colónia é constituída por, pelo menos, 50 células. Para este estudo foram semeadas 500 células por poço numa placa de seis poços. Após 24 horas, as células foram incubadas com AA numa concentração de 0,5, de 2, de 3 e de 5mM. Passadas 2 horas de exposição ao AA, as células foram lavadas duas vezes com 1mL de PBS e foi adicionado novo meio às células. Após cinco dias, o meio foi novamente mudado e ao décimo dia as colónias foram visualizadas. Para tal, o meio foi aspirado e as células foram lavadas com 2mL de PBS. De seguida, foram adicionados 2mL de metanol durante 5 minutos para fixar as colónias, procedimento que foi repetido duas vezes. As placas foram deixadas a secar durante 5 minutos e de seguida foram adicionados 2mL do corante violeta de cristal (Sigma M2128) (0,5% diluído em metanol), que foi deixado a actuar durante 5 minutos. De seguida, o corante foi aspirado e as placas foram lavadas em água tépida e deixadas a secar. O número de colónias foi posteriormente contado, calculando-se de seguida a *plate efficiency* e o factor de sobrevivência pelas equações 2.8 e 2.9. As células foram fotografadas num microscópio Motic AE31 através do sistema Motic Images Advanced 3.2, assim como numa máquina fotográfica HP Photosmart M547.

$$Plate\ efficiency = \frac{Número\ de\ colónias\ contadas}{Número\ de\ colónias\ semeadas} \times 100 \quad (\text{equação 2.8})$$

$$Factor\ de\ sobrevivência = \frac{Plate\ efficiency\ das\ amostras\ tratadas}{Plate\ efficiency\ das\ amostras\ controlo} \times 100 \quad (\text{equação 2.9})$$

2.2.5. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar células ou outras partículas biológicas microscópicas suspensas em meio líquido. Este método permite analisar simultaneamente, e num curto período de tempo, múltiplas características físicas e químicas de células em suspensão através de um aparelho de detecção óptico-eletrónico. Neste aparelho, um feixe de luz de um único comprimento de onda é direccionado para um meio líquido em fluxo. Vários detectores são apontados ao local onde o fluxo passa através do feixe de luz: um na linha do feixe de luz (*forward scatter*, FCS) e vários perpendiculares a este (*side scatter*, SSC), além de um ou mais detectores fluorescentes. Cada partícula suspensa que passa através do feixe dispersa a luz de uma forma e os corantes químicos fluorescentes encontrados na partícula ou a ela ligados podem ser excitados emitindo luz de menor frequência (ou maior comprimento de onda) do que o da fonte de luz. Esta combinação de luz dispersa e fluorescente é melhorada pelos detectores e, por análise das flutuações de brilho de cada detector (uma para cada pico de emissão fluorescente), é possível explorar vários tipos de informação sobre a estrutura física e química de cada partícula individual. A FSC correlaciona-se com o volume celular e a SSC depende da complexidade interna da partícula (por exemplo a forma do núcleo, a quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e a rugosidade da membrana). Neste trabalho, esta técnica foi utilizada para: a) a determinação e caracterização dos níveis de morte celular através da dupla marcação com a anexina V (AV) ligada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e com iodeto de propídeo (IP); b) a determinação da presença intracelular de espécies reactivas de oxigénio através do 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH₂-DA) e do dihidroetídio (DHE); c) a expressão do glutatião reduzido (GSH) através do 1-(4-Chloromercuriophenylazo)-2-naphthol (alaranjado de mercúrio); d) a alteração do potencial de membrana mitocondrial avaliada através do 1st J-aggregate-forming cationic (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol carbocyanine, JC-1).

Esta técnica permitiu ainda determinar a expressão membranar dos GLUT. Para todas as marcações foram necessárias aproximadamente 10⁶ células por poço numa placa de seis poços. Após 24 horas, as células foram incubadas durante 1 hora com o AA numa concentração de 10, de 25 e de 45mM para as WiDr e de 0,5, de 2 e de 10mM no caso das A-375. Posteriormente o meio foi mudado e no dia seguinte as células foram preparadas para citometria. Esta preparação incluiu a desagregação celular das placas com uma solução de Tripsina-EDTA, tendo em conta que o meio de cultura presente nos poços foi reaproveitado. Para todas as marcações o número de eventos obtidos através do programa CellQuestTM, correspondente ao número de células, foi de 10⁴. Para a análise e quantificação da informação utilizou-se um software específico que corre em computador dedicado (Paint-a-Gate 3.02, Machintosh Software).

2.2.5.1. Avaliação da morte celular

A morte celular foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com AV-FITC em combinação com o IP. Esta técnica permite distinguir as células viáveis das células mortas e dentro destas distinguir qual o mecanismo que desencadeou a morte celular (apoptose ou necrose). Uma das características das células em apoptose é a alteração da distribuição dos fosfolípidos da bicamada lipídica que constitui a membrana celular. Assim, quando se inicia a morte celular por apoptose ocorre a translocação da fosfatidilserina, um fosfolípido de carga negativa, do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. A AV é uma molécula com elevada afinidade por fosfolípidos de carga negativa, como a fosfatidilserina, ligando-se a este fosfolípido. Quando conjugada com um fluorocromo FITC, a AV permite determinar a localização da fosfatidilserina na membrana celular e identificar as células em apoptose inicial (Sgonc e Gruber, 1998). Por outro lado, as células em necrose perdem a integridade da membrana celular, permitindo a entrada do IP para o interior da célula. O IP é um composto que se intercala na dupla cadeia de ADN emitindo fluorescência. No entanto, a perda de integridade membranar, ou seja, a ruptura da membrana celular ocorre também nas fases mais avançadas da apoptose permitindo a entrada de IP. Deste modo, as células vivas apresentam-se negativas tanto para a marcação com AV-FITC como para a marcação com IP, enquanto as células em apoptose inicial apresentam-se positivas para a marcação com AV-FITC e negativas para a marcação com o IP. Por outro lado, as células que se apresentam positivas para as duas marcações significa que se encontram em apoptose tardia/necrose e as células que se encontram em necrose apresentam-se negativas para a marcação com AV-FITC e positivas para a marcação com o IP (tabela 2.2) (Gorman et al., 1997; Aubry et al., 1999).

Tabela 2.2 – Padrões de marcação com anexina-V e iodeto de propídeo para os diferentes grupos de células

Grupos	Anexina V	Iodeto de propídeo
Células vivas	-	-
Células em apoptose inicial	+	-
Células em apoptose tardia/necrose	+	+
Células em necrose	-	+

As células foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante retirado. O sedimento foi ressuspensão em PBS e lavado por centrifugação nas condições referidas anteriormente. O sedimento obtido foi processado de acordo com as instruções do kit de detecção de morte celular da Immunotech. O sedimento foi colocado em gelo e ressuspensão em 100µL de tampão de ligação frio, 1µL de AV-FITC (Kit Immunotech) e 5µL de IP (Kit Immunotech) durante 15 minutos na ausência de luz. Posteriormente, foi feita a detecção por citometria de fluxo utilizando um citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado com um laser de argón e os comprimentos

de onda de excitação de 525 e 640nm para a AV-FITC e para o IP, respectivamente. Os resultados são expressos em percentagem de células identificadas em cada uma das subpopulações e baseiam-se na positividade e/ou negatividade de marcação para a AV-FITC/IP.

2.2.5.2. Avaliação da produção intracelular de peróxidos

A expressão intracelular de peróxidos nas células submetidas a tratamento com AA foi determinada por citometria de fluxo através da oxidação intracelular da sonda não fluorescente DCFH₂-DA. Este composto lipossolúvel entra nas células e acumula-se principalmente no citosol, onde é desacetilado por esterases intracelulares a 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Este produto não fluorescente é oxidado na presença de peróxidos a 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), um composto que é facilmente visualizado pela emissão de fluorescência no comprimento de onda de 522nm quando excitada a 498nm (figura 2.2.). A fluorescência é proporcional à concentração de peróxidos intracelulares, nomeadamente do peróxido de hidrogénio (Tarpey et al., 2003; Dikalov et al., 2007).

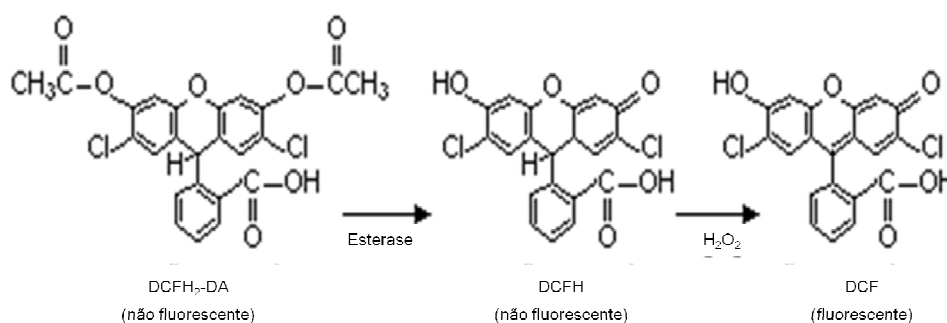


Figura 2.2. – Detecção de peróxidos intracelulares. O 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) entra nas células e acumula-se principalmente no citosol, onde é desacetilado por esterases intracelulares a 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Este produto é oxidado na presença de peróxidos a 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), um composto que é visualizado pela emissão de fluorescência no comprimento de onda de 522nm quando excitado a 498nm (adaptado de <http://media.wiley.com>)

Centrifugou-se uma suspensão celular com aproximadamente 10⁶ células a 1000 rpm durante 5 minutos, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se PBS para lavar. O sedimento foi ressuspenso em 100µL de PBS e foi incubado durante 45 minutos sem luz a 37°C com 5µL de DCFH₂-DA (Molecular probes, Invitrogen) dissolvido em dimetilformamida a 1mM de modo a obter a concentração final de 5µM. A suspensão foi lavada com PBS por centrifugação a 1000 rpm durante 5 minutos e ressuspenso em 400µL do mesmo. Posteriormente, foi feita a detecção por citometria de fluxo com uma excitação e emissão nos comprimentos de onda de 504 e 529nm, respectivamente. Os dados obtidos foram analisados em termos da média das intensidades de fluorescência (MIF) (Sarkar et al., 2005).

2.2.5.3. Avaliação da produção intracelular de radical superóxido

A avaliação da produção de radical superóxido foi efectuada por citometria de fluxo com recurso ao DHE. Este composto atravessa facilmente as membranas celulares e é convertido pelo radical superóxido a etídeo (figura 2.3), composto fluorescente de cor vermelha que se intercala no ADN permanecendo no interior da célula. Esta reacção é relativamente específica para o radical superóxido com oxidação mínima pelo peróxido de hidrogénio, peróxido de nitrito ou ácido hipocloroso (Zhao et al., 2005). Utilizaram-se aproximadamente 10^6 células obtidas após centrifugação de uma suspensão celular a 1000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento lavado uma vez com PBS. De seguida, o sedimento foi ressuspensão em $1000\mu\text{L}$ de PBS, adicionou-se $5\mu\text{L}$ de DHE (Sigma) dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1mM , de modo a obter uma concentração final de $5\mu\text{M}$. Incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente e sem luz. Após a incubação, a suspensão foi lavada com PBS por centrifugação a 1000rpm durante 5 minutos e ressuspensão em $400\mu\text{L}$ do mesmo tampão. A detecção foi efectuada utilizando o comprimento de onda de excitação de 620nm .

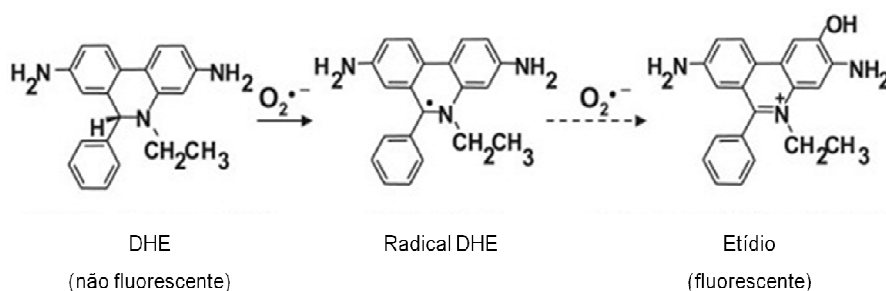


Figura 2.3. - Detecção de radical superóxido intracelular. O DHE é convertido pelo radical superóxido a etídeo, um composto fluorescente que se intercala no ADN (adaptado de Robinson et al., 2006)

2.2.5.4. Avaliação da expressão intracelular do glutatião reduzido

A análise da expressão do GSH, uma defesa antioxidante não enzimática, foi efectuada por citometria de fluxo utilizando o composto fluorescente alaranjado de mercúrio. Este composto mercurial liga-se estequiometricamente aos grupos sulfidril com formação de ductos fluorescentes. No entanto, este composto reage mais rapidamente com o GSH (reacção que ocorre em aproximadamente 5 minutos) do que com os grupos sulfidril das proteínas (tempo de reacção superior a 8 horas). Com base neste princípio, foi desenvolvida uma técnica que permite a determinação do GSH por citometria de fluxo utilizando o alaranjado de mercúrio, uma vez que o produto de reacção com o GSH emite uma intensa fluorescência vermelha quando excitado com um laser de árgon no comprimento de onda de 488nm (O'Connor et al., 1988). Para este efeito, aproximadamente 10^6 células foram centrifugadas com PBS durante 5 minutos a 1000rpm e posteriormente ressuspensas em 1mL do mesmo tampão. Seguidamente, as suspensões celulares foram incubadas durante 3 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz com $4\mu\text{L}$ de

alaranjado de mercúrio (Sigma-Aldrich), preparado em acetona a 10mM de modo a obter uma concentração final de 40 μ M. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 1000rpm durante 5 minutos e ressuspensas em 400 μ L do mesmo tampão. A detecção foi efectuada no comprimento de onda de excitação de 620nm.

2.2.5.5. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado usando uma sonda fluorescente, o JC-1. O potencial de membrana mitocondrial determina a captação selectiva do JC-1 pela mitocôndria. O JC-1 é um catião lipofílico que existe em duas formas, monómeros (M) e agregados (A), consoante o estado de polarização/despolarização da membrana mitocondrial, emitindo fluorescência a comprimentos de onda diferentes. Quando o potencial de membrana é elevado, forma agregados que emitem fluorescência vermelha (590nm). Por sua vez, à medida que o potencial de membrana mitocondrial diminui, ou em casos em que a membrana se encontra despolarizada, o JC-1 é excluído da mitocôndria e mantém-se no citoplasma sob a forma de monómeros que emitem fluorescência verde (529nm). Assim, a razão entre a fluorescência vermelha e verde (A/M), determinada por citometria de fluxo, fornece uma estimativa do potencial de membrana mitocondrial (Yao et al., 2008). Para este efeito, aproximadamente 10⁶ células foram centrifugadas com PBS durante 5 minutos a 1000 rpm e posteriormente ressuspensas em 1mL do mesmo tampão. Seguidamente, as suspensões celulares foram incubadas durante 15 minutos à temperatura de 37°C e ao abrigo da luz com 1 μ L de JC-1 (Molecular probes, Invitrogen), preparado em DMSO a 5mg/mL de modo a obter uma concentração final de 5mg/mL. Posteriormente, a suspensão foi novamente lavada com PBS e ressuspensa em 400 μ L do mesmo tampão. A detecção foi efectuada utilizando o comprimento de onda de excitação de 488nm. Os resultados obtidos são expressos como MIF para os agregados e para os monómeros, tendo-se calculado posteriormente a razão A/M.

2.2.5.6. Avaliação da expressão membranar dos transportadores de glicose

Para avaliar a expressão membranar dos transportadores GLUT1 e GLUT3, aproximadamente 10⁶ células WiDr e A-375 foram lavadas por centrifugação com PBS durante 5 minutos a 1000 rpm. Posteriormente, as células foram marcadas com 1 μ g de anticorpo monoclonal anti-GLUT-1-PE (PE, ficoeritrina) (R&D Systems) e com 1 μ g de anticorpo monoclonal anti-GLUT-3 puro (R&D Systems) durante 15 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após incubação, as células marcadas com o anticorpo monoclonal anti-GLUT1-PE foram lavadas com PBS por centrifugação a 1000 rpm durante 5 minutos e ressuspensas em 400 μ L do mesmo tampão. Estas células foram guardadas a 4°C até aquisição no citómetro de fluxo. As células marcadas com o anticorpo anti-GLUT-3 puro foram lavadas com PBS por centrifugação a 1000 rpm durante 5 minutos e seguidamente marcadas com um 1 μ g de anticorpo secundário conjugado com

PE (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) durante 20 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após incubação, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 100 rpm durante 5 minutos e ressuspensas em 400µL do mesmo tampão. Posteriormente, todas as células foram analisadas no citómetro e os resultados obtidos são expressos como MIF.

2.3. Estudos *in vivo*

Uma vez que os estudos *in vitro* são realizados num ambiente controlado, os resultados podem não corresponder aos obtidos num organismo vivo. Por este motivo, e sabendo que um tumor não é somente um conjunto de células tumorais mas sim um conjunto de células tumorais, células de suporte e as vias de drenagem vasculares associadas, é de extrema importância a realização de estudos *in vivo* para averiguar o papel da vitamina C no cancro. Para tal, foram utilizados ratinhos Balb/c e Balb/c nu/nu. Esta estirpe foi escolhida devido ao facto destes animais possuírem vesícula biliar, dado importante para a obtenção de informação sobre a biodistribuição do composto. Por outro lado, os ratinhos Balb/c nu/nu permitem o desenvolvimento de xenotransplantes uma vez que são animais atímicos e, portanto, deficientes em células T¹. Os estudos *in vivo* permitiram obter informação sobre as vias de metabolização e excreção, assim como os órgãos-alvo do ^{99m}Tc-AA.

2.3.1. Biodistribuição em animais normais

Para a realização dos estudos de biodistribuição em animais normais foram utilizados ratinhos *Balb-c* com um peso corporal no intervalo 21–29g. Os ratinhos foram anestesiados com uma solução de ketamina a 77% (KetalarR, Porke-Davis) e clorpromazina a 23% (LargactilR, Laboratórios Vitoria) por via subcutânea e, posteriormente, o ^{99m}Tc-AA foi injectado intravenosamente na veia dorsal da cauda com uma actividade de cerca de 1,64MBq sobre o animal colocado sobre o colimador de uma câmara-gama. Após a administração do radiofármaco, os ratinhos foram sacrificados por deslocamento cervical de acordo com a legislação em vigor aos 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300 e 360 minutos. Em cada tempo fez-se a colheita de vários órgãos (coração, pulmão, tiróide, vesícula biliar, fígado, baço, estômago, intestino delgado, intestino grosso, genitais, bexiga, cérebro e cerebelo), assim como de alguns tecidos (cartilagem, músculo, osso e sangue) e fluidos de excreção (bílis e urina). Cada órgão, tecido ou fluido, depois de medida a sua massa em gramas, foi colocado num tubo de radioimunoensaio (RIA) e contado num contador de poço para obter as CPM. Com os valores das CPM assim obtidas, e após

¹ As células-T pertencem a um grupo de glóbulos brancos do sangue. São os principais efectores da imunidade celular e são produzidos no timo a partir de precursores indiferenciados da medula óssea.

conversão para actividade, calculou-se a percentagem de radiofármaco $^{99m}\text{Tc-AA}$ administrado por grama de órgão/tecido/fluido (% dose injectada/grama), de acordo com a equação 2.10. Foi também seguido o mesmo procedimento em dois ratinhos Balb/c nu/nu para verificar se os valores obtidos diferem ou não entre animais com e sem sistema imunitário.

$$\% \text{ dose injectada/g} = \frac{CPM_{\text{totais do órgão}}/massa_{\text{órgão}}}{CPM_{\text{actividade total administrada}}} \times 100 \quad (\text{equação 2.10})$$

2.3.2. Biodistribuição em animais com xenotransplantes

Para a realização da biodistribuição em animais com xenotransplantes, inoculámos 8×10^6 células WiDr no cavado axilar direito de ratinhos Balb/c nu/nu. Esta zona tem várias vantagens no que diz respeito ao desenvolvimento de xenotransplantes, sendo de salientar o facto de ser contra lateral ao coração, ficar longe do fígado, do rim e da bexiga, evitando assim a sobreposição imagiológica com as projecções das áreas cardíaca, hepática, renal ou vesical. Por outro lado, é uma boa área para expansão e apresenta boa vascularização, o que permite um desenvolvimento rápido do xenotransplante. Para os estudos de biodistribuição realizados em ratinhos *Balb/c nu/nu* portadores de xenotransplantes, adoptou-se um protocolo semelhante ao dos estudos com ratinhos normais *Balb/c*. No entanto, para além dos órgãos/tecidos/fluidos colhidos já referidos anteriormente, cada tumor foi excisado, pesado, contado em contador de poço e calculado o seu volume através da equação 2.11:

$$V = \frac{L_T \times S^2}{2} \quad (\text{equação 2.11})$$

onde L_T corresponde ao diâmetro maior do tumor e S ao diâmetro menor (Dagrosa et al., 2003). Para além da determinação da percentagem de dose injectada/grama, foram calculadas as razões tumor/osso e tumor/sangue, que consistem na razão entre a % de dose injectada/grama do tumor e a % de dose injectada/grama do osso e do sangue.

2.3.3. Imagiologia

A imagiologia com $^{99m}\text{Tc-AA}$ permite visualizar os órgãos, tecidos e fluidos que captam mais o radiofármaco, fornecendo assim uma importante informação funcional. Desta forma, após a anestesia segundo o protocolo atrás referido, os ratinhos foram injectados com cerca 1.64MBq de $^{99m}\text{Tc-AA}$ na veia dorsal da cauda. Posteriormente, iniciou-se a aquisição dinâmica através de uma câmara-gama (GE 400 AC) colimada com um colimador de buracos paralelos de alta resolução e baixa energia para um computador de aquisição GenieAcq que a controla. A imagem dinâmica foi realizada com o intuito de confirmar a entrada do radiofármaco na circulação sanguínea do ratinho. A aquisição dinâmica durou 5 minutos com frames de 2 em 2 segundos e com uma matriz de

128×128pixels e zoom 2×. Após a aquisição das imagens dinâmicas procedeu-se à aquisição das imagens estáticas para matrizes de 256×256pixels com duração individual de 2 minutos e igualmente com zoom 2× aos 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos após a administração do $^{99m}\text{Tc-AA}$. Depois de adquiridas as imagens estáticas, estas foram transferidas para uma estação de processamento Xeleris para posterior processamento e análise. Sabendo-se que normalmente a acumulação de tecnécio livre se dá ao nível da tiróide, do estômago e dos plexos coroideus e que, por sua vez, a acumulação de tecnécio reduzido e hidrolizado se verifica ao nível do fígado e do baço, tornou-se possível inferir e comprovar os valores da pureza radioquímica do $^{99m}\text{Tc-AA}$ obtidos por HPLC.

2.3.4. Terapia

Com o objectivo de verificar a redução da taxa de crescimento tumoral após a injeção diária de AA em ratinhos, foi desenvolvida uma metodologia que permitisse constatar *in vivo* o papel da vitamina C na doença oncológica. Para tal, foram inoculadas 8×10^6 células WiDr no dorso de ratinhos Balb/c nu/nu e, durante alguns dias, o peso corporal do ratinho e o tamanho do tumor foram monitorizados diariamente. A injeção das células foi feita no dorso do animal de forma a facilitar a sua monitorização diária, uma vez que é um local de mais fácil acesso do que o cavaco axilar. Foi também dada especial atenção ao comportamento e ao estado de saúde geral dos ratinhos. Quando o volume tumoral atingiu os $300\text{--}500\text{mm}^3$, foi diariamente injectada intraperitonealmente uma solução aquosa de AA com uma concentração de 150mg/kg durante 12 dias, tendo sido a monitorização diária feita de igual forma. Após o término da terapia, os ratinhos foram mortos por deslocamento cervical e, posteriormente, os tumores foram excisados e submetidos à análise por citometria de fluxo.

2.4. Estudos ex vivo

Os estudos *ex vivo* permitem analisar determinadas amostras sob condições controladas que pretendem minimizar a alteração das condições naturais. Assim, através da citometria de fluxo, procedeu-se a uma avaliação da morte celular semelhante à realizada *in vitro* de forma a caracterizar o ambiente tumoral.

2.4.1. Isolamento das células tumorais

Após a excisão do tumor dos ratinhos, este foi fragmentado e colocado numa solução com colagenase IV (Gibco 17104-019) em tampão HEPES (5mg/mL) a 37°C, e submetido a agitação suave durante 10 minutos para ocorrer a sua desagregação. O homogeneizado obtido foi filtrado através de um filtro de 30µm, centrifugado a 500 rpm à temperatura de 19°C e retirado o

sobrenadante. Posteriormente, o *pellet* obtido foi ressuspensão em 5mL de DMEM e centrifugado, tendo-se repetido este procedimento três vezes com o objectivo de remover a colagenase IV. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 5mL de DMEM.

2.4.2. Citometria de fluxo

As células obtidas no procedimento anterior foram analisadas recorrendo à citometria de fluxo de acordo com a metodologia já referida anteriormente, no sentido de inferir acerca das alterações do microambiente tumoral. Para tal, determinou-se a morte celular através do método da AV-FITC/IP.

2.5. Análise estatística

Para aumentar o rigor da interpretação dos resultados obtidos através dos procedimentos anteriormente descritos, fizemos a análise estatística dos mesmos. Para tal, utilizámos uma aplicação de tratamento estatístico de dados, o SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 16. Em todos os estudos foram utilizados testes não paramétricos, visto que as amostras de dados são reduzidas e não seguem uma distribuição normal. Em casos em que se pretendia fazer a comparação de valores emparelhados, isto é, por exemplo duas variáveis (por exemplo, AA e DHA) ao longo do tempo, utilizámos o teste de Wilcoxon. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar duas amostras independentes (por exemplo, uma determinada concentração com o controlo) dentro da mesma variável (por exemplo, o tempo). Por outro lado, para comparar os resultados de três ou mais amostras relacionadas, usámos o teste da variância bivariado de Friedman.

Capítulo III

Resultados

3.1. Estudos de química

3.1.1. Marcação radioactiva da vitamina C

Após várias tentativas no sentido de otimizar o processo de marcação radioactiva da vitamina C, a eficiência de marcação atingiu o seu máximo utilizando 200mg de AA com 222MBq de pertecnetato em 1,5mL de cloreto de sódio a 0,9%, 0,2 mL de cloreto de ferro III 0,1N em ácido clorídrico 0,1N (agente redutor) e acertando o pH a valores entre 6,5-7,0 com uma solução de hidróxido de sódio numa concentração a 1M. Todo o processo de marcação decorreu em atmosfera de árgon e protegida da luz.

3.1.2. Controlo de qualidade

Após a marcação radioactiva da vitamina C procedeu-se à avaliação da pureza radioquímica do complexo formado pela técnica HPLC. Para tal, procedeu-se a uma detecção prévia das componentes não-radioactivas do preparado: AA e cloreto de ferro III (figura 3.1A e figura 3.1B) respectivamente) que, sendo detectadas por UV, não estão presentes no mesmo cromatograma do complexo marcado. Paralelamente, efectuou-se também a detecção por radioactividade do pertecnetato de sódio, como apresentado na figura 3.1C. Os cromatogramas obtidos das amostras padrão permitem-nos, através da comparação com o cromatograma obtido após injeção no sistema de HPLC do complexo marcado, identificar as componentes presentes no radiofármaco através dos respectivos picos.

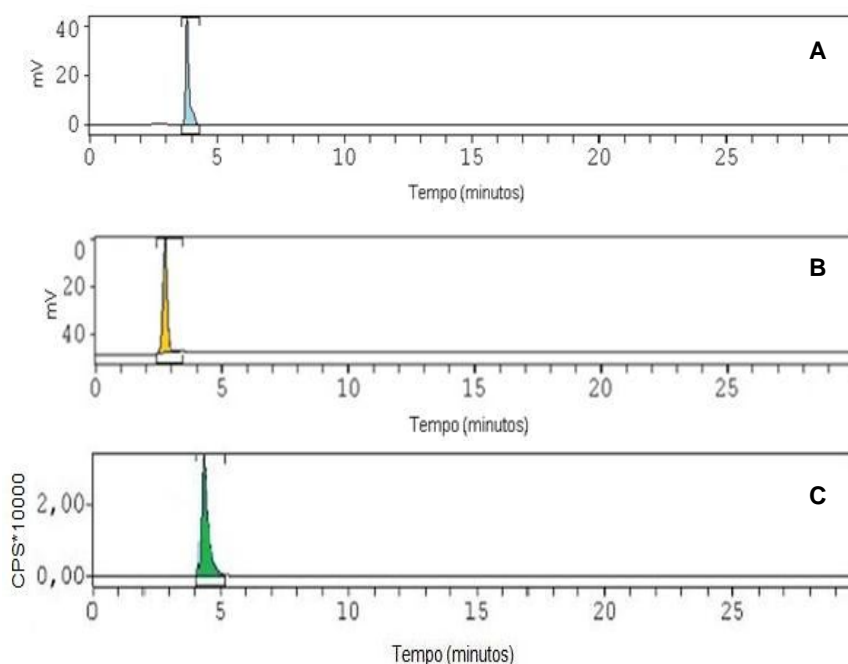


Figura 3.1 – Cromatogramas das amostras padrão. (A) AA 10mM; (B) cloreto de ferro III 0.1N; (C) pertecnetato de sódio. As amostras foram injectadas no HPLC e foi determinado o tempo de retenção de cada uma por integração gráfica.

Através destes cromatogramas obtiveram-se os tempos de retenção de cada uma das amostras padrão, bem como o tempo de retenção do $^{99m}\text{Tc-AA}$, sumariados na tabela 3.1. Por comparação com os cromatogramas das amostras padrão foi possível determinar um valor de 3.05 ± 0.12 minutos para o tempo de retenção do $^{99m}\text{Tc-AA}$, assim como a sua eficiência de marcação.

Tabela 3.1 – Tempos de retenção das amostras padrão e do radiofármaco $^{99m}\text{Tc-AA}$. Os valores referentes às amostras padrão representam a média de três injeções no HPLC, enquanto o valor para o $^{99m}\text{Tc-AA}$ resulta da média de quatro formulações farmacêuticas escolhidas aleatoriamente.

Composto	Tempo de retenção (minutos)	Tipo de detecção
AA	$3,85 \pm 0,03$	UV
Cloreto de ferro III	$2,75 \pm 0,01$	UV
Tecnécio livre	$4,36 \pm 0,03$	Radioactividade
$^{99m}\text{Tc-AA}$	$3,05 \pm 0,12$	Radioactividade

Através da integração gráfica e da normalização das áreas dos picos do $^{99m}\text{Tc-AA}$ e do tecnécio livre, os únicos componentes a serem registados no detector de radioactividade, pode obter-se directamente a partir do programa Gina-Star o valor da eficiência de marcação (ver equação 2.1). A figura 3.2 representa os cromatogramas dos compostos não radioactivos (A) e radioactivos (B) de uma formulação com uma reduzida eficiência de marcação de 75%; podem observar-se os tempos de retenção dos diferentes compostos radioactivos presentes no complexo, distinguindo-se claramente o $^{99m}\text{Tc-AA}$ e o tecnécio livre. Os compostos não radioactivos e radioactivos estão representados na figura 3.2A e figura 3.2B, respectivamente.

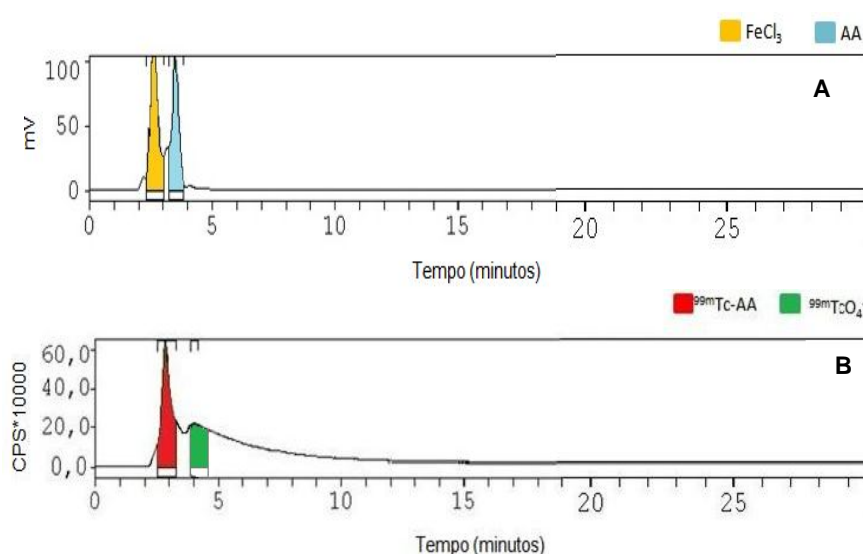


Figura 3.2 - Cromatogramas de uma formulação com uma baixa eficiência de marcação de 75%. Cromatograma dos compostos não radioactivos (A) e radioactivos (B).

A figura 3.3 representa os cromatogramas de uma formulação farmacêutica com elevada eficiência de marcação de 99,03%: compostos não radioactivos (A) e radioactivos (B). A partir da figura 3.3B, relativo aos compostos radioactivos detectados, pode observar-se que a área respeitante ao tecnécio livre diminuiu bastante em relação à figura 3.2B, aumentando assim a percentagem atribuída à integração gráfica do $^{99m}\text{Tc-AA}$, o que se traduz numa maior eficiência de marcação.

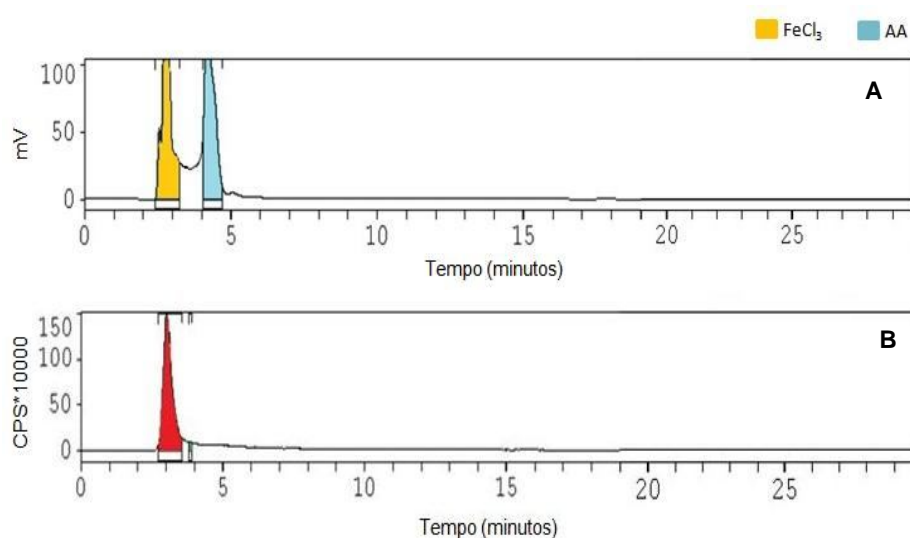


Figura 3.3 - Cromatogramas de uma formulação com uma elevada eficiência de marcação de 99.03%. Cromatograma dos compostos não radioactivos (A) e radioactivos (B).

Os valores da eficiência de marcação do AA obtidos através do HPLC aos 0, 30, 60, 180, 240 e 360 minutos estão sumariados na tabela 3.2. Da análise dos diversos resultados obtidos podemos verificar que a eficiência de marcação se manteve elevada e aproximadamente constante ao longo do tempo, o que revela a elevada estabilidade da formulação desenvolvida. Note-se que a maior eficiência de marcação foi alcançada após seis horas, sendo ainda de ressaltar que a eficiência de marcação se manteve sempre acima de 95% durante todos os tempos em que foi realizado o controlo de qualidade. Relativamente à determinação do pH, verificou-se que ao longo do tempo este se mantinha entre os valores de 6,5 e 7,0.

Tabela 3.2 – Eficiência de marcação e pH do $^{99m}\text{Tc-AA}$ ao longo de seis horas. Cada valor para a eficiência de marcação resulta da média obtida de quatro formulações radiofarmacêuticas escolhidas aleatoriamente em cada tempo.

Tempo (minutos)	0	30	60	180	240	360
Eficiência de marcação (%)	97,46 ± 1,48	95,76 ± 2,49	97,26 ± 1,39	96,97 ± 2,19	97,72 ± 1,30	98,36 ± 1,07
pH	6,5 - 7	6,5 - 7	6,5 - 7	6,5 - 7	6,5 - 7	6,5 - 7

Para avaliarmos as características do desempenho do método de HPLC, desenvolvido em condições experimentais definidas de forma a garantir a sua aplicabilidade ao nível do intervalo de concentrações e tipo de amostras consideradas, procedemos à determinação da sua selectividade, eficiência, resolução e linearidade (ver equações 2.2, 2.3, 2.4 e 2.5). A selectividade (α) foi calculada a partir dos tempos de retenção do AA (t_{R1}) e do cloreto de ferro III (t_{R2}), resultando num valor de 1,4.

$$\alpha = \frac{t_{R1}}{t_{R2}} = \frac{3,85}{2,75} = 1,4$$

Por outro lado, o cálculo da eficiência ($HETP_{AA}$) implicou o conhecimento prévio da largura do pico do AA ($w_{AA}=0,6$ minutos), sendo a largura do pico obtida a partir da distância das duas intersecções dos extremos do pico com a linha basal do cromatograma obtido por detecção UV. Assim, sabendo o tempo de retenção (t_{R1}) e a largura do pico do AA, foi possível calcular o número de pratos teóricos da coluna ($N_{AA}=658,78$), ou seja, o número de secções imaginárias em que se assume que a coluna está dividida. Posteriormente, calculou-se a eficiência da coluna através da razão entre o comprimento da coluna utilizada (20cm) e o número de pratos teóricos da coluna, resultando numa eficiência de 0,030. Foi também calculada a eficiência utilizando o tempo de retenção (t_{R2}) e a largura do pico do cloreto de ferro III ($w_{FeCl_3}=0,6$ minutos), resultando num valor de 0,059.

$$N_{AA} = 16 \left(\frac{t_{R1}}{w_{AA}} \right)^2 = 16 \left(\frac{3,85}{0,6} \right)^2 = 658,78$$

$$HETP_{AA} = \frac{L}{N_{AA}} = \frac{20}{658,78} = 0,030$$

$$N_{FeCl_3} = 16 \left(\frac{t_{R2}}{w_{FeCl_3}} \right)^2 = 16 \left(\frac{2,75}{0,6} \right)^2 = 336,11$$

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

A resolução do sistema (R) foi calculada através dos tempos de retenção do AA (t_{R1}) e do cloreto de ferro III (t_{R2}), assim como da largura dos seus picos (w_{AA} e w_{FeCl_3}), resultando num valor de 1,83.

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{AA} + w_{FeCl3}} = \frac{2(3,85 - 2,75)}{0,6 + 0,6} = 1,83$$

Pela análise da curva analítica obtida para o sistema de HPLC, podemos verificar que este possui uma resposta linear que segue a equação $y=85,17x+4,7927$, tendo um coeficiente de correlação igual a 0,9988.

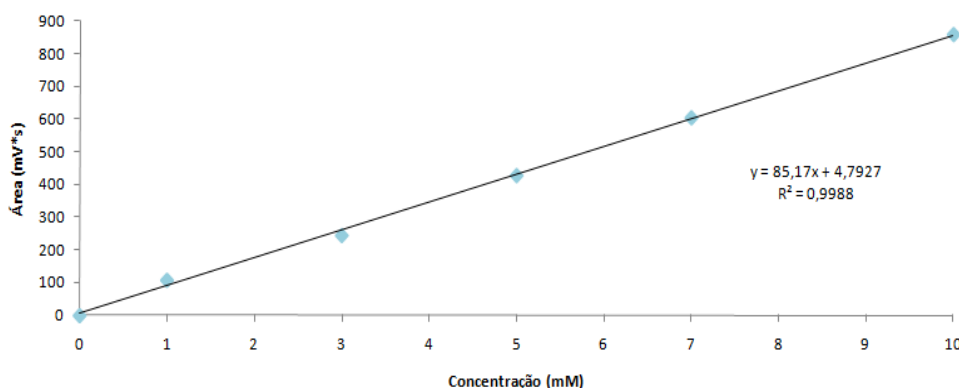


Figura 3.4 – Curva analítica do sistema de HPLC. A curva analítica do sistema foi obtida após injeção no sistema de cinco amostras de AA com as concentrações de 1, 3, 5, 7 e 10mM e a obtenção da respectiva área do pico

3.2. Estudos in vitro

3.2.1. Estudos de captação e determinação da viabilidade celular

Nos estudos de captação efectuados, começámos por comparar a percentagem de captação de $^{99m}\text{Tc-AA}$ e de tecnécio livre numa actividade de 0,925MBq/mL nas células WiDr e A-375. Pelos resultados evidenciados na figura 3.5, a percentagem de captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ nas WiDr é inferior à do tecnécio livre ao longo do tempo, excepto aos 5 e aos 120 minutos (no entanto esta inversão não é muito significativa). Ao longo do tempo, o $^{99m}\text{Tc-AA}$ tem o mesmo perfil do tecnécio livre, sendo que o seu pico de captação ocorre aos 120 minutos com um valor de 0,45%, enquanto o do tecnécio livre ocorre aos 60 minutos com um valor 0,64% (ver equação 2.6). Como evidenciado na figura, os valores de captação encontrados para o $^{99m}\text{Tc-AA}$ não diferem significativamente dos valores obtidos para o tecnécio livre, sendo que a captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ pelas WiDr apresenta-se sempre muito baixa com valores no intervalo de 0,36 a 0,45%. Através da análise estatística verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo nas WiDr, sendo que a tendência é para que as diferenças ocorram entre os 15 e os 30, 60 e 120 minutos, assim como entre os 30 e os 60 e 120 minutos, no sentido de os valores diminuírem ao longo do tempo.

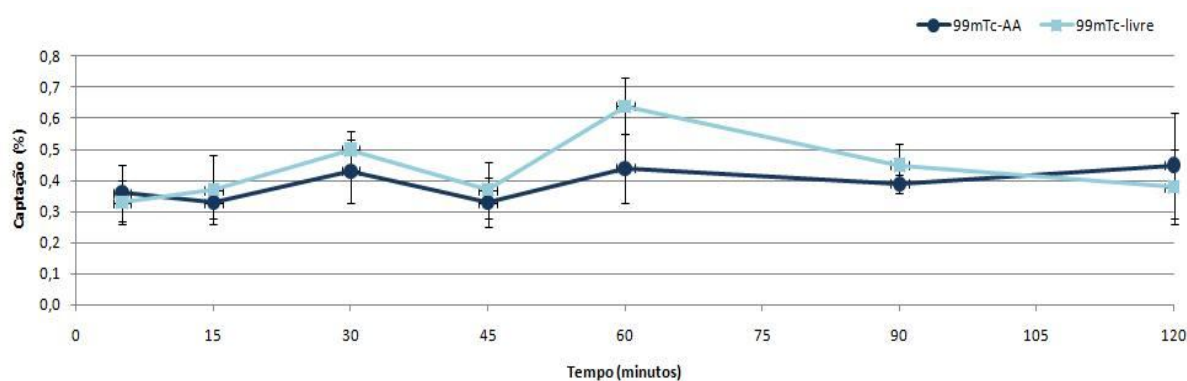


Figura 3.5 – Captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ e do tecnécio livre pelas WiDr ao longo do tempo. As células WiDr foram incubadas com 0,925MBq/mL e foi posteriormente determinada a percentagem de captação do complexo marcado por estudos de influxo. Os dados expressam a média de seis experiências independentes.

No que diz respeito às A-375, ao contrário das WiDr, a captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ é superior à do tecnécio livre, excepto aos 5 e aos 15 minutos, como se mostra na figura 3.6. De notar que aos 90 minutos a captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ é semelhante à do tecnécio livre (0,26 e 0,25%, respectivamente). Verificamos que aos 45, 60 e 120 minutos existem diferenças consideráveis entre a captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ e do tecnécio livre, ocorrendo o pico de captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ aos 120 minutos com um valor de 0,36%, bem como o do tecnécio livre com um valor de 0,26%. A captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ pelas A-375 ao longo do tempo toma valores no intervalo de 0,22 a 0,36%. De notar que, através da análise estatística, se verificou que não existem diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo.

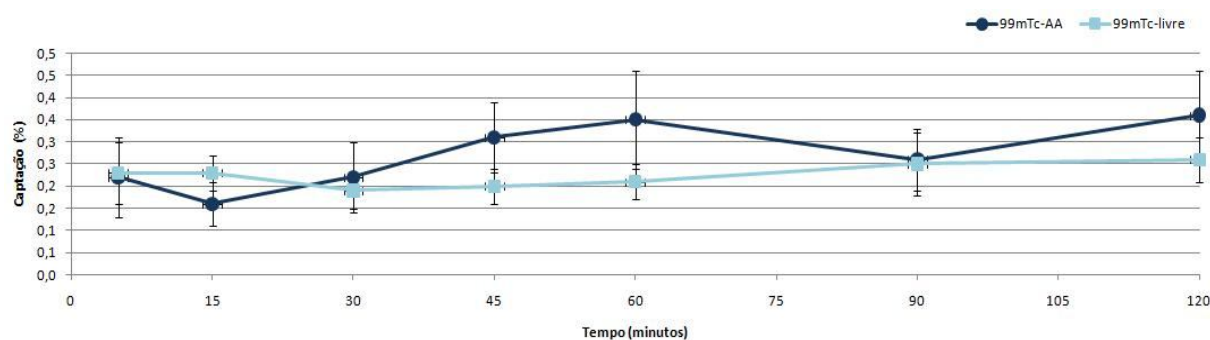


Figura 3.6 – Captação de $^{99m}\text{Tc-AA}$ e do tecnécio livre pelas A-375 ao longo do tempo. As células A-375 foram incubadas com 0,925MBq/mL e foi posteriormente determinada a percentagem de captação do complexo marcado por estudos de influxo. Os dados expressam a média de seis experiências independentes.

Na figura 3.7 pode observar-se que as WiDr captam mais $^{99m}\text{Tc-AA}$ do que as A-375, excepto aos 45 minutos em que a captação é semelhante. No entanto, este facto apenas é estatisticamente significativo aos 15, 45, 60 e 120 minutos. Por outro lado, é de notar que ambas as linhas celulares têm o mesmo perfil ao longo do tempo, excepto no intervalo entre os 30 e os 45 minutos. O pico de captação das WiDr e das A-375 ocorre aos 120 minutos e tem o valor de 0,45% e 0,36%, respectivamente. De notar que, comparando a captação de $^{99m}\text{Tc-AA}$ das duas linhas celulares com a captação do tecnécio livre, observa-se que estas possuem um diminuída captação do

radiofármaco. Em relação à viabilidade celular, avaliada ao fim dos 120 minutos após a adição às células do radiofármaco desenvolvido, esta foi realizada recorrendo ao método de exclusão do azul tripano e os resultados mostraram uma viabilidade celular sempre acima do 93% para ambas as linhas celulares utilizadas neste estudo (ver equação 2.7).

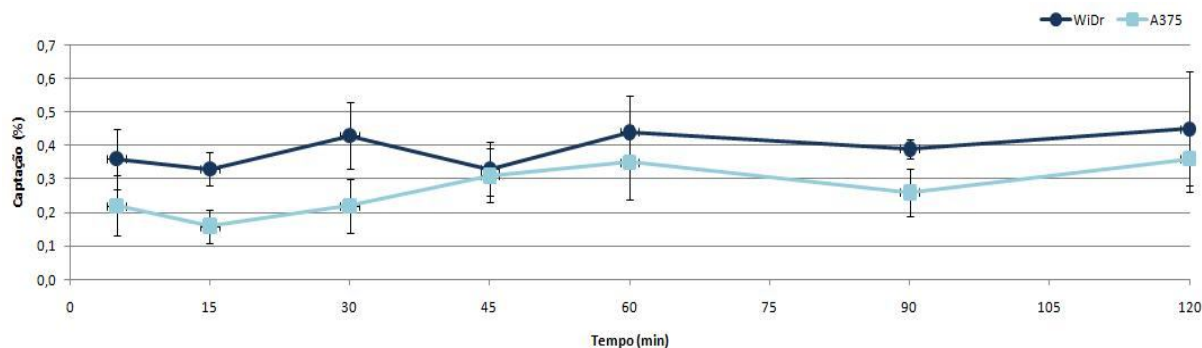


Figura 3.7 – Captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ ao longo do tempo em duas linhas celulares distintas. As células WiDr e A-375 foram incubadas com 0925MBq/mL e foi posteriormente determinada a percentagem de captação do complexo marcado por estudos de influxo. Os dados expressam a média de seis experiências independentes.

3.2.2. Determinação da proliferação e sobrevivência celular

3.2.2.1. Avaliação da proliferação celular por espectrofotometria

Para avaliarmos os efeitos biológicos da vitamina C em células WiDr e A-375, analisámos o efeito da forma reduzida da vitamina C em diferentes concentrações (no intervalo de 0.05-50mM) e para diferentes períodos de tempo de incubação e de repouso na proliferação das células recorrendo ao método de MTT (ver tabela 2.1.). A figura 3.8A representa a resposta farmacológica das WiDr após 1 e 4 horas de exposição ao AA com 24 horas de repouso celular. Por outro lado, a figura 3.8B representa a resposta farmacológica das WiDr após 1 e 4 horas de exposição ao AA com 48 horas de repouso celular. Ao controlo, que constitui o termo de comparação, foi atribuído o valor de 100%. Os dados obtidos, após tratamento num software dedicado, permitiram-nos calcular a concentração que inibe 50% da proliferação celular (IC_{50}) através da equação das curvas ajustadas aos dados experimentais das figuras representadas. Assim, como se pode observar na figura 3.8A, a exposição das WiDr ao AA durante 1 hora resulta num IC_{50} igual a 22,73mM, enquanto a exposição durante 4 horas dá origem a um IC_{50} de 23,98mM ($p < 0,05$). Por outro lado, quando as células são expostas durante o mesmo tempo mas repousam 48 horas (figura 3.8B), o IC_{50} para 1 hora aumenta para 25,09mM, enquanto o IC_{50} para 4 horas diminui para 12,21mM (figura 3.8B). Como se pode observar na figura 3.8C, a exposição das células A-375 ao AA durante 1 hora resulta num IC_{50} igual a 2,42mM, enquanto a exposição durante 4 horas resulta num IC_{50} de 1,06mM, no caso para um tempo de repouso igual a 24 horas. Quando as células são expostas durante o mesmo tempo mas repousam 48 horas (figura 3.8D), o IC_{50} para 1 e para 4 horas mantém-se com o valor 2,42mM e 1,06mM, respectivamente. É de salientar que, comparando o

IC50 obtido com as WiDr com as A-375, as últimas atingem o IC50 mais rapidamente com concentrações muito inferiores de AA.

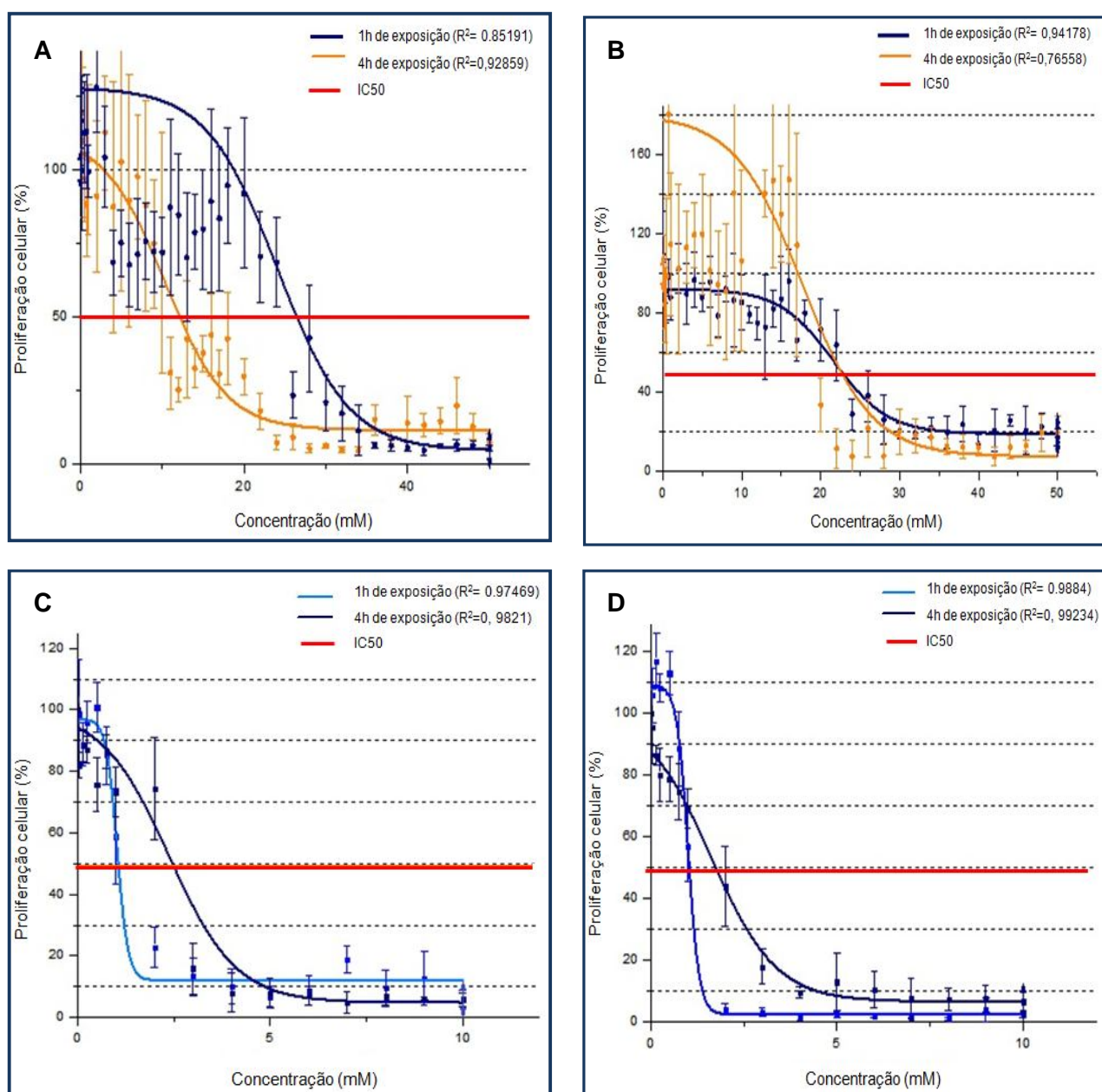


Figura 3.8 – Curva de dose-resposta das WiDr e das A-375 após exposição durante 1 e 4 horas ao AA. (A e B) as WiDr foram expostas ao AA durante 1 e 4 horas e, após 24 (A) e 48 (B) horas, calculou-se a proliferação celular; (C e D) as A-375 foram expostas ao AA durante 1 e 4 horas e, após 24 (C) e 48 (D) horas, calculou-se a proliferação celular. Os resultados expressam a média de seis experiências independentes.

3.2.2.2. Avaliação da sobrevivência celular através de ensaios clonogénicos

A técnica de MTT permite avaliar a capacidade proliferativa das células após a exposição ao AA não tendo as células, no entanto, um longo período de crescimento após a exposição ao fármaco. Desta forma, os ensaios clonogénicos são uma mais-valia para a avaliação da

citotoxicidade da vitamina C uma vez que permitem analisar os efeitos do AA nas células após um longo período de tempo (neste caso 10 dias) e averiguar o resultado final do fármaco sobre as células. Após a realização dos ensaios clonogénicos, pode observar-se na figura 3.9 que, à medida que aumentamos a concentração do AA, o factor de sobrevivência das duas linhas celulares diminui (ver equação 2.9). Quando as células são tratadas com uma concentração de 0.5mM, ocorre uma diminuição do factor de sobrevivência de 37.74% nas A-375 e de 44.88% nas WiDr. Nas concentrações de 2, de 3 e de 5mM, a redução do factor de sobrevivência é evidente, sendo sempre superior a 80% ($p < 0,05$); note-se que em todas estas concentrações as A-375 apresentam um menor factor de sobrevivência após a exposição ao AA do que as WiDr.

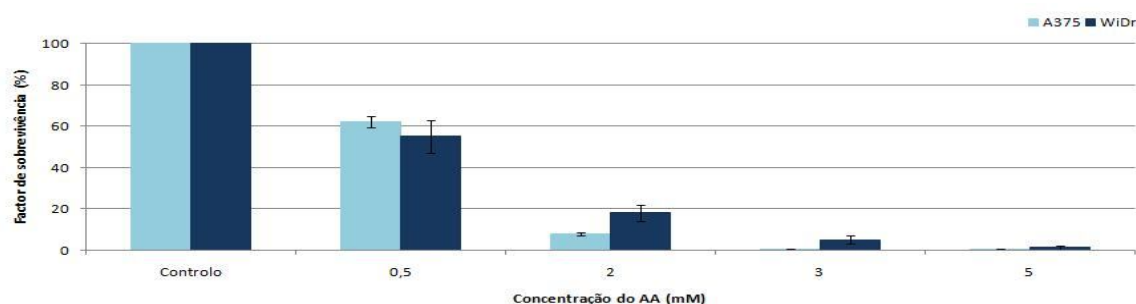


Figura 3.9 – Ensaio clonogénico. As células A-375 e WiDr foram expostas a diferentes concentrações de AA (0.5, 2, 3 e 5mM) e, posteriormente, foi visualizada a formação de colónias através do corante violeta de cristal. Os resultados expressam a média de três estudos independentes.

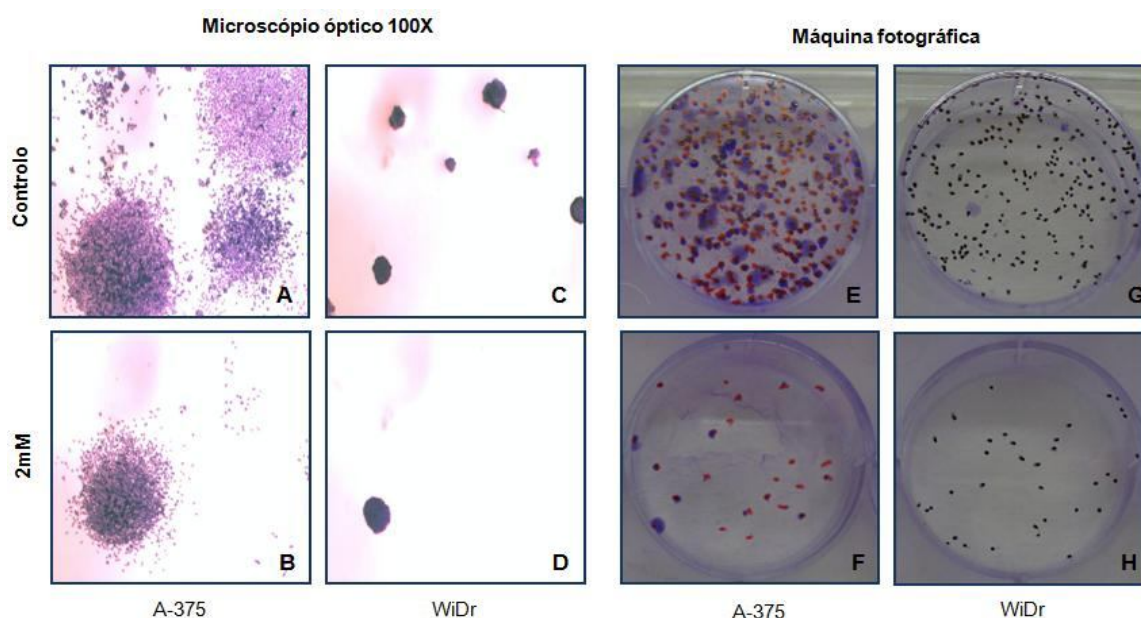


Figura 3.10 – Visualização das colónias celulares após a realização dos ensaios clonogénicos. As imagens A/E e C/G representam os controlos das A-375e das WiDr, respectivamente. As imagens B/F e D/H representam os poços cujas A-375 e WiDr, respectivamente, foram expostas a 2mM de AA. As colónias foram fotografadas através de um microscópio óptico com uma ampliação de 100x e directamente com uma máquina fotográfica.

Na figura 3.10 podemos observar a diferença entre o número de colónias formado no poço com células controlo (não expostas ao AA) de A-375 (A e E) e WiDr (C e G) e o número de colónias formadas após a exposição das mesmas células a 2mM de AA. As A-375 submetidas à exposição de 2mM de AA estão representadas em B e F, enquanto as WiDr estão representadas em D e H. Tanto nas imagens obtidas através do microscópio óptico, como nas obtidas directamente com uma máquina fotográfica, é possível verificar que as A-375, apesar de terem sido plaqueadas em igual número que as WiDr (500 células por poço), apresentam uma maior densidade de células por poço, tendo as suas colónias um aspecto muito diferente das colónias de WiDr. De notar ainda que o corante violeta de cristal cora as células de roxo e as imagens obtidas através da máquina fotográfica têm as colónias assinaladas a vermelho (A-375) e a preto (WiDr). Tal foi necessário para a obtenção de uma imagem através da máquina fotográfica que identifica-se claramente as colónias.

3.2.3. Citometria de fluxo

3.2.3.1. Avaliação da morte celular

A avaliação da viabilidade celular foi realizada por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação com AV-FITC e IP. Como referido anteriormente, esta técnica permite-nos distinguir diferentes populações celulares: células viáveis (V), células em apoptose inicial (A), células em apoptose tardia e necrose (AT/N) e células em necrose (N) (figura 3.11).

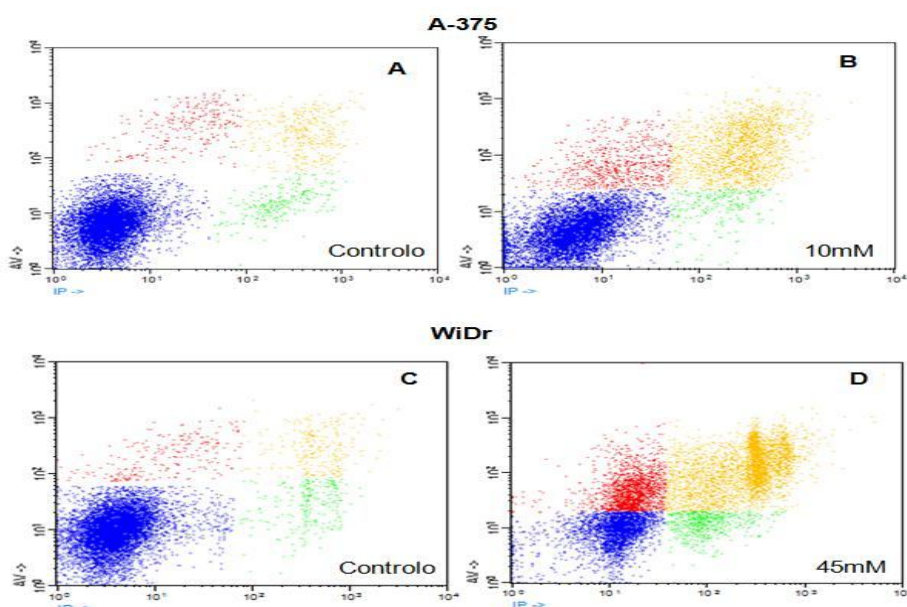


Figura 3.11 – Dot-plot representativo da marcação com anexina-V e iodeto de propídeo. As células A-375 (A e B) e WiDr (C e D) não tratadas (A e C) e tratadas (B e D) com AA durante 1 hora e deixadas a repousar durante 24 horas foram marcadas com AV/IP e analisadas por citometria de fluxo. Legenda de cores: azul - células viáveis; vermelho - células em apoptose inicial; amarelo – células em apoptose tardia e necrose; verde - células em necrose. Comparando as figuras das células não tratadas e tratadas, é notória a diminuição das células viáveis de A para B e de C para D, assim como o aumento do número de células em apoptose inicial, apoptose tardia/necrose e necrose.

Os estudos de citometria provam que, à medida que a concentração de AA aumenta, a morte celular nas WiDr também aumenta, como mostra a figura 3.12. Desta forma, o AA induz diminuição da viabilidade celular de forma dependente da dose. De notar que, na concentração de 45mM, a morte celular atinge os 60%, sendo 15% atribuída à apoptose inicial, 35% à apoptose tardia/necrose e 10% à necrose. No que diz respeito às A-375, os estudos de citometria revelam a inexistência de morte celular quando as células são tratadas com AA na concentração de 0.5 e de 2.5mM, sendo de notar que, mesmo quando as A-375 são expostas a 10mM de AA a morte celular apenas atinge os 25%.

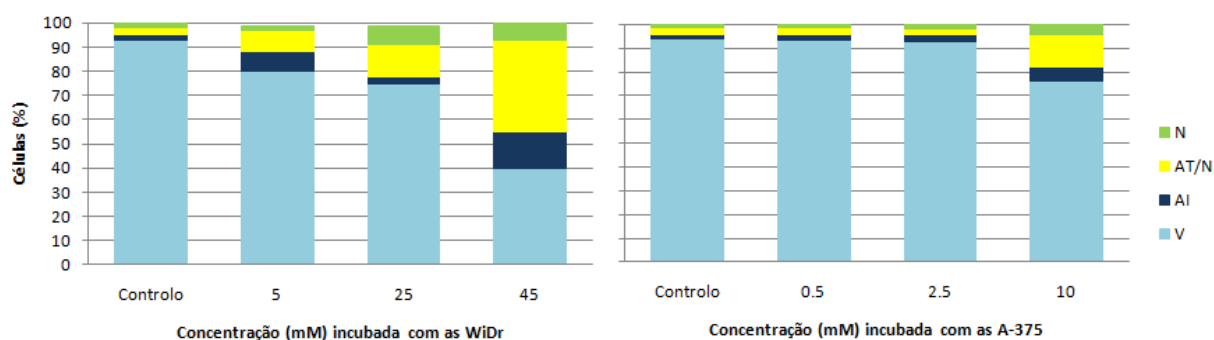


Figura 3.12 – Viabilidade celular por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação com anexina-V e iodeto de propídeo. Está representada a percentagem de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e em necrose (N), após tratamento com AA durante 1 hora e repouso durante 24 horas em WiDr (esquerda) e A-375 (direita). Os dados expressam a média de uma (WiDr) e duas (A-375) experiências independentes.

3.2.3.2. Avaliação da produção intracelular de peróxidos

Dada a importância que as ROS poderão ter nos mecanismos de citotoxicidade da vitamina C, procedeu-se à determinação da presença de peróxidos e de radical superóxido usando as sondas DCFH₂-DA e DHE, respectivamente. Como já referido anteriormente, a determinação de peróxidos é possível tendo em conta que o DCFH₂-DA entra na célula e, por acção das esterasas, é clivado originando o DCFH. Este composto, na presença de peróxidos origina o composto fluorescente DCF. Assim, quanto maior a produção de peróxidos, maior a intensidade de fluorescência desta molécula (figura 3.13). Como se pode observar na figura 3.14, apenas se verifica um ligeiro aumento da produção intracelular de peróxidos quando as WiDr são tratadas com 25mM de AA. Quando estas células são expostas a 45mM, a produção de peróxidos diminui (43% do controlo), factor que pode estar relacionado com a morte celular das células e, consequentemente, com a sua perda de capacidade para produzir ROS. Por outro lado, verifica-se que quando as A-375 são expostas a 0.5 e 10mM de AA, dá-se um pequeno aumento na produção intracelular de peróxidos, não sendo no entanto esta produção significativa quando comparada com o controlo. De notar que, comparando as células controlo WiDr e A-375, as células de melanoma melanocítico produzem muito mais peróxidos.

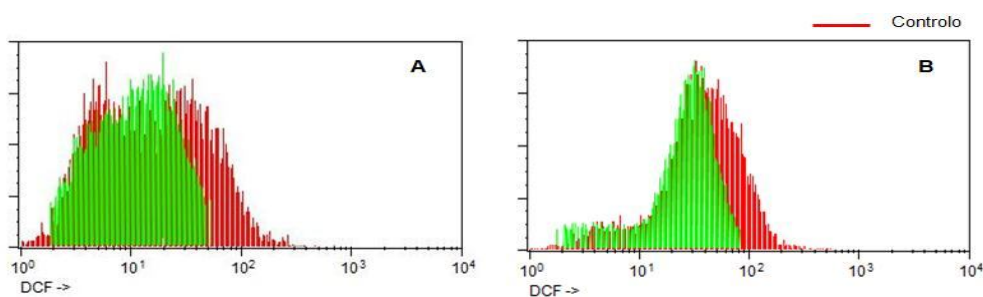


Figura 3.13 – Histogramas de expressão da marcação com DCFH₂-DA. As células WiDr (A) e A-375 (B) não tratadas (vermelho) e tratadas (verde) com AA durante 1 hora e deixadas a repousar durante 24 horas foram marcadas com DCFH₂-DA e analisadas por citometria de fluxo. O histograma verde corresponde às células WiDr (A) incubadas com 25mM de AA e às células A-375 (B) incubadas com 10mM de AA. A intensidade de fluorescência detectada a valores inferiores a 10 (eixo dos xx) não é considerada, uma vez que provém da auto-fluorescência celular. Por outro lado, os valores detectados superiores a 10 são representativos da marcação desejada.

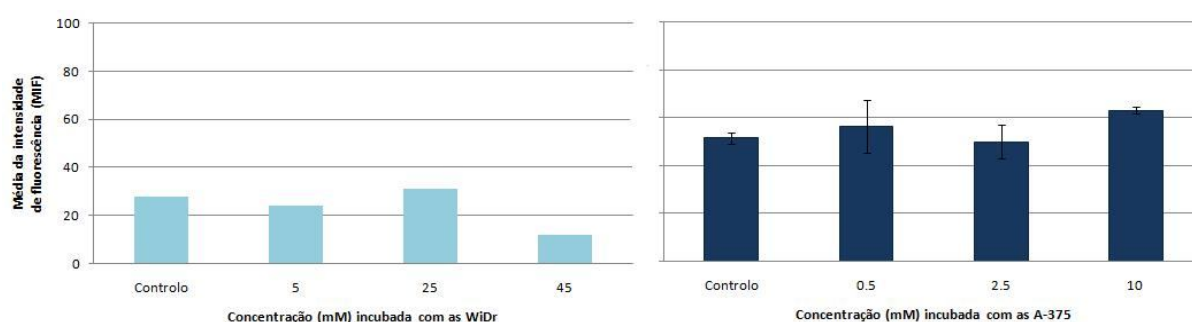


Figura 3.14 – Produção de peróxidos por citometria de fluxo recorrendo à marcação com DCFH₂-DA. As células (WiDr e A-375) foram tratadas com AA durante 1 hora e deixadas a repousar 24 horas, sendo posteriormente detectada a produção de peróxidos. Os resultados são expressos em termos da média de intensidade de fluorescência (MIF) e expressam a média de uma (WiDr) e duas (A-375) experiências independentes.

3.2.3.3. Avaliação da produção intracelular de radical superóxido

Para avaliarmos a produção do radical superóxido recorreremos à marcação com DHE e à análise das intensidades de fluorescência por citometria de fluxo. A partir da análise da figura 3.15 e 3.16 podemos verificar que, à medida que a concentração de AA aumenta para as WiDr, aumenta também a produção de radical superóxido, sendo este aumento muito acentuado quando as células são incubadas com 45mM (produção quatro vezes superior à do controlo, como realçado no figura 3.15). No que diz respeito às A-375, a produção de superóxido nas células tratadas não é muito diferente das células não tratadas. A maior produção de radical superóxido ocorre quando as A-375 são tratadas com 0.5 e 10mM, sendo no entanto a produção desta espécie reactiva apenas 64% e 73,4% superior ao controlo, respectivamente.

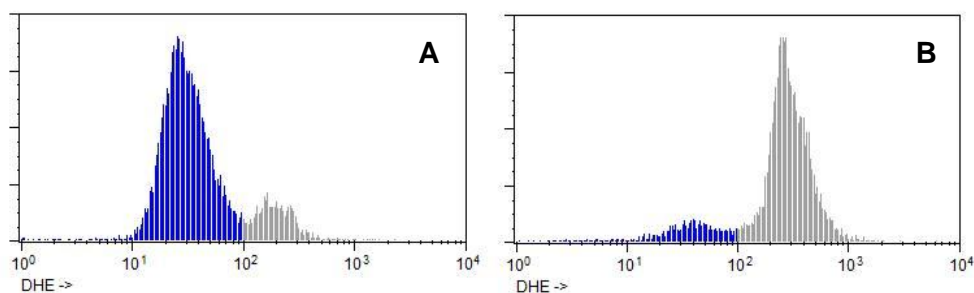


Figura 3.15 – Histogramas de expressão da marcação com DHE. As células WiDr não tratadas (A) e tratadas (B) com 45mM de AA durante 1 hora e deixadas a repousar durante 24 horas foram marcadas com DHE e analisadas por citometria de fluxo. As células detectadas para valores inferiores a 10 não são significativas, uma vez que a fluorescência detectada provém da auto-fluorescência celular. Por outro lado, os valores detectados superiores a 10 são representativos da marcação desejada.

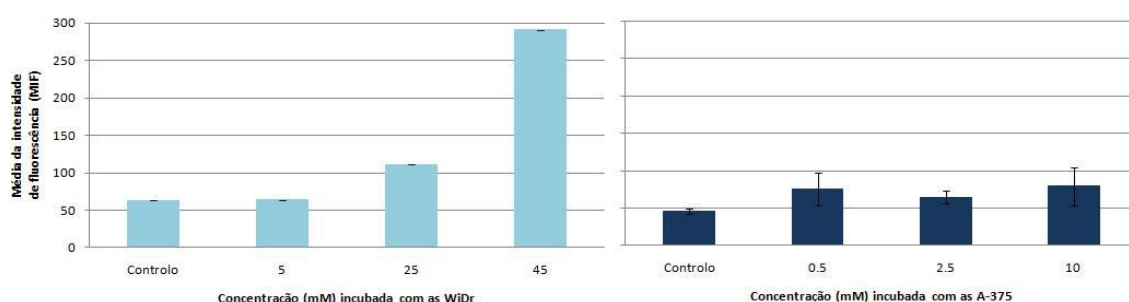


Figura 3.16 – Produção de radical superóxido por citometria de fluxo recorrendo à marcação com DHE. As células (WiDr e A-375) foram tratadas com AA durante 1 hora e deixadas a repousar 24 horas, sendo posteriormente detectada a produção de radical superóxido. Os resultados são expressos em termos da média de intensidade de fluorescência (MIF) e expressam a média de uma (WiDr) e duas (A-375) experiências independentes.

3.2.3.4. Avaliação da expressão intracelular de glutatião reduzido

Para avaliarmos a expressão intracelular de GSH recorremos a marcação com alaranjado de mercúrio e à análise das intensidades de fluorescência por citometria de fluxo (figura 3.17).

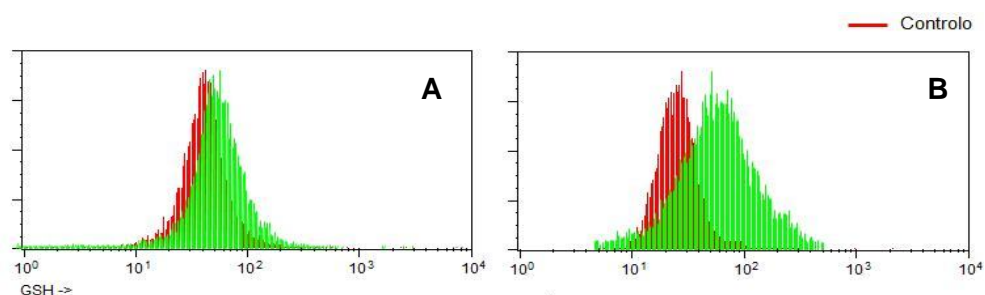


Figura 3.17 – Histogramas de expressão da marcação com alaranjado de mercúrio. As células WiDr (A) e A-375 (B) não tratadas (vermelho) e tratadas (verde) com AA durante 1 hora e deixadas a repousar durante 24 horas foram marcadas com alaranjado de mercúrio e analisadas por citometria de fluxo. O histograma a verde corresponde às células WiDr incubadas com 45mM de AA (A) e células A-375 incubadas com 10mM de AA (B). As células detectadas a valores inferiores a 10 não são significativas, uma vez que a fluorescência detectada provém da auto-fluorescência celular. Por outro lado, os valores detectados superiores a 10 são representativos da marcação desejada.

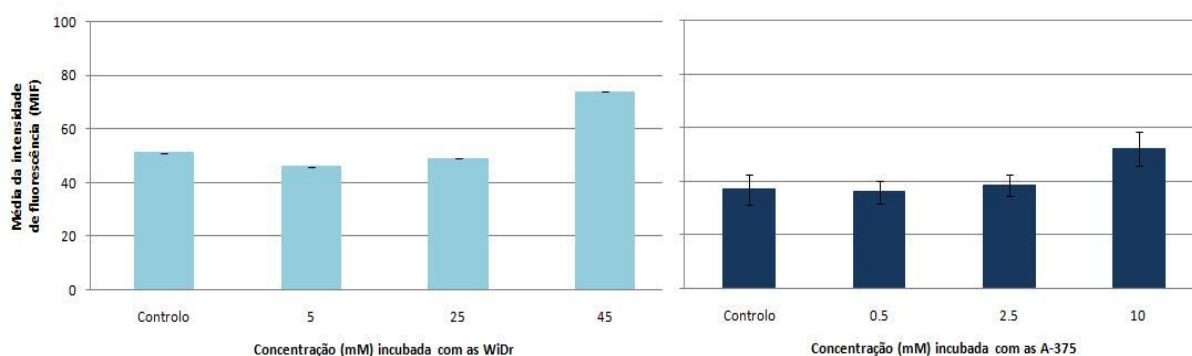


Figura 3.18 – Expressão intracelular de glutatião reduzido por citometria de fluxo recorrendo à marcação com alaranjado de mercúrio. As células (WiDr e A-375) foram tratadas com AA durante 1 hora e deixadas a repousar 24 horas, sendo posteriormente detectada a expressão intracelular de glutatião reduzido. Os resultados são expressos em termos da média de intensidade de fluorescência (MIF) e expressam a média de uma (WiDr) e duas (A-375) experiências independentes.

Pela análise da figura 3.18 podemos verificar que, quando as WiDr são incubadas com 5 e de 25mM, a expressão do GSH não sofre alterações significativas relativamente ao controlo. Por outro lado, quando são incubadas com 45mM, a expressão do GSH aumenta para 45% relativamente ao controlo. O mesmo acontece com as A-375 que, quando são incubadas com concentrações de 0.5 e 2.5mM, não expressam de forma diferente o GSH. No entanto, quando estas células são incubadas com 10mM, a expressão do GSH aumenta para 40% em relação ao controlo.

3.2.3.5. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Para avaliar a participação da mitocôndria nos efeitos biológicos da vitamina C, avaliou-se o potencial de membrana mitocondrial recorrendo à sonda fluorescente JC-1 (figura 3.19). Este fluorocromo é um catião lipofílico que entra selectivamente na mitocôndria e que existe na forma de monómeros (M) (fluorescência verde) e na forma de agregados (A) (fluorescência vermelha), dependendo do potencial de membrana mitocondrial. Assim, é emitida fluorescência que muda do vermelho para o verde quando as mitocôndrias despolarizam, ou seja, quando diminui o potencial de membrana mitocondrial. A figura 3.19 mostra a razão A/M nas células WiDr e A-375 tratadas com AA. Como podemos observar, ocorre uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial nas WiDr incubadas com AA em relação ao controlo, sendo no entanto esta diminuição mais relevante na concentração de 45mM (para ~29% do controlo). Nas A-375 ocorre também uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial quando as células são tratadas com 2.5 e de 10mM. De notar que o potencial de membrana mitocondrial é muito superior nas células controlo A-375 do que nas WiDr, sinal da sua maior capacidade proliferativa.

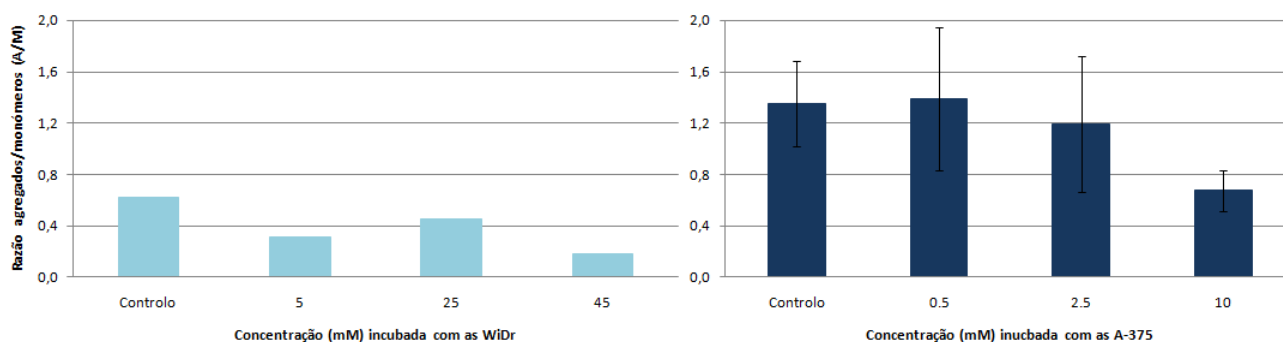


Figura 3.19 – Análise do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo recorrendo à sonda fluorescente JC-1. As células (WiDr e A-375) foram tratadas com AA durante 1 hora e deixadas a repousar 24 horas, sendo posteriormente detectada o potencial de membrana mitocondrial. Os resultados são expressos em termos da média de intensidade de fluorescência (MIF) e expressam a média de uma (WiDr) e duas (A-375) experiências independentes.

3.2.3.6. Avaliação da expressão membranar dos GLUT

Para avaliarmos a expressão membranar dos GLUT recorreremos à análise das intensidades de fluorescência por citometria de fluxo. Podemos observar na figura 3.20 que a expressão do GLUT1 é semelhante nos dois tipos de células. Por outro lado, a expressão da isoforma GLUT3 é cerca de 9 vezes superior nas A-375 do que nas WiDr (figura 3.21).

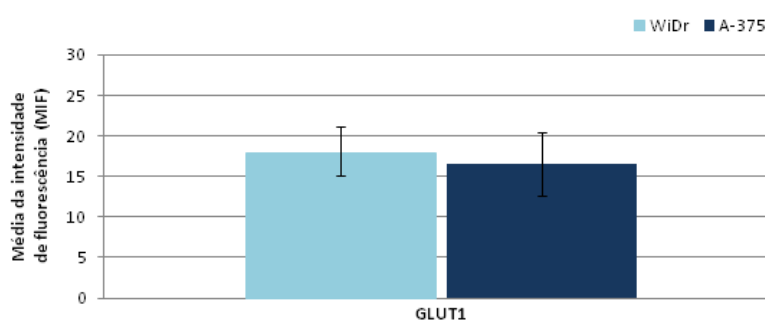


Figura 3.20 – Análise da expressão membranar do GLUT1 por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em termos da média de intensidade de fluorescência (MIF) e expressam a média de cinco (WiDr) e duas (A-375) experiências independentes.

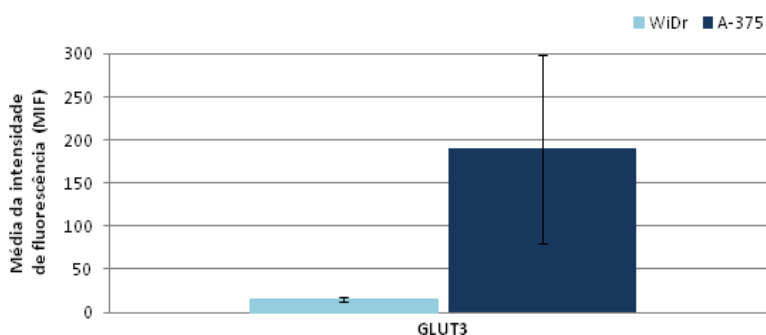


Figura 3.21 – Análise da expressão membranar do GLUT3 por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em termos da média de intensidade de fluorescência (MIF) e expressam a média de cinco (WiDr) e duas (A-375) experiências independentes.

3.3. Estudos in vivo

3.3.1. Biodistribuição em animais normais

Com o objectivo de estudar as vias de excreção do radiofármaco por nós desenvolvido e de confirmar os resultados obtidos no controlo de qualidade, foram realizados estudos *in vivo* que incluíram estudos de biodistribuição em ratinhos *Balb/c* e *Balb/c nu/nu*, uma vez que o conhecimento da biodistribuição em ratinhos saudáveis (*Balb/c*) é fundamental para se poderem estimar eventuais diferenças nos modelos portadores de xenotransplantes (*Balb/c nu/nu*). O estudo de biodistribuição iniciou-se com a administração do radiofármaco $^{99m}\text{Tc-AA}$, com uma actividade entre 1-1.64MBq na veia dorsal da cauda num volume de cerca de 100 μL , com os animais anestesiados e deitados em decúbito ventral sobre o colimador da câmara de raios gama. Após a injeção, os animais foram sacrificados, em grupos de quatro aos 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300 e 360 minutos para a colheita de órgãos. A figura 3.22 mostra a biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-AA}$ em ratinhos *Balb/c* e a respectiva quantificação de dose injectada por grama de órgão (ver equação 2.10). Observa-se a excreção por via urinária (rim, urina e bexiga) e via ciclo entero-hepático (fígado, vesícula biliar e bÍlis), não se verificando a captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ por nenhum outro órgão preferencial.

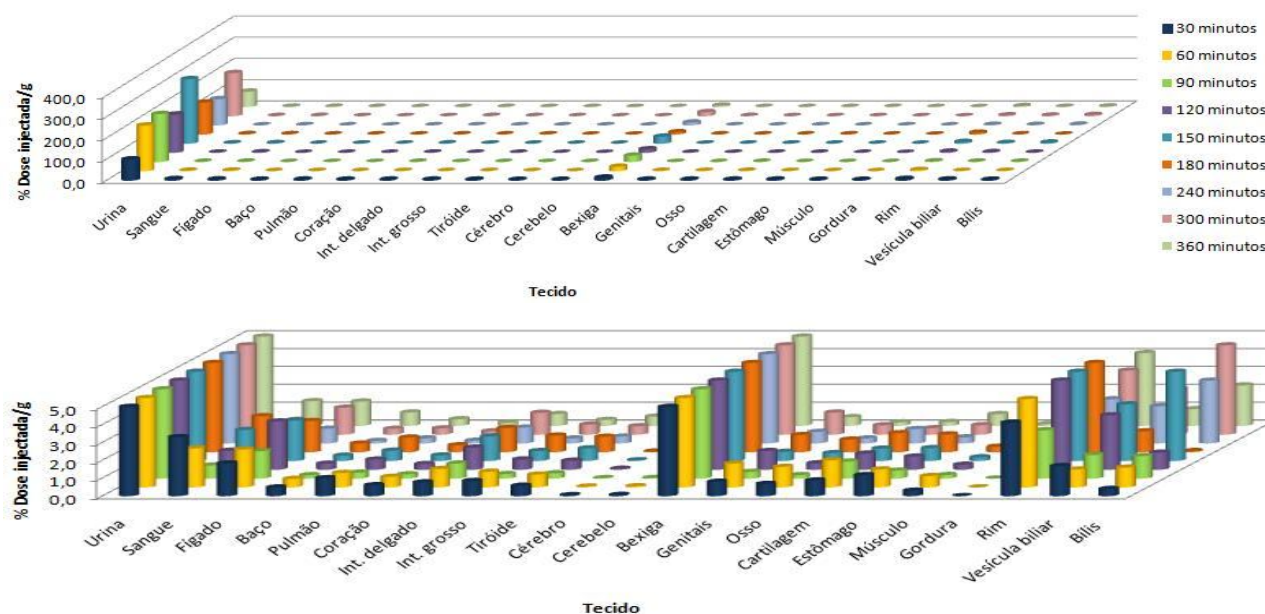


Figura 3.22 – Biodistribuição em animais *Balb/c* (normais). (A) Após 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300 e 360 minutos da administração do radiofármaco, os ratinhos foram sacrificados, os órgãos colhidos e a percentagem de dose injectada por grama de tecido quantificada; (B) Ampliação da figura A. Os resultados expressam a média de quatro ratinhos por tempo.

Realizou-se também um estudo de biodistribuição em dois ratinhos *Balb/c nu/nu* normais (de massa igual a 16 e 21g) e que foram sacrificados aos 30 minutos. Os resultados deste estudo mostram, de acordo com a tabela 3.3, que a excreção por via ciclo entero-hepático é da ordem dos

valores registados para a excreção em ratinhos *Balb/c* à mesma hora. Por outro lado, a excreção por via urinária é cerca de 3 a 5 vezes superior à registada para ratinhos *Balb/c*, verificando-se também um aumento da captação registada na maior parte dos órgãos. A excreção por via ciclo entero-hepático (fígado, vesícula biliar e bÍlis) diminui ou é aproximadamente igual.

Tabela 3.3. – Comparação da biodistribuição aos 30 minutos em ratinhos *Balb/c* e *Balb/c nu/nu*

Tecido	Balb/c (A)	Balb/c nu/nu (B)	Razão (B/A)
Urina	96,328	472,048	4,900
Sangue	3,305	5,402	1,635
Fígado	1,834	1,422	0,775
Baço	0,486	0,831	1,711
Pulmão	1,006	2,658	2,642
Coração	0,614	1,721	2,804
Int. delgado	0,769	1,492	1,940
Int. grosso	0,846	1,859	2,197
Tiróide	0,584	2,582	4,418
Cérebro	0,056	0,140	2,497
Cerebelo	0,068	0,212	3,145
Bexiga	10,495	33,690	3,210
Genitais	0,808	5,979	7,398
Osso	0,685	5,263	7,688
Cartilagem	0,880	3,360	3,819
Estômago	1,178	2,792	2,369
Músculo	0,304	3,458	11,364
Rim	4,117	12,436	3,020
Vesícula biliar	1,680	1,726	1,027
BÍlis	0,402	0,446	1,108

3.3.2. Biodistribuição em animais com xenotransplantes

Para a realização de estudos de biodistribuição em animais xenotransplantados, recorreu-se à utilização de ratinhos da espécie *Balb/c nu/nu*, uma vez que estes são animais atímicos e por isso não possuem sistema imunitário. Por este motivo, tornam-se modelos ideais para estudar *in vivo* a captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ pelas células tumorais. O resultado do estudo de biodistribuição em ratinhos *Balb/c nu/nu* portadores de xenotransplantes revela excreção por via urinária e via ciclo entero-hepático, não havendo captação por nenhum órgão preferencial com excepção do fígado aos 300 minutos (figura 3.23). De notar que aos 150 minutos todos os órgãos apresentam uma elevada captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$. Pela observação da captação geral dos órgãos na figura 3.23, e em especial da tiróide, poderíamos pensar erradamente que a formulação farmacêutica utilizada para realizar a biodistribuição poderia conter tecnécio livre, uma vez que os níveis na tiróide da figura

3.23 se encontram muito elevados em comparação com os valores registados em 3.22. Note que a captação do tecnécio livre ocorre maioritariamente na tiróide, estômago e plexos coróides. No entanto, a biodistribuição em ratinhos Balb/c nu/nu sem xenotransplantes permite-nos confirmar os valores obtidos no controlo de qualidade e concluir que esta elevada captação não se deve à presença de impurezas no radiofármaco marcado, mas sim a uma alteração do metabolismo dos ratinhos Balb/c nu/nu face aos ratinhos Balb/c, tornando a biodistribuição diferente entre as duas espécies (ver tabela 3.3).

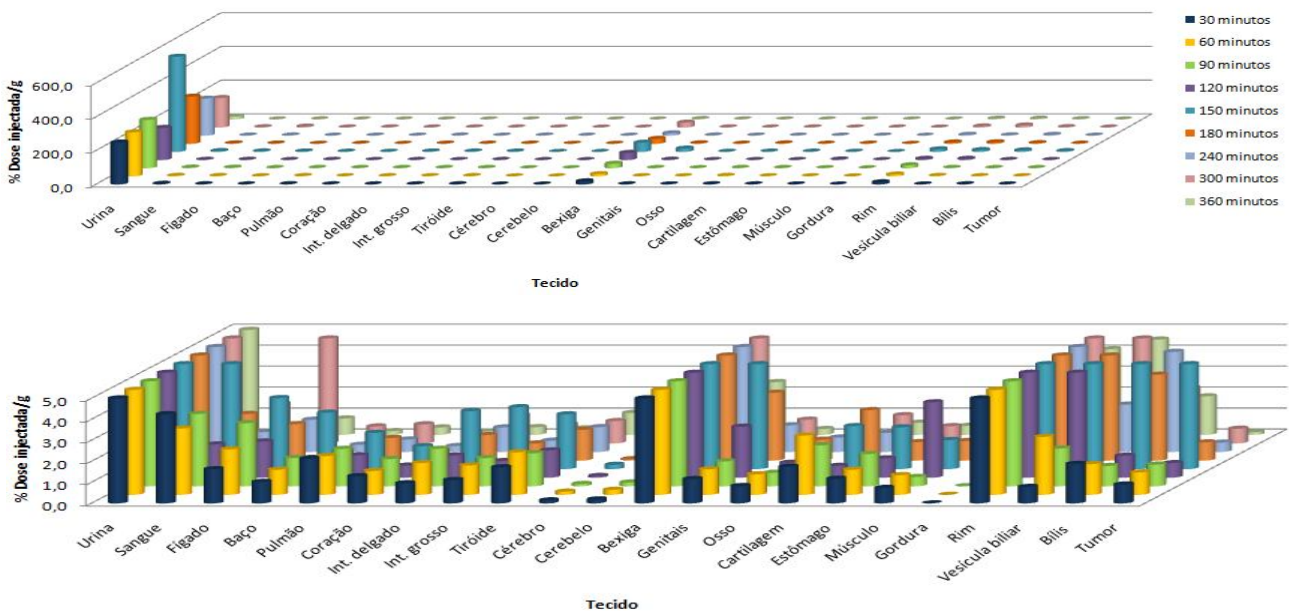


Figura 3.23 – Biodistribuição em animais Balb/c nu/nu com xenotransplantes. (A) Após 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300 e 360 minutos da administração do radiofármaco, os ratinhos foram sacrificados, os órgãos colhidos e a percentagem de dose injectada por grama de tecido quantificada. (B) Ampliação da figura A. Os resultados expressam a média de quatro ratinhos por tempo.

Como se pode observar na figura 3.24, a percentagem de dose injectada por grama de tecido tumoral foi sempre inferior a 2% ao longo do tempo, excepto aos 150 minutos, em que a dose injectada por grama de tecido tumoral é de 5.3%.

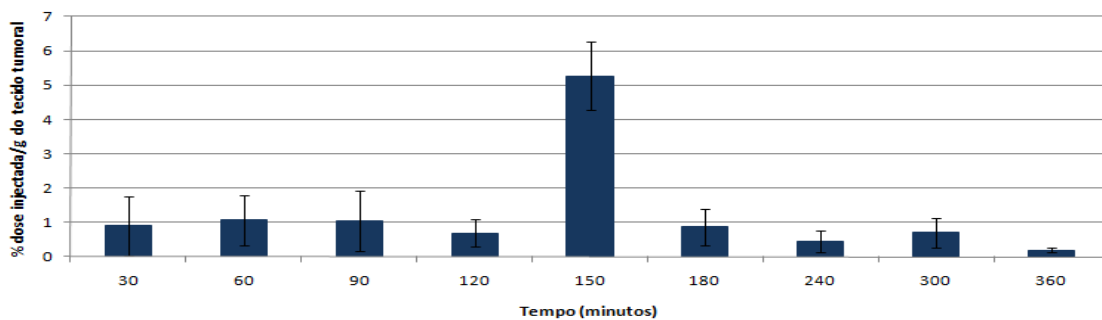


Figura 3.24 – Percentagem da dose injectada por grama de tecido tumoral. Após a excisão do tumor dos animais xenotransplantados este foi pesado e contado. Os resultados expressam a média de quatro ratinhos por tempo.

Para além da percentagem da dose injectada por grama de tecido calculada para os estudos de biodistribuição, foi determinado para cada tempo a razão entre a captação do tumor e a captação do osso e do sangue. Para cada tumor, após o sacrifício dos animais, foi calculado o volume através da medição dos seus eixos maior e menor. De acordo com os resultados obtidos e representados na figura 3.25, verifica-se que a razão tumor/sangue nunca é superior a 1, excepto aos 150 minutos. Neste tempo verifica-se também que a razão tumor/osso tem o valor mais elevado igual a 4.41. Excepto aos 150 e aos 360 minutos, a razão tumor/osso é sempre superior a 1 e inferior a 2.

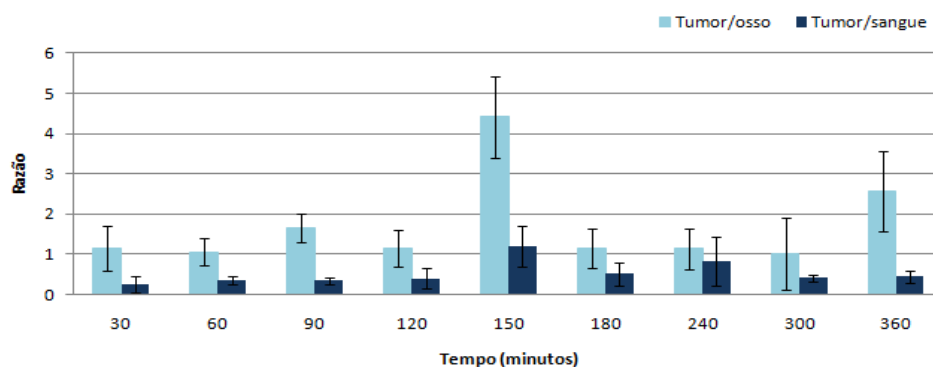


Figura 3.25 – Razão entre as captações tumor/osso e tumor/sangue. Após a obtenção do valor da massa e do número de contagens do tumor, osso e sangue, foi possível calcular a razão tumor/osso e tumor/sangue. Os resultados expressam a média de quatro ratinhos por tempo.

3.3.3. Imagiologia

As imagens adquiridas através da câmara-gama, imediatamente após a injeção do $^{99m}\text{Tc-AA}$ e visualizadas na estação de trabalho Xeleris, após normalização para uma escala de cores apropriada, permitiram identificar o tumor xenotransplantado, como se mostra na figura seguinte. As imagens adquiridas nos estudos imagiológicos foram processadas e normalizadas a uma escala de cores linear, onde o preto corresponde ao mínimo de actividade e o branco ao máximo.

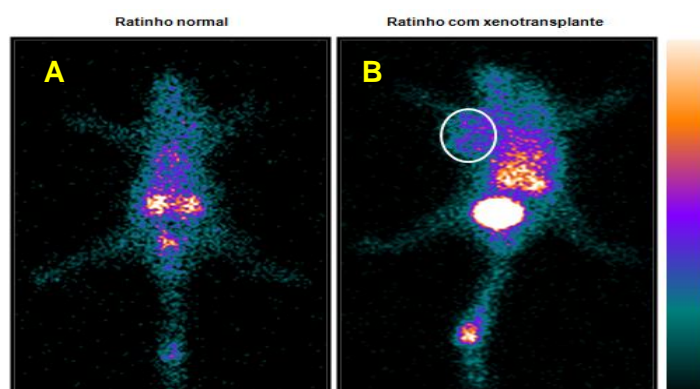


Figura 3.26 – Imagiologia do $^{99m}\text{Tc-AA}$. Imagens obtidas através da câmara-gama de um ratinho normal (A) e com tumor (B). A imagem A e B foram obtidas após 5 e 30 minutos, respectivamente, da injeção do radiofármaco. O círculo a branco indica o tumor. As imagens estão referenciadas à mesma escala de cores indicada na figura.

Através da figura 3.26.A e B podemos verificar que a tiróide e o estômago não captam o $^{99m}\text{Tc-AA}$. Por outro lado, o fígado, os rins e a bexiga mostram-se hipercaptantes. Desta forma, avaliamos não só a existência de impurezas radioquímicas, na medida em que a acumulação de tecnécio livre se dá ao nível da tiróide e do estômago e, por sua vez, a acumulação de tecnécio reduzido e hidrolizado se verifica ao nível do fígado e do baço, mas também as vias de excreção (urinária e hepatobiliar).

3.3.4. Terapia

Uma vez que *in vitro* e *in vivo* as células tumorais não apresentaram uma grande captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$, foi desenvolvida uma metodologia que permitisse inferir se a vitamina C não marcada radioactivamente era captada pelo tumor e se era capaz de reduzir o crescimento tumoral, fazendo com que o tumor se mantivesse com um volume constante, i.e. que o crescimento tumoral era estabilizado. Como explicitado na figura 3.27, pode verificar-se que ao fim de três dias de terapia intraperitoneal com AA existem diferenças no crescimento tumoral entre os animais controlo (não submetidos a tratamento com AA) e os animais submetidos a tratamento com AA. Desta forma, verifica-se que o crescimento tumoral dos animais submetidos à terapia manteve-se relativamente constante ao longo dos doze dias, enquanto os animais não submetidos à terapia revelam um crescimento que aumenta de dia para dia. De notar que não foram registadas alterações de peso dos animais ao longo do tempo nem outros efeitos adversos provenientes da terapia.

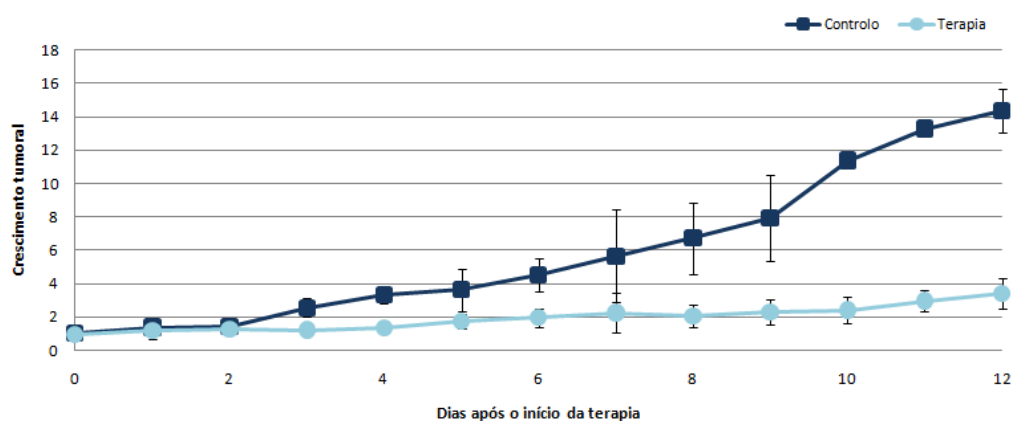


Figura 3.27 – Evolução do crescimento tumoral ao longo de doze dias de terapia com AA. Ao longo de doze dias os ratinhos Balb/c nu/nu xenotransplantados foram submetidos a uma terapia intraperitoneal com AA. Como controlo, usaram-se ratinhos não submetidos a tratamento com AA. Os resultados expressam a média de oito ratinhos controlo e de dez ratinhos submetidos a terapia.

3.4. Estudos *ex vivo*

3.4.1. Citometria de fluxo

3.4.1.1. Avaliação da morte celular

Após a excisão dos tumores, depois da terapia com AA e o isolamento das células tumorais, procedeu-se ao estudo celular através da citometria de fluxo. Assim, foi avaliada a viabilidade celular com quantificação da percentagem de células vivas, de células em apoptose e de células em necrose, através da dupla marcação com AV e IP, tendo sido os estudos realizados segundo os métodos *in vitro* já referidos.

Tabela 3.4 - Percentagem de células vivas, em apoptose e em necrose.

Rato	1	2	3	4	5
Volume (mm ³)	3160	3194	1850	3252	3801
Massa tumoral (g)	2,54	2,66	1,42	3,07	2,43
Células vivas (%)	80	78	76	83	84
Apoptose inicial (%)	4	8	5	1	1
Apoptose tardia/necrose (%)	3	5	5	1	1
Necrose (%)	13	9	14	15	14

Na avaliação da viabilidade celular, representada pela tabela 3.4, determinou-se qual a relação entre a percentagem de células vivas, em apoptose e em necrose, com o volume e a massa tumoral. Desta forma, verificou-se de forma geral que as células vivas são encontradas em maior percentagem nos tumores de volume e massa superior, enquanto as células em apoptose e em apoptose tardia/necrose são encontradas em maior número em tumores menores.

Capítulo IV

Discussão

A vitamina C é um nutriente cujos benefícios são desde há muito tempo conhecidos e amplamente divulgados, sendo que a sua maioria se deve à acção antioxidante desta vitamina. No entanto, alguns estudos sugerem que este nutriente possa ter um papel preventivo e terapêutico na doença oncológica devido à sua potencial actividade pró-oxidante, promovendo a formação de ROS que induzem a morte celular de forma selectiva nas células cancerígenas. Devido à acesa discussão que se mantém na comunidade científica, e particularmente entre os oncologistas, sobre os benefícios/malefícios da administração de grandes doses de vitamina C na prevenção e tratamento do cancro, torna-se imperativo a realização de mais estudos que permitam inferir a verdadeira função deste antioxidante/pró-oxidante na saúde e na doença humana. Para tal, pretendeu-se com este estudo estudar o metabolismo e os mecanismos de acção da vitamina C através de técnicas de medicina nuclear e de biologia celular e molecular, procurando obter resultados que representem uma mais-valia para a avaliação da aplicabilidade da vitamina C na doença oncológica.

A medicina nuclear é uma técnica poderosa que nos permite obter informações funcionais através da administração de compostos que são constituídos por um radionuclídeo e por uma molécula orgânica com fixação preferencial em determinado tecido ou órgão, os radiofármacos. Com o objectivo de explorar as potencialidades apresentadas pela medicina nuclear aplicando-as ao estudo dos processos funcionais e metabólicos da vitamina C, marcou-se radioactivamente este nutriente com um radionuclídeo emissor de fotão único, o ^{99m}Tc . A marcação radioactiva do AA foi já realizada com outros radionuclídeos (^3H , ^{14}C , ^{18}F) mas, no que diz respeito ao tecnécio, existem poucos trabalhos na literatura (Yigit, 2006).

Assim, após várias tentativas no sentido de otimizar o processo de marcação radioactiva da forma reduzida da vitamina C, a eficiência de marcação atingiu o seu máximo utilizando 200mg de AA com 222MBq de pertecnetato em 1,5mL de cloreto de sódio 0.9%, 0,2mL de cloreto de ferro III 0,1N em ácido clorídrico 0,1N e pH 6,5-7,0 acertado com uma solução de hidróxido de sódio numa concentração de 1M. De notar que, para que se desse a marcação efectiva da vitamina C, foi necessário ter em conta alguns aspectos químicos dos diferentes compostos que fazem parte da formulação farmacêutica desenvolvida. Como já referido no capítulo II, o tecnécio é um metal de transição amplamente utilizado na rotina de um serviço de medicina nuclear devido às suas propriedades físicas e químicas ideais. Este composto apresenta vários estados de oxidação que variam entre -1 e +7, factor que lhe dá a possibilidade de formar complexos de coordenação com numerosos agentes quelantes. O pertecnetato de sódio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$), eluído a partir de um gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, é o composto a partir do qual se obtém tecnécio no estado de oxidação +7 e, por isso, fortemente deficiente em electrões. No entanto, a coordenação de agentes quelantes ao tecnécio é feita quando este metal se encontra em estados de oxidação inferiores a +7 e, por este motivo, foi necessário adicionar à formulação farmacêutica desenvolvida um agente capaz de reduzir o

tecnécio do estado de oxidação +7 a outros estados de oxidação para que ocorresse a marcação efectiva do AA: o cloreto de ferro III. O cloreto de estanho II (SnCl_2) é o agente redutor vulgarmente utilizado para reduzir o tecnécio quando se pretende produzir uma formulação farmacêutica mas, neste caso, estudos já realizados tinham demonstrado a ineficiência deste agente na marcação radioactiva da vitamina C.

Após a adição de cloreto de ferro III ao tecnécio estes não reagem entre si, visto que o agente redutor não possui electrões para ceder ao metal. Assim, é necessário que o cloreto de ferro III se transforme em cloreto de ferro II, ganhando a capacidade para doar electrões ao tecnécio através da diminuição do seu estado de oxidação. No processo de transformação de cloreto de ferro III em II pensa-se que o AA tenha um papel de extrema importância, podendo este servir como fonte de electrões para o agente redutor. Desta forma, só após a adição do AA ao cloreto de ferro III e ao pertecnetato de sódio é que ocorrerá a oxidação do cloreto de ferro (III) a cloreto de ferro (II). Este composto cede electrões ao tecnécio cujo estado de oxidação é +7 e redu-lo a +4, tornando possível a formação do complexo de $^{99\text{m}}\text{Tc-AA}$, que poderá ou não incluir o cloreto de ferro na sua constituição. Para obter a formulação utilizada neste trabalho foram testadas várias variáveis determinantes para a sua constituição: actividade do radionuclídeo, volume de cloreto de sódio 0,9%, volume de cloreto de ferro III (0,1N) em HCl (0,1N) e quantidade de AA. De notar que o volume de cloreto de sódio 0,9% a adicionar ao tecnécio foi apenas optimizado para que nos estudos *in vivo* pudéssemos obter uma boa imagem funcional tendo os animais que ser injectados com o menor volume possível.

O pH é um factor que também influencia a eficiência de marcação, podendo interferir significativamente na eficiência de marcação através da formação de complexos com estrutura química e comportamento biológico diferentes do esperado. Sabendo que o pH das formulações farmacêuticas deve estar próximo de 7,4 (pH sanguíneo), o valor apresentado pelo radiofármaco desenvolvido a maiores eficiências de marcação não é muito díspar do desejado (6,5-7,0), podendo ser injectado em animais sem qualquer risco para eles. Para além disso, verificou-se que quando o processo de marcação era realizado à temperatura ambiente, em atmosfera argonada e protegida da luz, a eficiência de marcação era consideravelmente mais elevada pois o AA é altamente instável e degrada-se na presença de oxigénio e da luz. Por outro lado, sabe-se que à medida que a temperatura aumenta, a degradação do ácido ascórbico tende a aumentar. No entanto, após várias optimizações, concluiu-se que a formulação farmacêutica desenvolvida à temperatura ambiente (21-23°C) era bastante estável ao longo tempo (Nováková et al., 2008).

Para determinar a pureza radioquímica do complexo e determinar as condições óptimas para a obtenção de uma elevada eficiência de marcação foi utilizado o HPLC, uma técnica cromatográfica extremamente sensível, simples e reprodutível. Devido ao grande desenvolvimento deste sistema, principalmente no que diz respeito ao aparecimento de novas colunas para separação, aperfeiçoamento do sistema de detecção, operação em condições de temperatura

ambiente e maior sensibilidade o que permite a utilização de pequenas concentrações de amostra, o HPLC é uma técnica cada vez mais utilizada. O HPLC de fase reversa permite separar os compostos presentes numa amostra de acordo com a sua interacção com a fase estacionária não polar, sendo esta interacção responsável pela diminuição da velocidade com que a amostra percorre a fase estacionária. Assim, os compostos não polares são atraídos pela fase estacionária, enquanto os compostos polares são atraídos pela fase móvel polar movendo-se rapidamente ao longo da fase estacionária utilizada. Assim, no HPLC de fase reversa o tempo de retenção é superior para as moléculas não polares, sendo o tempo de retenção das moléculas polares muito inferior. Este tipo de cromatografia foi escolhido pois a vitamina C é uma molécula não polar que, ao interagir com a fase estacionária de sílica com uma cobertura quimicamente ligada de octadecilsilano, vai ter mais afinidade para a fase móvel, tipicamente constituída por um eluente hidro-orgânico. O eluente utilizado foi o hidrogenofosfato de potássio e metanol, sendo o metanol o modificador orgânico necessário para controlar a retenção dos compostos a analisar. Este composto miscível em água foi utilizado devido à sua baixa viscosidade e baixa absorvância no UV, reduzindo assim os problemas de pressão e de detecção. Por outro lado, quando se separam compostos de uma mistura que contém ácidos ou bases por HPLC de fase reversa, as fases móveis só com água são desadequadas, uma vez que a utilização de tampões aquosos mantém o grau de ionização das moléculas e evita os problemas de retenção secundária. Para tal, foi utilizado o hidrogenofosfato de potássio. De notar que, devido à utilização de uma coluna de sílica, o pH da fase móvel deve estar sempre entre 2 e 8. As fases móveis utilizadas neste tipo de cromatografia são menos tóxicas e são mais baratas, contribuindo para o rápido equilíbrio da coluna após a troca de solvente e para a boa estabilidade do equipamento, factores que levaram à utilização do HPLC de fase reversa para a determinação da pureza radioquímica do $^{99m}\text{Tc-AA}$.

Assim, após a marcação radioactiva da vitamina C procedeu-se a uma detecção prévia das amostras padrão: AA, cloreto de ferro III e tecnécio livre. Esta detecção permitiu conhecer os tempos de retenção de cada composto dando-nos a possibilidade de, por comparação, saber qual o tempo de retenção do $^{99m}\text{Tc-AA}$, mas também de inferir sobre a polaridade das moléculas que constituem a formulação desenvolvida. Desta forma, o tecnécio livre é o composto menos polar pois possui o maior tempo de retenção, enquanto o cloreto de ferro III é o mais polar pois é arrastado rapidamente pela fase móvel do sistema.

A eficiência de marcação obtida ao longo de 6 horas aos 0, 30, 60, 180, 240 e 360 minutos manteve-se sempre superior a 95% e relativamente constante ao longo do tempo, sinal revelador da elevada estabilidade da formulação desenvolvida. De notar que, uma vez que não é possível visualizar o pico referente ao tecnécio reduzido e hidrolisado pois este fica retido na pré-coluna, é de extrema importância vir a desenvolver futuramente um método que nos permita identificar as duas maiores impurezas presentes neste tipo de formulações, a fim de assegurarmos um controlo de qualidade que contemple a quantificação do $^{99m}\text{Tc-AA}$, do tecnécio livre e do tecnécio reduzido e

hidrolisado. Uma hipótese será um sistema de microcromatografia ascendente, um método eficiente, simples e barato.

Para validar o método desenvolvido, tornou-se imperativo determinar a sua selectividade, eficiência, resolução e linearidade. Para tal, a selectividade foi calculada tendo por base os tempos de retenção do AA e do cloreto de ferro III, resultando num valor de 1.4. Sabendo que o valor ideal para a selectividade deve ser superior a 1,2 podemos afirmar que o nosso sistema permite a discriminação clara de dois picos. O segundo parâmetro avaliado, a eficiência, resultou num valor de 0,030 para o AA e de 0,059 para o cloreto de ferro III, valores que determinam o bom estado do nosso sistema uma vez que apresentam valores inferiores a 0,06. No entanto, os valores obtidos não são ideais uma vez que a eficiência é uma propriedade da coluna e teoricamente todos os analitos separados na mesma coluna deveriam ter a mesma eficiência. Quanto à resolução do sistema cromatográfico, esta demonstrou ter o valor de 1,83 um valor superior a 1,5 e, portanto, bastante satisfatório. Por último, a linearidade permitiu-nos confirmar que o sistema de HPLC possui uma resposta linear, fornecendo assim resultados proporcionais à concentração das substâncias a analisar na formulação farmacêutica desenvolvida. A linearidade foi representada através da equação $y=85,17x+4,7927$, sendo o coeficiente de correlação muito próximo de um ($r^2 = 0,9988$) e reflectindo assim a proximidade dos dados de uma aproximação linear.

Após a obtenção de uma formulação farmacêutica estabilizada, assim como de um procedimento de marcação optimizado, procedemos aos estudos *in vitro* com o objectivo de avaliar a cinética de entrada e os efeitos citotóxicos da vitamina C em duas linhas celulares tumorais humanas: adenocarcinoma colorectal (WiDr) e melanoma melanocítico (A-375). Os estudos de captação pretendiam verificar o influxo e o efluxo do $^{99m}\text{Tc-AA}$ nas duas linhas celulares consideradas. A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que não há captação significativa do radiofármaco por nenhum tipo de células estudado. Na verdade, a captação pelas células WiDr e pelas A-375 não excede 0,45% e 0,36%, respectivamente, sendo de referir que a captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ pelas WiDr é inferior à captação do pertecnetato de sódio, ao contrário do que se passa com as A-375. Uma vez que foi realizada a determinação da viabilidade celular após o término dos estudos de captação aos 120 minutos através da técnica de azul tripano, pode-se assegurar que os resultados obtidos não se devem à morte celular pois a viabilidade celular determinada foi superior a 93% para ambas as linhas celulares estudadas. Desta forma, podemos postular várias hipóteses, sendo que a primeira pode recair sobre a confirmação dos resultados de estudos realizados por outros autores e que afirmam que as células tumorais não são capazes de transportar directamente o AA pois não possuem SVCT, as proteínas que transportam directamente o AA para o interior da célula (Augus, 1999). Para confirmarmos esta hipótese, poderíamos ter realizado estudos em células normais, sendo de esperar que a captação fosse muito superior à registada devido à presença de SVCT nas membranas celulares. Por outro lado, como referido anteriormente, pensa-se que o AA doe electrões ao cloreto de ferro III para que este se transforme em cloreto de ferro II

e possa actuar como agente redutor do tecnécio. Se tal acontecer, após doar electrões, o AA é transformado numa molécula relativamente estável: o radical ascorbil. Este radical pode ser novamente reduzido a AA, havendo portanto a possibilidade de estarmos a ver a captação do radical ascorbil e não da forma reduzida da vitamina C. Neste caso, a análise da formulação desenvolvida do ponto de vista estrutural e molecular pode ser crucial para entender estes resultados. Por último, uma vez que o controlo de qualidade desenvolvido não contemplava a presença de tecnécio livre e hidrolisado, a pequena percentagem de captação detectada pode ser devida à presença desta impureza. Posteriormente, através dos estudos *in vivo*, será possível inferirmos sobre a presença ou ausência desta impureza.

De acordo com os resultados obtidos, podemos verificar que quando as células WiDr são expostas durante 1 e 4 horas ao AA e deixadas a repousar durante 24 horas, o IC50 não varia muito, sendo que à 1 hora toma o valor de 22.73mM e às 4 horas de 23.98mM. Por outro lado, quando as células WiDr são incubadas com AA durante os mesmos períodos de tempo mas deixadas a repousar durante 48 horas, são notórias as diferenças obtidas: o IC50 após uma 1 hora de incubação aumenta ligeiramente para 25.09mM e após 4 horas diminui abruptamente para 12.21mM (~50% do valor a 24 horas). Desta forma, torna-se evidente que o tempo de repouso das células após o tratamento com o AA é determinante na proliferação celular, uma vez que às 24 horas de repouso não existem diferenças significativas entre os valores obtidos para 1 e 4 horas de tratamento. Por outro lado, após 48 horas de repouso, o IC50 das células expostas ao AA durante 1 hora aumenta, podendo ser um sinal revelador de que a quantidade de fármaco que penetrou na célula não foi suficiente para reduzir a proliferação celular mas antes para despoletar algum mecanismo de resistência ao AA. Por este motivo, torna-se necessário futuramente estudar nas condições estipuladas a expressão das proteínas resistentes à quimioterapia, como a glicoproteína P. Por outro lado, a diminuição do IC50 às 48 horas após a exposição das células WiDr a 4 horas de AA revela que o tempo de repouso é essencial para que os mecanismos inibidores de proliferação celular sejam despoletados. A obtenção de dados relativos à proliferação celular após tempos superiores de incubação do AA e de repouso poderiam ser úteis na medida em que permitiriam averiguar se os efeitos visualizados às 48 horas de repouso se mantêm. Curiosamente, nenhum destes efeitos foi visualizado quando se procedeu ao mesmo tratamento nas células A-375, sendo que o IC50 às 24 e às 48 horas de repouso com 1 hora de tratamento resultou no valor de 2.42mM e com 4 horas em 1.06mM. Desta forma, verifica-se que quanto maior a dose, menor o IC50 obtido, não tendo o tempo de repouso qualquer influência no resultado obtido para a proliferação celular. De notar que para obter o IC50 nas células WiDr tiveram de ser utilizadas concentrações farmacológicas muito elevadas de AA, enquanto nas A-375 as concentrações foram muito inferiores.

Com o objectivo de confirmar e reforçar os resultados obtidos através do método de MTT, realizaram-se estudos com o intuito de analisar a morte reprodutiva da célula. Ou seja, verificou-se

se a célula tinha a longo prazo capacidade para proliferar após o tratamento com diferentes concentrações de AA (de 0.5 a 5mM). Estes estudos, denominados por estudos clonogénicos, permitiram verificar a redução do factor de sobrevivência de 37.4% a 99.58% nas células A-375 e de 44.88 a 98.74% nas WiDr. Curiosamente, quando as células das duas linhas celulares são tratadas com a mesma concentração de 0.5mM de AA, a redução do factor de sobrevivência é ligeiramente superior nas WiDr, contrariando o que à partida poderíamos esperar pelos resultados de MTT.

Após a confirmação da redução da proliferação e da sobrevivência celular em ambas as linhas celulares estudadas, foi necessário perceber através de que mecanismos é que se davam estes efeitos. Para tal, recorreu-se à citometria de fluxo. Esta técnica permitiu analisar a viabilidade celular através da dupla marcação com AV-FITC, a presença de ROS através da marcação com DCFH₂-DA e DHE, a expressão intracelular do GSH através do alaranjado de mercúrio e a alteração do potencial de membrana mitocondrial utilizando o fluorocromo JC-1. A marcação com AV-FITC permite avaliar a viabilidade celular e distinguir diferentes tipos de morte celular. Assim, através da dupla marcação com AV-FITC e IP verificou-se que à medida que a concentração de AA aumenta, a morte celular nas WiDr também aumentava (até 60% para 45mM de AA), sendo que a maioria da morte celular ocorre por apoptose inicial ou tardia/necrose. Por outro lado, verificou-se que quando as células A-375 eram incubadas com 0.5 e 2.5mM de AA não ocorria morte celular e, mesmo quando eram expostas a 10mM de AA, a morte celular apenas atingia os 25%.

Um dos mecanismos que tem sido sugerido para o efeito citotóxico selectivo da vitamina C nas células tumorais envolve o stresse oxidativo (Chen, et al., 2005). Assim, o aumento de stresse oxidativo aliado à diminuição das enzimas antioxidantes num factor de 10 a 100, ao aumento dos metais de transição descompartimentalizados e à oxidação do AA em DHA nas células tumorais, pode levar à citotoxicidade selectiva neste tipo de células. Uma vez que as ROS desempenham um importante papel no metabolismo citotóxico da vitamina C, recorreu-se à utilização de duas sondas específicas para a detecção de peróxidos e de radical superóxido, a DCFH₂ e a DHE, respectivamente. Analisando os resultados obtidos, verificamos que quando as células WiDr são expostas a 45mM de AA há menor produção de peróxido de hidrogénio e uma elevada produção de radical superóxido. A concentração de 25mM de AA nestas células induz um ligeiro aumento das duas espécies reactivas de oxigénio, enquanto na concentração de 5mM não se verifica qualquer alteração em relação ao controlo. Assim, apesar de termos observado citotoxicidade para níveis elevados de vitamina C e de, nestas condições, verificarmos uma diminuição acentuada dos níveis de peróxidos, sugere-se que estas espécies possam ter sido convertidas em espécies mais lesivas para a célula como o radical hidroxilo e/ou o peróxido de nitrito. Estas espécies reactivas não foram medidas mas, no entanto, esta justificação é extremamente plausível pois na presença de ferro livre, o peróxido de hidrogénio é transformado pela reacção de Fenton/Haber Weiss em radical hidroxilo, e o anião superóxido, na presença de óxido nítrico, pode ser convertido em

peróxido de nitrito. Estes radicais livres são bastante reactivos e tóxicos para a célula podendo induzir morte celular (Li e Schellhorn, 2007; Valko et al., 2007). Uma vez que a detecção do radical superóxido pela sonda DHE é uma reacção relativamente específica, podendo detectar também peróxido de nitrito, o aumento de fluorescência detectada após incubação das WiDr expostas a 45mM de AA com a sonda, pode dever-se de facto à presença desta espécie reactiva de nitrogénio. De notar que, quanto maior a produção de espécies reactivas, maior a morte celular (como confirmado através da interligação dos resultados obtidos por citometria). No que diz respeito às células A-375, verifica-se que quando as A-375 são expostas a 0.5 e 10mM de AA, dá-se um pequeno aumento na produção intracelular de peróxidos, ocorrendo o mesmo em relação ao radical superóxido.

Para averiguar o nível das defesas antioxidantes presentes nas células tumorais, analisou-se por citometria de fluxo a expressão intracelular do GSH através do composto fluorescente alaranjado de mercúrio. Sabendo que o GSH é um agente redutor dos peróxidos, espera-se que quanto maior for a produção de peróxido de hidrogénio, maior a expressão intracelular de GSH. No entanto, após a exposição das WiDr a 45mM de AA, a expressão intracelular de glutatião reduziu e a de peróxido de hidrogénio diminuiu, como se disse acima. A explicação para tal está novamente relacionada com a possível rápida conversão do peróxido de hidrogénio em outras espécies reactivas mais lesivas. No que diz respeito às A-375, o glutatião reduziu após a exposição das células a 10mM de AA, o que está de acordo com os valores registados para o peróxido de hidrogénio.

Para confirmarmos a participação da mitocôndria nos efeitos biológicos da vitamina C, fomos avaliar o potencial de membrana mitocondrial pela marcação com JC-1. Os nossos estudos estão de acordo com o referido anteriormente e confirmam os resultados obtidos nos estudos de proliferação, observando-se uma diminuição da razão A/M nas condições em que a vitamina C induziu aumento da morte celular nas WiDr e nas A-375. De notar que nas A-375 este efeito apenas é mais visível na concentração de 10mM, enquanto nas WiDr é visível nas três concentrações estudadas. Tais resultados sugerem que a diminuição do potencial de membrana mitocondrial poderá estar relacionado com o efeito citotóxico da vitamina C nas células cancerígenas. De notar ainda que, comparando os controlos das duas linhas celulares estudadas, as A-375 possuem uma maior razão A/M e, por este motivo, são mais proliferativas.

Desta forma, tendo em conta que não se verifica morte celular nem formação acentuada de espécies reactivas pelas A-375 e que os resultados de MTT e dos ensaios clonogénicos denunciaram uma diminuição da proliferação e da sobrevivência celular nesta linha, podemos estar perante um mecanismo anti-cancerígeno promovido pela vitamina C que não está relacionado com a formação de espécies reactivas.

Por último, a citometria de fluxo permitiu-nos também avaliar a expressão membranar dos GLUT, revelando que a expressão da isoforma 1 é muito semelhante nas duas linhas celulares

consideradas, ao contrário da isoforma 3, que é expressa 9 vezes mais nas A-375. A alteração da expressão membranar dos GLUT nas células tumorais é muito importante, uma vez que a forma reduzida da vitamina C precisa de ser oxidada a DHA para poder exercer o seu efeito citotóxico, entrando sob esta forma no ambiente intracelular através dos GLUT. Assim, e de acordo com os resultados obtidos, é de esperar que as A-375 possuam um maior *uptake* de DHA, e consequentemente de AA. No entanto, e como já referido, o maior *uptake* destas células não se reflecte em termos de morte celular e de grande aumento de espécies reactivas.

Como já referido, a imagiologia nuclear permite o estudo de neoplasias através do uso de radiofármacos com metabolismo adequado, dando informação anatómica, fisiológica e metabólica do sistema biológico em estudo. Quando um radiofármaco é administrado sofre, de modo geral, processos de distribuição, metabolização e excreção como qualquer outro fármaco dependendo das características físico-químicas do radiofármaco que determinam a sua farmacocinética. Desta forma, o radiofármaco deve ser fixado selectivamente pelo órgão ou sistema que se deseja analisar sendo também desejável a localização rápida no órgão alvo, metabolização e excreção eficientes, de modo a aumentar o contraste da imagem e a reduzir a dose de radiação absorvida pelo doente.

Assim, e com o intuito de averiguar as vias de excreção e metabolização do composto marcado e o resultado do controlo de qualidade do mesmo, realizámos estudos de biodistribuição e obtivemos imagens de ratinhos Balb/c e Balb/c nu/nu após a injeção intravenosa do composto marcado. Pelos resultados de biodistribuição, assim como pelos estudos imagiológicos, pudemos verificar que a excreção do complexo se efectua via urinária e ciclo entero-hepático, não se verificando a captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ por nenhum órgão preferencial. A partir destes estudos verificámos também uma reduzida acumulação do radiofármaco em órgãos onde preferencialmente se acumulam impurezas radioquímicas, tais como a tiróide, estômago, fígado e baço. Estes dados levam-nos a concluir que a formulação farmacêutica desenvolvida e analisada possuía um elevado grau de pureza radioquímica, e que poderia ser usada para o objectivo proposto, afastando assim a ideia de que o perfil de captação visualizado nos estudos de captação se poderia dever à presença de tecnécio reduzido e hidrolisado. Os mesmos resultados foram obtidos em ratinhos Balb/c nu/nu portadores de xenotransplantes, sendo de notar que captação de todos os órgãos nos ratinhos Balb/c nu/nu aumentaram bastante após a injeção do $^{99m}\text{Tc-AA}$, o que desde logo faz suspeitar se a biodistribuição num animal atímico e normal será igual. Para provarmos que de facto a biodistribuição é diferente, realizámos estudos de biodistribuição em dois ratinhos Balb/c nu/nu saudáveis e constatámos que a captação em alguns órgãos chega a ser 3 a 5 vezes da obtida num ratinho Balb/c. Uma vez que os ratinhos são uma espécie animal que possui a enzima GULO e portanto produzem vitamina C, a explicação encontrada para este facto é os ratinhos atímicos não serem tão “eficientes” na produção deste nutriente e, por este motivo, captarem-no para colmatar as suas necessidades. Por outro lado, uma vez que os ratinhos atímicos não possuem sistema imunitário e a vitamina C cumpre variadas funções a este nível, a captação do complexo pode ser

maior nestes ratinhos devido à tentativa de incorporar a vitamina C em alguns processos metabólicos relacionadas com a imunidade. De notar, por último, a baixa captação tumoral do complexo marcado. Apenas aos 150 minutos é que a captação do tumor (i.e. a dose injectada por grama de tecido tumoral) atinge um valor máximo de 5.3%, sendo nos restantes tempos inferior a 1%. Também a razão tumor/sangue nunca é superior a 1, excepto aos 150 minutos. Neste tempo verifica-se também que a razão tumor/osso tem o valor de 4.41, o valor mais elevado registado. Excepto aos 150 e aos 360 minutos, a razão tumor/osso é sempre inferior a 2 e superior a 1.

Uma vez que *in vivo* existe a enzima responsável pela oxidação do AA a DHA, após a oxidação a vitamina C pode ser transportada através dos GLUT presentes nas membranas celulares das células tumorais para o interior da célula. Eventualmente, o facto da molécula de AA se encontrar acoplada ao tecnécio pode estar a impedi-la de se oxidar, não sendo portanto captada pelo tumor. Por outro lado, e devido à mesma explicação para os estudos de captação, podemos estar a assistir à biodistribuição do radical ascorbil marcado com tecnécio e não ao AA.

Devido à baixa captação tumoral do $^{99m}\text{Tc-AA}$, desenvolveu-se uma metodologia que permitiu constatar *in vivo* o papel da vitamina C na doença oncológica através da redução da taxa de crescimento tumoral após a injeção intraperitoneal diária de AA em ratinhos. Vários estudos de farmacocinética demonstraram claramente que as concentrações de vitamina C no plasma e nos tecidos são altamente controladas em função das doses orais, uma vez que esta via de administração é limitada pela eliminação do excesso de vitamina por via renal. Como consequência, a administração oral da vitamina C não pode alcançar concentrações plasmáticas superiores a 50-100 μM e, por este motivo, a suplementação oral de vitamina C parece não ter influência no tratamento de doentes oncológicos. Assim, ao estudarmos qual a melhor via para fazer a administração de AA aos ratinhos Balb/c, desde logo não considerámos a via oral. Das três vias possíveis, a via intravenosa era a ideal, uma vez que a injeção i.v. prescinde do sistema de reabsorção renal e permite a obtenção de concentrações plasmáticas de vitamina C muito mais elevadas. No entanto, devido à fragilidade da cauda dos ratinhos utilizados, tivemos de fazer a injeção diária de AA através da via intraperitoneal. Pelos resultados obtidos, pode verificar-se que o crescimento tumoral dos ratinhos submetidos a terapia estagnou, enquanto o crescimento tumoral dos ratinhos controlo continuou diariamente a aumentar, factor que revela que o AA pode ter efectivamente um papel ao nível da doença oncológica, sendo largamente captado pelas células tumorais.

Para percebermos qual foi o efeito ao nível da morte celular nos tumores submetidos a terapia, realizaram-se estudos *ex vivo* cujo objectivo era determinar a viabilidade celular através de citometria. Assim, a dupla marcação com AV-FITC e IP mostrou que a percentagem de células vivas é maior nos tumores com dimensões maiores relativamente aos de menores dimensões. Simultaneamente, a percentagem de células em apoptose tardia e de células mortas por necrose também é maior nos tumores mais pequenos. Esta aparente contradição justifica-se não só pelas

condicionantes que estimulam o crescimento mas também pela forma aproximadamente esférica do tumor. Esta geometria faz com que o número de células periféricas, melhor irrigadas, seja muito maior do que as interiores, nos tumores maiores. Assim, o número de células vivas é maior nos tumores de maior raio. Esta mesma questão geométrica explica porque razão nos tumores maiores existe menor percentagem de células em apoptose e em necrose, uma vez que as células vivas predominam nas amostras. De notar que, uma vez que a amostra é muito reduzida, as conclusões retiradas dos estudos ex vivo são ainda muito preliminares e gerais.

Conclusão e perspectivas futuras

Deste trabalho, cujo objectivo principal era contribuir para o esclarecimento do metabolismo e dos mecanismos de acção da vitamina C na doença oncológica, podemos retirar várias conclusões. Em relação aos estudos de química, que contemplaram a marcação radioactiva da forma reduzida da vitamina C e o respectivo controlo de qualidade da formulação desenvolvida, podemos concluir que:

- ♦ Foi possível desenvolver uma formulação farmacêutica reprodutível e estável no tempo, o $^{99m}\text{Tc-AA}$. Este composto apresentou um elevado grau de pureza radioquímica, de tal forma que foi possível usá-lo em ensaios *in vivo* e *in vitro*.

- ♦ Foi desenvolvido um método de controlo de qualidade que tornou possível a separação dos diferentes compostos presentes na formulação farmacêutica: o AA, o cloreto de ferro III, o pertecnetato de sódio e a vitamina C marcada radioactivamente. Uma vez que este controlo de qualidade não permitiu distinguir a presença de tecnécio reduzido e hidrolisado, é necessário vir a desenvolver um método de controlo de qualidade que contemple esta impureza radioactiva. A microcromatografia ascendente pode ser uma solução, uma vez que é um método simples, rápido e eficiente capaz de detectar todas as impurezas radioactivas habitualmente presentes numa formulação radiofarmacêutica.

Relativamente aos estudos *in vitro* realizados em células de adenocarcinoma colorectal (WiDr) e de melanoma melanocítico (A-375), o seu objectivo foi avaliar a cinética de entrada e os efeitos citotóxicos da vitamina C neste tipo de células. Dos resultados obtidos podemos retirar as seguintes conclusões:

- ♦ As células WiDr e A-375 não captam a formulação radiofarmacêutica desenvolvida, provavelmente porque não possuem a capacidade de transportar directamente o AA para o seu interior pois não possuem SVCT, as proteínas que transportam directamente o AA para o interior da célula. Por outro lado, no processo de marcação, o AA pode transformar-se em radical ascorbil e esta molécula, se não for novamente reduzida a AA, pode ser marcada com tecnécio em vez da forma reduzida da vitamina C. Futuramente, podem-se realizar estudos em células normais de forma a confirmar se a captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ é superior nestas células, o que será de esperar uma vez que possuem os transportadores adequados na sua membrana. Por outro lado, a análise da

formulação desenvolvida do ponto de vista estrutural e molecular pode ser crucial para entender os resultados obtidos e assim determinar a verdadeira estrutura da formulação desenvolvida.

- ♦ A incubação das células WiDr e A-375 com o complexo desenvolvido ou com o pertecnetato de sódio não alteraram significativamente viabilidade celular, avaliada pelo método de exclusão do azul de tripano, em qualquer das condições, mostrando sempre uma viabilidade celular acima dos 93%.

- ♦ A forma reduzida da vitamina C induz um efeito inibitório nas linhas celulares estudadas, sendo este efeito mais evidente para menores concentrações de AA nas células A-375. Nestas células, o seu tempo de repouso não influencia os resultados, tendo o IC50 mantido o seu valor quando as células eram incubadas com o AA durante o mesmo tempo, mas o tempo de repouso aumentava. Por outro lado, quando o tempo de exposição aumenta, diminui o IC50 das A-375. No que diz respeito às WiDr, tornou-se óbvio que o tempo de repouso influencia muito o IC50 destas células, pois quando são incubadas com AA durante um tempo diferente mas são submetidas a um tempo de repouso igual, os resultados não diferem muito. Por outro lado, quando o tempo de repouso aumenta, há diferenças significativas para o IC50 entre os diferentes tempos de exposição ao AA. Os resultados obtidos sugerem que, durante curtos períodos de exposição (1 hora), a vitamina C que penetra no interior das células não seja suficiente para inibir a proliferação celular mas sim aumentá-la, podendo as células adquirir mecanismos de resistência ao fármaco à medida que são deixadas a repousar. Por outro lado, para períodos de exposição ao AA superiores, a diminuição da proliferação celular é muito evidente. Estes resultados precisam de ser explorados, através de ensaios de MTT com outros tempos de incubação e de exposição, assim como do estudo dos mecanismos que podem eventualmente explicar uma possível resistência celular ao AA e da diminuição da proliferação celular.

- ♦ O efeito anti-proliferativo verificado nas WiDr é acompanhado de um efeito citotóxico, dada a diminuição da viabilidade celular e conseqüente aumento de morte celular por apoptose inicial, tardia, e necrose. Este efeito citotóxico do AA poderá estar relacionado com a produção de ROS, nomeadamente, pela conversão de peróxidos em espécies bastante reactivas e tóxicas, tais como o radical hidroxilo e o peróxido de nitrito, o que está de acordo com a morte celular por apoptose tardia/necrose que observámos. Desta forma, poderá ser de interesse futuro proceder à detecção de outras espécies reactivas mais lesivas, como as espécies reactivas de nitrogénio.

- ♦ A disfunção mitocondrial, avaliada pela diminuição do potencial de membrana mitocondrial, é outro dos mecanismos que está relacionado com o stresse oxidativo e que pode

contribuir para o efeito citotóxico de elevadas doses de vitamina C nas células de adenocarcinoma colorectal.

- ♦ O efeito anti-proliferativo verificado nas A-375 não é acompanhado por valores elevados de morte celular ou grande aumento de espécies reactivas. Tais resultados, associados aos resultados de MTT e dos ensaios clonogénicos que denunciam uma diminuição da proliferação e da sobrevivência celular nesta linha celular após exposição ao AA, revelam um possível mecanismo anti-cancerígeno promovido pela vitamina C nas células de melanoma melanocítico que pode não estar relacionado com a formação de espécies reactivas.

- ♦ Uma vez que os estudos de citometria foram levados a cabo com células que foram expostas ao AA durante 1 hora e deixadas a repousar durante 24 horas, seria interessante realizar mais estudos de citometria com o intuito de analisar o ambiente microtumoral após as células serem submetidas a outras condições experimentais.

Dos estudos *in vivo* e *ex vivo* realizados podemos inferir que:

- ♦ O complexo desenvolvido é excretado por via renal e hepato-biliar e possui uma elevada eficiência de marcação, sustentada por estudos de biodistribuição e imagiológicos.

- ♦ A biodistribuição do complexo é substancialmente diferente em ratinhos Balb/c e Balb/c nu/nu, factor que pode estar relacionado com o deficiente sistema imunitário dos ratinhos Balb/c nu/nu.

- ♦ A captação pelo tecido tumoral não é elevada, factor que pode ser explicado pelos mesmos motivos pelos quais as células tumorais não captam a formulação farmacêutica nos estudos de influxo e efluxo. Por outro lado, *in vivo*, pode ainda haver uma outra justificação para esta falta de captação: mesmo que o AA esteja efectivamente marcado, na presença da enzima reductase *in vivo*, pode não conseguir oxidar-se devido à presença da molécula de tecnécio acoplada. Por este motivo, não consegue penetrar nas células tumorais através dos únicos transportadores de vitamina C presentes na membrana celular, os GLUT.

- ♦ Foi provado *in vivo*, através de uma terapia que consistia na injeção intraperitoneal diária de uma solução de AA em ratinhos Balb/c nu/nu com xenotransplantes, que a forma reduzida da vitamina C estabiliza o crescimento tumoral, podendo desta forma contribuir para a terapêutica oncológica.

Com o intuito de melhorar os resultados obtidos, sugere-se ainda que seja feita a marcação radioactiva da forma oxidada da vitamina, o DHA, e que todos os estudos de química, *in vitro* e *in vivo* sejam repetidos. Por outro lado, torna-se imperativo que se esclareça os mecanismos que podem explicar os evidentes efeitos anti-cancerígenos da vitamina C que neste trabalho ficaram bem patentes.

Referências bibliográficas

- Ames, B.; Shigenaga, M.; Hagen, T. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 7915-7922.
- Arrigoni, O.; Tulio, M. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta* **1569**, 1-9.
- Aubry, J.; Blaecke, A.; Lecoanet-Henchoz, S.; Jeannin, P.; Herbault, N.; Caron, G.; Moine, V.; Bonnefoy, J. (1999). Annexin-V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. *Cytometry* **37**, 197-204.
- Agus, B. (1999). Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *J. Clin. Invest* **100**.
- Azevedo, C. (2005). *Biologia celular e molecular*, 4,^a edição, pp. 295-297. Lidel, edições técnicas.
- Block, G. (1991). Vitamin C and cancer prevention: the epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr* **53**, 270-282.
- Burdon, R. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free radical biol. and med.* **18**, 775-794.
- Cadenas, E.; Davies, K. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology & Medicine* **29**, 222-230.
- Carr, A.; Frei, B. (1999). Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am J Clin Nutr* **69**, 1086–1107.
- Chen, Q.; Espey M.; Krishna M.; Mitchell J.; Corpe C.; Buettner G.; Shacter, E.; Levine, M. (2005). Pharmacological ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *PNAS* **102**, 13604-13609.

- Dagrosa, M.; Viaggi, M.; Longhino, J.; Calzetta, O.; Cabrini, R.; Edreira, M.; Juvenal, G.; Pisarev, M. (2003). Experimental application of boron neutron capture therapy to undifferentiated thyroid carcinoma. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* **57**, 1084–1092.
- Deutsch, J. (2000). Dehydroascorbic acid. *Journal of chromatography A* **881**, 299-307.
- Dikalov S.; Griending K.; Harrison, D. (2007). Measurement of reactive species in cardiovascular studies. *Hypertension* **49**, 717-727.
- Drisko, A; Chapman, J.; Hunter, J. (2003). The use of antioxidants with first-line chemotherapy in two cases of ovarian cancer. *Journal of the American College of Nutrition* **22**, 118-123.
- Fruehauf, J.; Meyskens, J. (2007). Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res* **13**, 789-794.
- González, M.; Miranda, J.; Mora, E.; Guzmán, A.; Riordan, N.; Riordan, H.; Casciari, J.; Jackson, J.; Román, A. (2005). *Integrative Cancer Therapies* **4**, 32-44.
- Gorman, A.; Samali, A.; McGowan A.; Cotter T. (1997). Use of flow cytometry techniques in studying mechanisms of apoptosis in leukemic cells. *Cytometry* **29**, 97-105.
- Gutteridge, J; Halliwell, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS* **15**, 129-135.
- Iqbal K.; Khan A.; Khattak M. (2004). Biological significance of ascorbic acid (vitamin C) in human health - a review. *Pakistan Journal of Nutrition* **3**, 5-13.
- Kazakevich, Y.; LoBrutto, R. (2007). *HPLC for pharmaceutical scientist*, 1.^a edição, pp. 15-22. John Wiley & Sons.
- Knudson, A. (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 10914-10921.
- Lee, K.; Lee, H.; Surh, Y.; Lee, C. (2003). Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal. *Am J Clin Nutr* **78**, 1074–1078.
- Levine, M.; Rumsey, S.; Daruwala, R.; Park, J; Wang, Y. (1999). Criteria and recommendations for Vitamin C intake. *JAMA* **281**, 1415-1423.

- Li, Y.; Schellhorn, H. (2007). New developments and novel therapeutic perspectives for Vitamin C. *The journal of nutrition* **137**, 2171-2179.
- Luck, M.; Jeyaseelan, I.; Scholes, R. (1995). Ascorbic Acid and Fertility. *Biology of reproduction* **52**, 262-266.
- Martinez, J.; Parker, M.; Fultz, K.; Ignatenko, N.; Gerner, E. (2003). *Molecular biology of cancer*, vol. 5, 6.^a edição, pp. 1-50. *Berger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*.
- Mease, R.; Lambert, C. (2001). Newer methods of labeling diagnostic agents with Tc-99m. *Seminars in Nuclear Medicine* **21**, 278-285.
- Meyer, V. (2004). *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 4.^a edição, pp. 4-159. John Wiley & Sons.
- Moss, R. (2006). Should patients undergoing chemotherapy and radiotherapy be prescribed antioxidants? *Integrative Cancer Therapies* **5**, 63-82.
- Nelson, D.; Cox, M. (2004). *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 4.^a edição, pp. 690-722; W. H. Freeman.
- Nováková, L.; Solich, P.; Solichová, D. (2008). HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Trends in Analytical Chemistry* **27**, 942-958.
- O' Connor, J.; Kimler, B.; Morgan, M.; Tempas, K. (1988). A flow cytometric assay for intracellular nonprotein thiols using mercury orange. *Cytometry* **9**, 529-532.
- Orrenius, S.; Gogvadze, V.; Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 143-183.
- Ozben, T. (2007). Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of pharmaceutical sciences* **96**, 2181-2196.
- Padayatty, S.; Katz, A.; Wang, Y.; Eck, P.; Kwon, O.; Lee, J.; Chen, S.; Corpe, C.; Dutta, A.; Dutta, S.; Levine, M. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition* **22**, 18-35.

- Padayatty, S.; Levine, M. (2001). New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. *CMAJ* **164**, 353-355
- Padayatty, S.; Levine, M. (2005). Reevaluation of ascorbate in cancer treatment: emerging evidence, open minds and serendipity. *Journal of the American College of Nutrition* **19**, 423-425.
- Padayatty, S.; Sun, H.; Wang, Y.; Riordan, H.; Hewitt, S.; Katz, A.; Wesley, R.; Levine, M. (2004). Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous administration use. *Ann Intern Med* **140**.
- Perera, F.; Weinstein, I. (2000). Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* **21**, 517-524.
- Prasad, K.; Kumar, A.; Kochupillai, V.; Cole, W. (1999). High doses of multiple antioxidant vitamins: essential ingredients in improving the efficacy of standard cancer therapy. *Journal of the American College of Nutrition* **18**, 13-25.
- Ribeiro, A. (2000). Alterações fenotípicas da célula tumoral e a sua relação com a resistência à quimioterapia. Tese de doutoramento. Universidade de Coimbra, 1-3; 36-45.
- Riordan, N.; Riordan, H.; Meng, X.; Li, Y.; Jackson, J. (1994). Intravenous ascorbate as a tumor cytotoxic chemotherapeutic agent. *Medical Hypotheses* **44**, 207-213
- Robbins, J. (1984). *Chromatography of technetium-99m radiopharmaceuticals - a practical guide*. The Society of Nuclear Medicine, New York.
- Robinson, K.; et al. (2006). Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *National Academy Sciences USA* **103**, 15038-15043.
- Rumsey, S.; Levine, M. (1998). Absorption, transport and disposition of ascorbic acid in humans. *Nutritional Biochemistry* **9**, 116-130.
- Sarkar, M.; Varshney, R.; Chopra, M.; Sekhri, T.; Adhikari, J.; Dwarakanath, B. (2005). Flow-cytometry analysis of reactive oxygen species in peripheral blood mononuclear cells of patients with thyroid dysfunction. *Cytometry (Clinical Cytometry)* **70**, 20-23.

- Seeley, R.; Stephens, T.; Tate, P. (2003). *Anatomia & Fisiologia*, 6ª Edição, pp. 935-942; 1111. Lusociência.
- Sekine, T.; Narushima, H.; Suzuki, T.; Takayamam T.; Kudo, H.; Lin, M.; Katsumura, Y. (2004). Technetium(IV) oxide colloids produced by radiolytic reactions in aqueous pertechnetate solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **249**, 105–109.
- Sgonc, R.; Gruber, J. (1998). Apoptosis detection: an overview. *Experimental gerontology* **33**, 525-533.
- Snyder, L.; Kirkland, J., Glajch, J. (1997). *Practical HPLC Method Development*, 2ª Edição, pp. 1-231; 643-684. Wiley.
- Spector, A. (2000). Review: Oxidative stress and disease. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics* **16**, 193-201.
- Tarpey, M.; Wink, D.; Grisham, M. (2003). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp Physiol* **286**,431 -444.
- Toykuni, S. (1999). Reactive oxygen species- induce cellular damage and its application in pathology. *Pathology International* **49**, 91-102.
- Turrens, J. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **554**, 335-344.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.; Mazur, M; Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**, 44–84.
- Valko, M.; Rhodes, C.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* **160**, 1-40.
- Verrax, J.; Calderon, P. (2008). The controversial place of vitamin C in cancer treatment. *Biochemical pharmacology* **76**, 1644 - 1652.
- Walingo, M. (2005). Role of vitamin C (ascorbic acid) on human health. *African Journal of Food Agriculture, Nutrition and Development* **5**.

Weinberg, R. (1993). A molecular basis of cancer. *Sc. Am.* **249**, 102-116.

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

Yao, J.; Jiang, Z.; Duan, W.; Huang, J.; Zhang, L.; Hu, L.; He, L.; Li, F.; Xiao, Y.; Shu, B.; Liu, C. (2008). Involvement of mitochondrial pathway in triptolide-induced cytotoxicity in human normal liver L-02 cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **31**, 592-597.

Yigit, S. (2006). Preparation of ^{99m}Tc labeled vitamin C (ascorbic acid) and biodistribution in rats. *Chem. Pharm. Bull.*, **54**.

Zhao, H.; Joseph, J.; Fales, H.; Sokoloski, E.; Levine, R.; Vasquez-Vivar, J.; Kalyanaram, B. (2005). Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *PNAS* **102**, 5727-5732